



На правах рукописи

ПУГОВКИН ДМИТРИЙ ВИТАЛЬЕВИЧ

**ЭПИФИТНЫЕ БАКТЕРИОЦЕНОЗЫ *FUCUS VESICULOSUS* L.
БАРЕНЦЕВА МОРЯ И ИХ РОЛЬ В ДЕГРАДАЦИИ НЕФТЯНЫХ
ЗАГРЯЗНЕНИЙ.**

Специальность: 25.00.28 – Океанология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Мурманск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Мурманском морском биологическом институте Кольского научного центра Российской академии наук

Научный руководитель: **Ильинский Владимир Викторович**, д.б.н., профессор кафедры гидробиологии биологического ф-та МГУ им. М.В. Ломоносова;

Официальные оппоненты: **Евдокимова Галина Андреевна**, д.б.н. по специальностям 03.00.07 «микробиология» и 11.00.11 «охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов», профессор, Институт проблем промышленной экологии Севера КНЦ РАН, зам. директора;

Степаньян Олег Владимирович, к.б.н. по специальности 25.00.28 «океанология», Южный научный центр РАН, зав. отделом;

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Мурманский государственный технический университет».

Защита состоится «21» февраля 2017 г. в 10 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д.002.140.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Мурманском морском биологическом институте Кольского научного центра Российской академии наук по адресу: 183010 г. Мурманск, ул. Владимирская, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Мурманского морского биологического института Кольского научного центра РАН и в сети Интернет http://www.mmbi.info/fs/files/804/Dissertaciya_Pugovkin.pdf.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д.002.140.01,
кандидат географических наук



И.С. Усягина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. При возможном расширении добычи углеводородного сырья на шельфе арктических морей, транспортировки, перегрузки, строительства перерабатывающих комплексов на побережье, возрастает угроза нефтяного загрязнения морской среды. Попавшая в море нефть может проникать в толщу воды, выноситься на берег, накапливаться в грунтах, оказывая негативное влияние на все группы морских организмов, обитающих в океане. В связи с этим, особую актуальность приобретает проблема биологической очистки прибрежных акваторий в Арктических морях, поскольку из-за низких температур воды и длительных периодов полярной ночи естественное разложение нефтепродуктов сильно замедлено (Патин, 2008).

Основная нагрузка в данном процессе ложится на углеводородоокисляющие микроорганизмы (углеводородоокисляющие бактерии – УОБ). В последние годы внимание исследователей привлекли ассоциации морских растений (водорослей-макрофитов) и микроорганизмов (бактерий). Показано, что водоросли-макрофиты способны аккумулировать на своей поверхности нефтепродукты (НП), а эпифитные углеводородоокисляющие бактерии, преобразуют эти НП до более простых соединений, и в результате делают их доступными для водорослей.

Вопросы, связанные с состоянием и изменением активности УОБ, ассоциированных в прибрежной зоне с водорослями-макрофитами, в литературе практически не освещены. Сведения о биологии организмов, участвующих в процессах естественного очищения морских вод от НП, могут внести вклад в понимание механизмов данного процесса, а также позволят оценить потенциальный вклад биоты в биоремедиацию прибрежных акваторий арктических морей.

Целью исследования явилось определение таксономической структуры культивируемых и некультивируемых эпифитных бактериальных сообществ бурой водоросли *Fucus vesiculosus* в акваториях, различающихся по степени нефтяного загрязнения, а также выявление углеводородоокисляющей способности эпифитных бактериоценозов фукуса.

Для достижения этой цели в работе были определены следующие **задачи**:

1. Разработать оптимальный метод удаления эпифитных бактерий (ЭБ) с поверхности талломов макрофитов.
2. В эпифитных бактериальных сообществах *F. vesiculosus* в районах, различающихся по степени антропогенного загрязнения, определить:
 - общую численность бактерий;
 - численность культивируемых бактерий;
 - количественное распределение культивируемых бактерий по таллому фукуса;

- таксономический состав культивируемых УОБ;
 - таксономический состав некультивируемых бактерий.
3. Экспериментально оценить углеводородокисляющую способность эпифитных бактериоценозов в лабораторных условиях.

Научная новизна. Экспериментальными и натурными наблюдениями показано влияние нефтяных углеводородов (НУ) на количественные и качественные характеристики бактериального сообщества и физиологическое состояние водорослей. Впервые определена возможная роль симбиотических ассоциаций УОБ и водорослей-макрофитов в нейтрализации последствий разлива нефтепродуктов в прибрежных акваториях Баренцева моря. Определены доминирующие культивируемые представители эпифитного бактериального сообщества. Впервые на основе молекулярно-генетического анализа описана таксономическая структура бактериоценозов водорослей и ее изменения в условиях нефтяного загрязнения.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные могут быть использованы для оценки роли симбиотической ассоциации водорослей и эпифитных микроорганизмов в процессе биоремедиации морской среды, стать основой разработки новых и усовершенствования уже существующих технологий для борьбы с нефтяным загрязнением, увеличить эффективность очистки прибрежных районов северных морей от нефтепродуктов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Загрязнение водной среды нефтепродуктами вызывает значительное увеличение количества эпифитных микроорганизмов у водорослей *F. vesiculosus*, в первую очередь УОБ, и также оказывает влияние на таксономическую структуру бактериальных сообществ. В присутствии нефтяного загрязнения доминантными являются бактерии, относящиеся к типу *Proteobacteria* и классу *Gamma proteobacteria*, среди которых преобладают представители рода *Acinetobacter*. В незагрязненных НУ районах (в частности – в губе Зеленецкой Баренцева моря) доминируют представители типов *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria* и *Gamma proteobacteria*) и *Bacteroidetes* (*Sphingobacteria* и *Flavobacteria*).

2. Эпифитные бактериальные сообщества фукусовых водорослей способны к утилизации нефтяных углеводородов и, по сравнению с пелагическими бактериоценозами, вносят более значимый вклад в процессы деструкции нефтепродуктов. При количественном сравнении углеводородокисляющей активности эпифитных бактериоценозов фукусов из загрязненной и чистой акваторий значимой разницы не наблюдается. Это может объясняться высокой адаптивной способностью эпифитных бактериальных сообществ фукусовых водорослей к условиям нефтяного загрязнения.

Личный вклад соискателя. Автором самостоятельно проведены отбор и обработка проб, выбор и модификация оптимальных методов исследования, освоены методы молекулярно-генетического анализа. Полученные результаты обобщены в виде настоящей работы. Все представленные в рукописи данные и результаты являются подлинными и оригинальными и, кроме специально оговоренных случаев, получены лично автором.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на российских семинарах и конференциях:

-XVII конференции молодых ученых. Мурманск, ММБИ КНЦ РАН, 2009 г.

-Международной научной конференции «Природа морской Арктики: современные вызовы и роль науки», посвященная 75-летию ММБИ КНЦ РАН. Мурманск, 10–13 марта 2010 г.

-Школе молодых ученых по морской биологии «Биоресурсы и аквакультура» г. Мурманск (28-29 февраля 2012г.)

-Workshop for CETIA' participants (Russian-Norwegian), Tromsø, Norway, 14 – 19 April 2012.

- Конференции «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии» г. Ростов-на-Дону, 25–29 марта 2013 г.

-XXXI конференции молодых учёных Мурманского морского биологического института, посвящённой 135-летию со дня рождения К.М. Дерюгина «Океанография и биология арктических морей», Мурманск, 2013 г.

-Environmental Protection, Monitoring Systems & Oil Spill Contingency Focus Area (RU-NO Barents Project), Мурманск, 17 сентября 2013.

-CETIA meeting in Svanhovd, October 17-18, 2013 г.

-Workshop of Department of Arctic and Marine biology, Arctic University of Norway (Tromsø)-Sweden, april, 2014

-Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова. Биологический факультет, 24–27 декабря 2014 г.

-Международной научно-практической конференции «Охрана окружающей среды и здоровья человека в РФ и странах ЕС» г. Мурманск, МГТУ, 31 октября 2014 г.

-Международной научной конференции «Арктическое морское природопользование в XXI веке – современный баланс научных традиций и инноваций», Мурманск, ММБИ КНЦ РАН, 1-2 апреля 2015.

-VIII Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники», Уфа, 16-18 ноября 2015 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 19 работ из них – 3 в журналах из перечня ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из указателя сокращений и обозначений, введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит 31 рисунок, 10 таблиц, 3 приложения. Список литературы содержит 179 источников, в том числе 77 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность руководству ММБИ КНЦ РАН, директору института академику Г.Г. Матишову и заместителю директора д.б.н. П.Р. Макаревичу, глубокую признательность за всестороннюю помощь и рекомендации при написании работы научному руководителю, профессору кафедры гидробиологии Биологического факультета МГУ им. Ломоносова, д.б.н., Ильинскому В.В. и неформальному руководителю, заведующему лабораторией альгологии ММБИ КНЦ РАН д.б.н., профессору Воскобойникову Г.М. за всестороннюю поддержку и рекомендации при подготовке данной работы, а также доцентам кафедры Арктической и морской биологии Арктического университета Норвегии (Университет Тромсе) Ляймеру А.В., и Дж. Б. Йенсену за руководство работами, связанными с молекулярно-генетическим анализом бактериальных сообществ эпифитных бактерий. Отдельно автор благодарит за помощь и поддержку сотрудников лаборатории альгологии ММБИ КНЦ РАН д.б.н. Макарова М.В. и к.б.н. Рыжик И.В.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обосновывается актуальность темы, сформулированы цель и основные задачи настоящего исследования, новизна работы, ее теоретическая и практическая значимость, указаны основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе «Обзор литературы» представлена краткая история микробиологических исследований северных морей, проводится анализ степени изученности эпифитных бактериоценозов (в т.ч. углеводородокисляющих), проблемы выбора методик и подходов при проведении исследований этих объектов.

Видовой состав культивируемых ЭБ, обитающих на талломах морских макрофитов, был достаточно хорошо изучен на примере некоторых бурых водорослей - *Fucus vesiculosus*, *Chordaria flagelliphormis*, *Desmarestia viridis*, *Laminaria saccharina* (*Saccharina latissima*) и *L. hy-*

perborea, а так же на зеленой водоросли *Ulva rigida* и морской траве *Zostera marina* (Куриленко и др., 2001; Беленева, Жукова, 2006; Bolinches et al., 1988, Oberbeckmann et al., 2007 и др.).

В гетеротрофных эпифитных бактериальных сообществах, ассоциированных с *Fucus vesiculosus* и *Ulva rigida* из вод залива Ria de Arosa в Средиземном море, преобладающим родом бактерий является *Flavobacterium*, (Bolinches et al., 1988).

Представители этого рода также доминируют на талломах *Monostroma nitridium*, *Enteromorpha linza*, *Ascophyllum nodosum*, *Polifonia lanosa* и *Porphyra suborbiculata* (Chan, McManus, 1969).

Бактерии вступают в симбиотические отношения с водорослями, они преобразовывают сложные органические вещества (ОВ) в более простые, которые могут легко усваиваться водорослями (Atlas, Bartha, 1981). Так, например, было показано, что азотфиксирующие микроорганизмы, в состав которых входят цианобактерии, в летний период способны обеспечить до 10 % потребности ламинарии в азоте (Москвина, 1991).

Многие виды ЭБ продуцируют антибиотические вещества, препятствующие развитию других эпифитных организмов и противодействующие поселению на талломах бактерий других видов (Wiese et al, 2009). Таким образом, они контролируют развитие биообрастаний.

Роль макрофитов и эпифитных бактерий в процессах разрушения нефтепродуктов. Малоизученным остается вопрос об участии ЭБ в процессах разрушения НУ в пресноводных и морских экосистемах (Воскобойников и др., 2006). Показано, что в присутствии как морских, так и пресноводных макрофитов разрушение НУ в водной среде происходит значительно быстрее (Морозов, 2001; Воскобойников и др., 2006).

Предполагается, что ряд водорослей способны, помимо адсорбирования НУ на своей поверхности, утилизировать некоторые из них (Степаньян, Воскобойников, 2006). При исследовании макрофитов побережья Баренцева моря было установлено, что на пластинах ламинарии доминируют гетеротрофные бактерии, расщепляющие широкий спектр органических соединений, в том числе и НУ (Дмитриева, Дмитриев, 1996).

Доминирование определенных таксономических групп УОБ, обитающих, в том числе, и на поверхности водорослей, определяется, как правило, климатическими условиями, а также степенью загрязнения водной среды НУ и их составом (Гусев и др., 1978; Коронелли и др., 1994; Ильинский и др., 1998). При попадании НУ в среду обитания УОБ, эти организмы получают преимущество перед остальными группами бактерий, так как у них появляется дополнительный источник энергии, что при прочих благоприятных условиях способствует увели-

чению их численности (Воскобойников и др., 2008; Семенова и др., 2009). УОБ принимают активное участие в расщеплении НУ, поскольку включают их в свой метаболизм. При наличии в среде достаточного количества соединений азота и фосфора, они способны утилизировать НУ, образуя, в том числе, и вещества, которые в значительной степени стимулируют развитие самих водорослей. При этом снижается и токсический эффект этих поллютантов на водоросль (Wrabel, Peckol, 2000).

В главе 2 «Материалы и методы» представлена география района исследования и описаны методы и подходы, использованные в работе для достижения поставленной цели. Объектом изучения обозначены эпифитные бактериальные сообщества бурых водорослей *F. vesiculosus* L. (*Phaeophyta*), доминирующих на литорали северных морей и, согласно имеющимся данным (Воскобойников, 2006), обладающие высокой степенью устойчивости к НЗ.

Станции для отбора проб были расположены на литорали в трех акваториях: чистой (фоновой), вблизи сезонной биостанции ММБИ КНЦ РАН (губа Зеленецкая, 69°07'09" с.ш., 36°05'35" в.д.), и двух загрязненных, расположенных в районах Мурманского морского порта (Кольский залив, 68°58'00" с.ш., 33°05'00" в.д) и поселка Абрам-мыс (68°58' с.ш., 33°01' в.д.).

Для учета численности культивируемых гетеротрофных бактерий использовали метод предельных разведений (Руководство по методам ..., 1980) с применением жидких питательных сред.

Определение ОЧБ проводили на микроскопах ЛЮМАМ ИЗ (ЛЮМО) и Carl Zeiss Axio Imager 2 методом эпифлюоресцентной микроскопии с использованием красителя акридинового оранжевого (Ильинский, 1995; Ильинский, 2006).

Морфологические исследования с использованием трансмиссионной и сканирующей микроскопии проводили общепринятыми методами (Уикли, 1975).

Идентификацию выделенных штаммов УОБ проводили по культуральным, морфологическим и физиолого-биохимическим признакам (Практикум..., 1976), а также на основе генетического анализа их 16S рРНК, выполненного в ФГУП ГосНИИ Генетика - ВКПМ (г. Москва).

Работы по генетическому анализу некультивируемых эпифитных бактериоценозов фукусов проводили на кафедре молекулярной биологии Университета Тромсе (Норвегия) под руководством Ляймера А.В. и Дженсена Д. Б., они включали 2 этапа: 1. Выделение всей бактериальной ДНК (William, Helene Feil, Copeland, 2012) с поверхности водорослей; 2. Секвенирование следующего поколения – 454-секвенирование, GS FLX Titanium Series Lib-A Chemistry (Angel, Conrad, 2013). Секвени-

рование проводили в компании MacroGen Inc. (Южная Корея), по методике разработанной компанией Roche (Южная Корея).

Для обработки полученных данных применяли программы из пакета Microsoft Office 2003. Для определения таксономической принадлежности у полученных сиквенсов использовали ресурс NCBI/BLAST Assembled RefSeq Genomes (blast.ncbi.nlm.nih.gov) и The Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>), the SILVA rRNA database project (<https://www.arb-silva.de>).

В главе 3 «Результаты и обсуждение» представлены полученные в ходе выполнения исследований результаты, проводится их анализ, и на основании сравнения с имеющимися данными литературы, делаются выводы.

Раздел 3.1. Электронно-микроскопические исследования поверхности водорослей *F. vesiculosus* и эпифитных бактерий. У фукуса пузырчатого поверхность таллома неоднородна и не является гладкой (Рис., 1, А).

На ней имеются неровности, и трещины, которые позволяют микроорганизмам легче закрепиться. Количество бактерий в таких местах значительно больше, чем на ровных участках таллома.

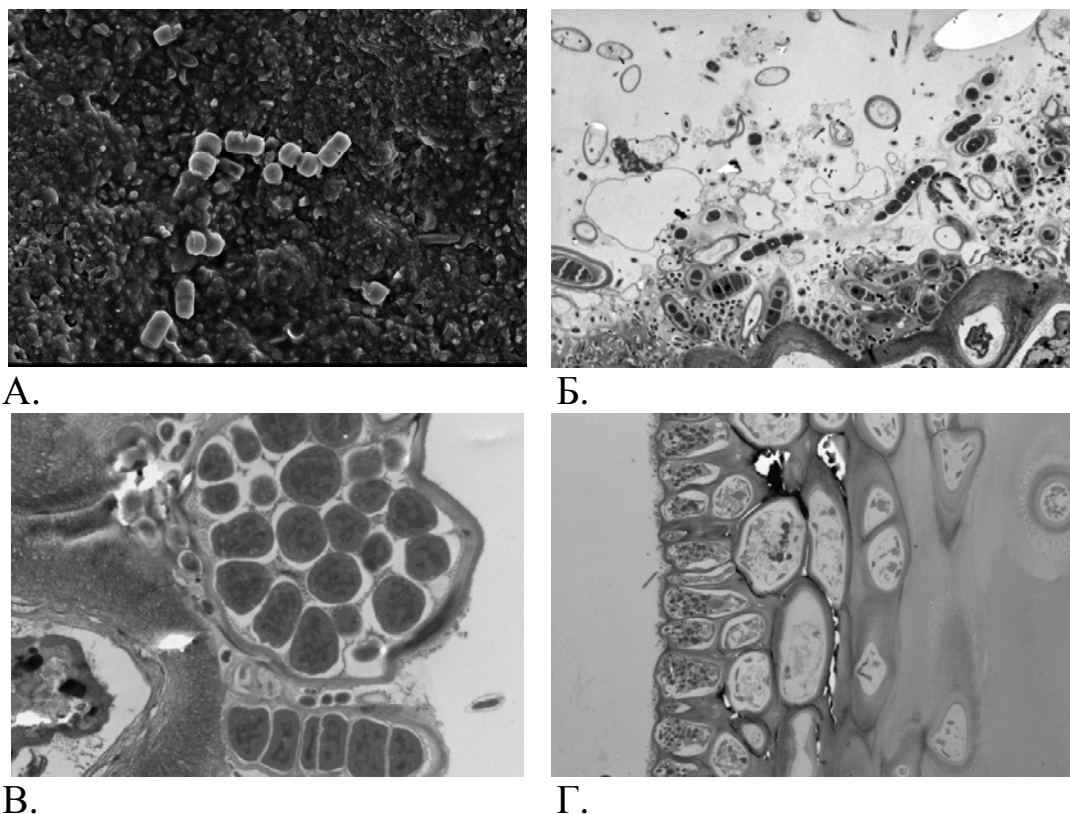


Рисунок 1. Электронно-микроскопические фотографии поверхности водорослей *F. vesiculosus*. Увеличение: А – x10000, Б – 4000, В- x16000, Г – x3000.

При значительном загрязнении водной среды (и водорослей) НУ, большая часть бактерий располагается непосредственно в слизистом

слое на поверхности талломов водорослей (Рис. 1, Б), либо концентрируется на пленке или под пленкой нефтепродуктов, адсорбирующейся на талломах фукуса и создающей дополнительные благоприятные условия для бактериальной колонизации. Помимо гетеротрофных бактерий, на поверхности водорослей в этом случае присутствует и большое количество цианобактерий (Рис. 9, Б, В). Отмечаются как одиночные клетки, так и цепочки. Обнаружены также их колониальные формы, представляющие собой «упакованные» мелкие (1 – 2 мкм) клетки, заключенные в единую оболочку (Рис. 1, В.). Характерной особенностью цианобактериальных сообществ водорослей, обитающих в акватории с ярко выраженным хроническим загрязнением НУ, является отсутствие гетероцист у колониальных форм.

На поверхности водорослей из чистых акваторий отмечено значительно меньшее количество гетеротрофных ЭБ, чем на водорослях из загрязненных НУ районов (Рис. 1, Г). Колоний и отдельных клеток цианобактерий при этом не отмечалось.

Раздел 3.2. На начальном этапе работ был проведен **сравнительный анализ трех жидких сред** для учета эпифитных сапротрофных бактерий (СБ), имеющих **разное содержание лабильного органического вещества (ОВ)**: неразбавленного рыбопептонного бульона (РПБ 100%), РПБ (10 %) и среды Зобелла (см. Главу 2. Методы и материалы). При посеве суспензии клеток ЭБ на РПБ (100%) выросло большее количество бактерий, чем на РПБ (10%), соответственно до 25000 кл/мл и только до 2400 кл/мл. Однако максимальное количество клеток эпифитных СБ (до 65000 кл/мл), давало рост на среде Зобелла.

Нами был проведен **сравнительный анализ разных методов удаления ЭБ с поверхности талломов фукуса**. Для этого брали фрагменты из средней части талломов одного и того же растения.

Было опробовано 5 разных вариаций методов десорбции ЭБ:

1. Ультразвуковая обработка (УЗ-обработка), ее проводили с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-1А. Время обработки – 1 мин, ток 0,4 А, частота – 22 кГц.
2. Обработка талломов на миксере-диспергаторе (IKA ULTRA-TURRAX Tube Drive (Германия). Для обработки была выбрана максимальная интенсивность работы прибора, ее продолжительность составила 1 мин.
4. Обработка талломов на вортексе (Reax Top Vortex Mixer/Shaker). Режим обработки – максимальный, время обработки – 5 мин.
5. Обработка талломов ватными аппликаторами.

Сравнение эффективности разных методов удаления эпифитных СБ с поверхности фукуса показало, что наиболее эффективными явля-

ется метод с применением ватных аппликаторов (Табл. 1). В этом случае их численность при учете достигала максимальной величины – более 7 млн. кл/см².

Таблица 1.

Максимальные значения численности эпифитных бактерий, удаленных с поверхности талломов фукуса.

| Метод | Численность эпифитных бактерий (кл/см ²) |
|-------------------------------------|--|
| Ультразвук | Около 752800 |
| Миксер-диспергатор IKA ULTRA-TURRAX | Около 1071360 |
| Мешалка Vortex | Около 5062940 |
| Ватные аппликаторы | Около 7054720 |

Использование ватных аппликаторов, является наиболее щадящим по отношению к бактериальным клеткам, и, в отличие от применения ультразвука или мешалки – диспергатора позволяет сохранить целостность клеток и их жизнеспособность.

Поэтому данный метод был использован нами при дальнейших исследованиях, связанных с определением численности ЭБ на талломах макрофитов и таксономической структуры эпифитных бактериоценозов.

Раздел 3.3. Количественное распределение сапротрофных культивируемых бактерий на поверхности талломов водорослей.

Анализ апикальной, центральной частей и основания таллома фукуса, взятого из незагрязненной НУ акватории показал, что количество эпифитных СБ увеличивается от верхушечной части таллома к его нижней части. Максимальная численность СБ была обнаружена в нижней части таллома фукуса, она колебалась в различные сезоны года от 9926 до 14304 кл/см². В верхушечной части таллома фукуса наиболее вероятное число (НВЧ) культивируемых бактерий составляло 248 – 1464 кл/см², а в центральной части таллома - от 1453 до 11137 кл/см² (Рис.2).

Причины подобного количественного распределения СБ по поверхности таллома *F. vesiculosus* заключаются в особенностях его роста. Для фукусовых водо-

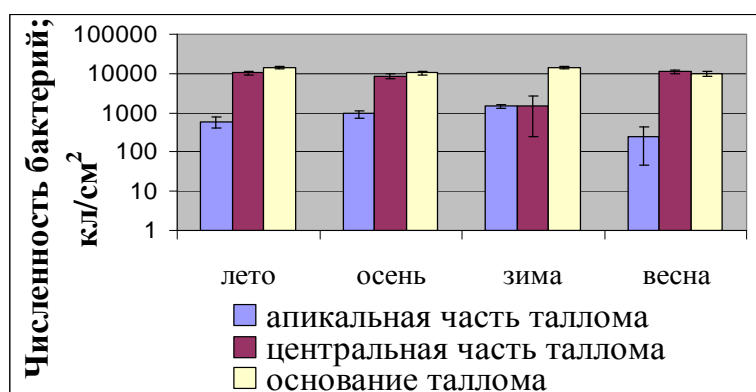


Рисунок 2. Изменение наиболее вероятного числа культивируемых эпифитных бактерий в различные сезоны года.

рослей характерен апикальный рост, который осуществляется за счет апикальной меристематической ткани (Камнев, 1989). Минимальное количество эпифитных СБ в этой части таллома можно объяснить тем, что в период роста на этих участках фукус выделяет бактериостатические или бактерицидные вещества (Mikulski, 1982). В нижней же части таллома фукуса происходит затухание скорости его метаболической активности и наблюдается распад листовидной структуры, что способствует выделению ОВ, которые могут служить пищевыми субстратами для СБ. По этой причине именно здесь и наблюдается их наибольшая численность. Учитывая высокую погрешность метода предельных разведений можно заключить, что сезонные изменения численности эпифитных СБ на одних и тех же участках талломов фукусов из губы Зеленецкой были невелики и составляли менее одного порядка.

На фукусе из загрязненной НУ акватории (Мурманский порт) количество эпифитных СБ многократно превышало таковое на фукусе из чистой акватории – губа Зеленецкая (Рис. 3).

При этом у фукусов из обоих этих местообитаний был отмечен сходный характер количественного распределения бактерий по таллому.

Максимальная численность сапротрофных эпифитных СБ на поверхности фукуса из акватории Морского порта превышала 17 млн. кл/см² и была обнаружена в нижней части таллома. Минимальное количество этих бактерий

отмечено в верхушечной части таллома фукуса – около 2 млн. кл/см².

Количество УОБ на талломе фукуса из акватории МП было на два – три порядка меньше, чем сапротрофных бактерий и колебалось от 9,5 тысяч кл/см² до 17,4 тысяч кл/см². Максимальное количество УОБ в этом случае было обнаружено также на нижнем участке таллома, минимальное – на верхушечном.

УОБ на поверхности талломов фукусовых водорослей, отобранных из чистой акватории, обнаружить не удалось. Возможно, что их

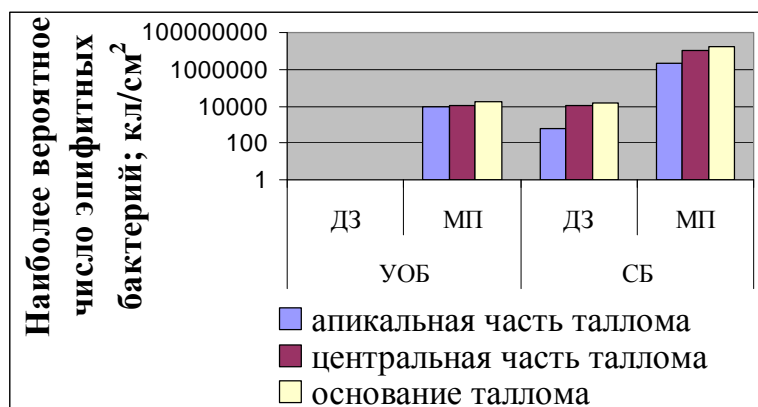


Рисунок 3. Сравнение наиболее вероятного числа эпифитных сапротрофных (СБ) и углеводородокисляющих (УОБ) бактерий на фукусе из акватории Мурманского морского порта (МП), загрязненного нефтепродуктами, и из чистой акватории вблизи пос. Дальние Зеленцы (ДЗ).

численность оказалась ниже чувствительности использованного метода ее определения – 10 кл/мл смыва с поверхности водорослей.

Раздел 3.4. Для определения углеводородокисляющей активности ЭБ, ассоциированных с водорослями *F. vesiculosus*, были проведены лабораторные эксперименты. При этом были поставлены следующие задачи: 1. Определить способность углеводородокисляющих ЭБ, удаленных с поверхности талломов водорослей к деструкции НУ (Дизельное топливо (ДТ) летнее). 2. Сравнить способность к разрушению НУ ЭБ, удаленных с поверхности талломов водорослей из чистых и загрязненных нефтепродуктами морских вод.

В результате проведенных экспериментов было установлено:

1. ЭБ фукуса способны к деструкции дизельного топлива (ДТ) в условиях лабораторного эксперимента. Максимальное его потребление бактериями фукуса из загрязненной НУ акватории за 3 недели экспозиции составило до 57 % от исходно внесенного количества ДТ. В контроле без фукусовых водорослей за это время разрушалось не более 18% внесенного в среду ДТ.

2. ЭБ, удаленные с талломов фукусов из загрязненной и незагрязненной НУ акваторий потребляли в целом примерно одинаковое количество ДТ (до 57% и до 53% соответственно). Незначительная разница между двумя этими вариантами опыта может объясняться тем, что УОБ входят в состав ЭБ фукусов не только из загрязненной, но и из чистой акватории, разница имеется только в их количестве, которое первоначально было выше в первом случае, чем во втором. Однако, к концу данного, достаточно продолжительного эксперимента, численность УОБ на поверхности фукуса из незагрязненного местообитания, вероятно, увеличилась настолько, что количество ДТ, потребленного ими, сравнялось с таковым, утилизированным УОБ фукусов из загрязненного местообитания. Таким образом, экспериментально наглядно удалось показать, что ЭБ, обитающие на талломах фукусов как из загрязненных, так и из чистых акваторий, способны к деструкции НУ в условиях лабораторного эксперимента.

Визуальные наблюдения за пленкой НУ на поверхности среды в экспериментальных сосудах показали, что эпифитные УОБ, десорбированные с поверхности талломов фукусов из загрязненной НУ акватории оказались способны удалить эту пленку с поверхности среды значительно быстрее, чем ЭБ с талломов фукуса из незагрязненной НУ акватории.

Полученные результаты позволили нам предположить непосредственное участие эпифитных УОБ фукуса в процессах естественного очищения вод от нефтяных загрязнений, попавших в акваторию с зарослями фукусовых водорослей.

Для определения роли бактериально-водорослевой ассоциации (БВА), состоящей из талломов *F. vesiculosus* и ассоциированных с ними ЭБ в процессах биodeградации НУ, а также для оценки общей эффективности этой ассоциации в биodeградации НУ, нами были проведены специальные лабораторные эксперименты. При этом мы учитывали, что в биodeградации НУ скорее всего принимают участие не только ЭБ, но и водоросли-макрофиты, которые являются субстратом для обитания этих ЭБ и, вероятно, создают условия для их развития. В ходе этих экспериментов еженедельно определяли содержание ДТ в воде экспериментальных сосудов, численность по посеву эпифитных УОБ, интенсивность фотосинтеза (ИФ) и метаболическую активность клеток (МАК) талломов *F. vesiculosus*.

Определение физиологического состояния водорослей показало, что превышение ПДК нефтепродуктов в среде (до 20 раз) не оказывает ингибирующего действия на физиологическую активность фукусов, и даже может оказывать стимулирующий эффект.

Учет численности углеводородокисляющих бактерий. Присутствие ДТ в опытных сосудах приводило к возрастанию численности эпифитных УОБ на талломах фукусов по сравнению с контролем без ДТ (Рис. 4).

Численность УОБ в контрольных сосудах тоже постепенно возрастала в ходе эксперимента, однако в значительно меньшей степени. При оценке полученных результатов необходимо учитывать, что экспериментальные и опытные емкости представляли собой закрытые системы, поэтому в процессе эксперимента количество УОБ на талломах *F. vesiculosus* могло постепенно увеличиваться за счет накопления в

среде продуктов метаболизма данного макрофита. Ранее было показано (Хайлов, 1971), что макроводоросли, за счет выделения метаболитов, доступных для микробной утилизации могут создавать вокруг себя благоприятную среду для развития микроорганизмов (в том числе и УОБ), при этом формируя и контролируя их видовой состав. Известно также, что микробное окисление НУ может приводить к значительному снижению

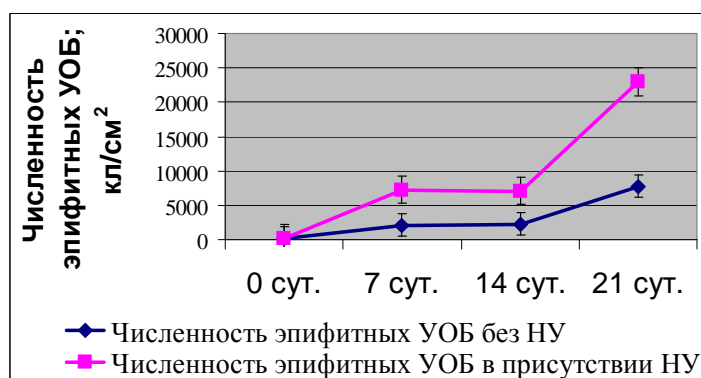


Рисунок 4. Изменение численности эпифитных углеводородокисляющих бактерий в морской воде в присутствии нефтяных углеводородов и без них.

токсического эффекта НП на макрофиты, а выделение в среду метаболитов микроорганизмов может стимулировать развитие самих водорослей (Wrabel, Peckol, 2000).

Определение содержания нефтепродуктов. К концу эксперимента содержание ДТ в сосудах, как с фукусами, так и без них, значительно уменьшалось (Рис. 5).

В присутствии фукусов НУ наиболее активно разрушались в первую неделю эксперимента, при этом их содержание в воде снижалось почти на 50% по сравнению с контролем без фукусов, затем скорость этого процесса заметно падала и на 14-й день опыта остаточные количества ДТ в опытных сосудах с фукусами уже не отличались от таковых в контрольных и в дальнейшем практически не изменялись. В сосудах без растений в первую неделю опыта содержание НУ уменьшалось только на 20 – 25%, а через 14 сут. – на 80% и далее не изменялось.

Таким образом, наиболее эффективно удаление ДТ из экспериментальных сосудов происходит в течение первых семи дней после внесения ДТ.

Можно полагать, что это происходит в первую очередь за счет его утилизации эпифитными УОБ фукуса при непосредственном участии также и самого макрофита. На это указывает большая разница между содержанием ДТ в опытных и контрольных сосудах, составляющая почти 50%. Что касается контрольных сосудов без фукусов, то ДТ из них удаляется исключительно за счет испарения фракции летучих углеводородов, входящих в состав ДТ.

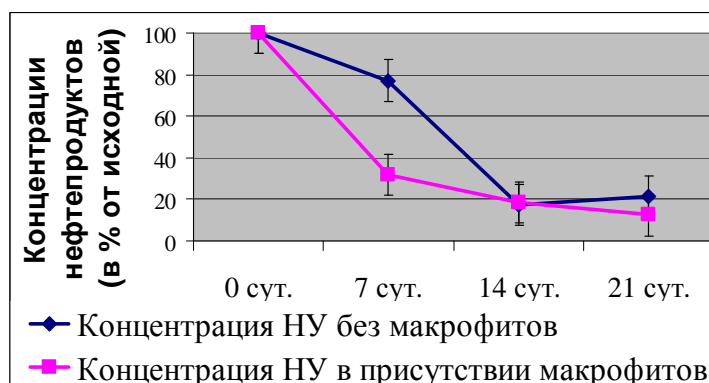


Рисунок 5. Изменение концентрации нефтепродуктов в экспериментальных сосудах в присутствии фукуса и без него.

Раздел 3.5. Влияние нефтяного загрязнения на численность и таксономический состав гетеротрофных бактерий, обитающих в воде и на талломах фукусов губы Зеленецкой. Исследование этих сообществ гетеротрофных бактерий было проведено в губе Зеленецкой в летний период времени. Пробы фукусов отбирали на загрязненной НУ станции, расположенной в районе причала, где находилось недавно затонувшее судно, из которого наблюдалось постоянное поступление ДТ в воду. Содержание НУ в воде возле причала составило 0.26 мг/л (в 5 раз выше ПДК), а на удалении более 500 м от него содержание НУ сни-

жалось до 0.04 мг/л. В качестве фоновой, чистой станции для отбора проб нами был выбран участок литорали, находящийся на значительном удалении от упомянутого выше источника загрязнения.

Общая численность бактерий по прямому счету в воде и на талломах фукуса. Значения ОЧБ, обнаруженные нами в пробах воды, взятых на обеих станциях в бухте Зеленецкой, оказались сходными ($(4.91 - 5.51) \times 10^6$ кл/мл). В целом, они оказались вполне сопоставимыми с данными литературы для прибрежных морских вод (Теплинская, 1990; Ильинский, 2000).

Общая численность ЭБ фукусов, взятых на загрязненной станции составила $(3.86 - 4.93) \times 10^7$ кл/см². Она оказалась примерно в 3 раза выше, чем на фукусе из чистого местообитания $(1.42 - 1.48) \times 10^7$ кл/см².

Численность по посеву сапротрофных и углеводородоксиляющих бактерий в пробах воды и на талломах фукусов. Количество как СБ, так и УОБ в загрязненных и незагрязненных НУ водах губы оказалась примерно одинаково и составило 1200 – 5000 кл/мл для СБ и 50 – 120 кл/мл для УОБ соответственно.

Численность СБ на поверхности макрофитов, отобранных в загрязненном НУ участке губы, была более чем на два порядка выше (≥ 432000 кл/см²), чем на водорослях, отобранных на чистом участке акватории (≥ 1900 кл/см²).

Сходная картина наблюдалась и для эпифитных УОБ - их количество на талломах фукуса из загрязненного района причала оказалась более чем на порядок выше (≥ 1500 кл/см²), чем на водорослях, отобранных на удалении от него (≥ 120 кл/см²).

Численность СБ в воде и на фукусах, взятых на чистой и грязной станциях существенно превосходила количество УОБ в этих же местообитаниях, что является вполне естественным, поскольку далеко не все СБ способны к окислению НУ. При этом если на чистой станции численность эпифитных СБ превышала таковую УОБ примерно на порядок, то на фукусах из загрязненной акватории эта разница увеличивалась уже более чем на два порядка. Причины этого явления, скорее всего, связаны с резкими перестройками в составе эпифитного бактериоценоза фукусов из загрязненной акватории и требуют дальнейших исследований.

Таким образом, численность эпифитных СБ, в состав которых входят и УОБ, существенно возрастает на фукусах со станции в районе причала, подверженной загрязнению НУ. На этот участок акватории бухты также влияет береговой сток, обусловленный пресноводными ручьями, что также может быть причиной возрастания чис-

ленности на фукусах ЭБ обеих групп. При этом на количестве бактерий в воде этой станции присутствие НУ сказывается в гораздо меньшей степени, чем на численности ЭБ на талломах фукуса. Возможно, это связано с аккумуляцией НУ на поверхности талломов фукуса, что делает эти поллютанты более доступными для обитающих на них ЭБ и способствует росту их обилия.

Определение таксономической принадлежности культивируемых эпифитных углеводородокисляющих бактерий. На основании физиолого-биохимического и морфологического анализов все выделенные нами из воды и с талломов фукусов штаммы УОБ были разделены на группы. Из каждой группы затем было выбрано по одному наиболее характерному и массовому представителю для точного установления его таксономической принадлежности на основании анализа 16S рРНК.

В результате проведенных исследований эти штаммы были отнесены к четырем видам трех разных родов. Из них бактерии, отнесенные к видам *Pseudomonas fluorescens* и *Ochrobactrum anthropi* были отмечены только на фукусах как из чистого, так и из загрязненного НУ участка. Эти виды, возможно, обладают специфичной избирательностью к фукусу пузырчатому. Представители вида *Rhodococcus fascians* встречались как в воде, так и на поверхности талломов фукусов в загрязненном НУ районе губы Зеленецкой. Ранее в литературе уже отмечалась приуроченность микроорганизмов этого рода к местообитаниям, хронически загрязненным НУ (Коронелли и др., 1994). Бактерии вида *Pseudomonas guinea* встречались только на чистой станции, причем как на талломах фукуса, так и в воде вблизи его зарослей.

В литературе имеются данные, что именно псевдомонады составляют от 60 до 90% культур УОБ, выделенных из незагрязненных вод (Коронелли и др., 1994) и могут являться обычными компонентами углеводородокисляющего микробного сообщества (Перетрухина, 2006). В нашем случае доля *Pseudomonas fluorescens* от общего числа выделенных штаммов составляла 49 %, а *Pseudomonas guinea* – 9%.

Что касается УОБ, принадлежащих к роду *Ochrobactrum*, то ранее из вод Баренцева моря бактерий этого рода еще не выделяли. Один из видов данного рода, *Ochrobactrum anthropi* МРЗ, известен своей высокой углеводородокисляющей активностью, а также как активный продуцент экзополисахаридов, обладающих сильным эмульгирующим действием по отношению к ДТ (Ramasamy et al., 2014).

Таким образом, в ходе работ нами были выделены только 4 вида УОБ, способных к росту на питательных средах, которые принадлежали к трем родам. Поэтому можно было с уверенностью полагать, что ос-

новная часть углеводородокисляющего микробного ценоза как водорослей-макрофитов, так и морских вод, представляет собой некультивируемые формы микроорганизмов (ZoBell, 1946), для изучения таксономического состава которых требуются совсем иные подходы.

3.6. Таксономическая структура некультивируемых эпифитных бактериальных сообществ фукусов из трех местообитаний с разным уровнем загрязнения вод. В результате типирования нуклеотидных последовательностей, принадлежащих ЭБ бурых водорослей *F. vesiculosus* из акваторий с разным уровнем загрязнения, с использованием метода секвенирования нового поколения (NGS) было идентифицировано 232 OTU (оперативных таксономических единицы), прочитано 10849 нуклеотидных последовательностей, из них 1575 – для губы Зеленецкой (ДЗ), 4001 – для Морского порта в районе Мурманского морского вокзала (МП) и 5258 – для акватории вблизи Абрам-мыса (АМ).

Согласно результатам типирования нуклеотидных последовательностей, принадлежащих сообществу ЭБ фукуса, было обнаружено, что они принадлежат микроорганизмам 82-х родов, 16 классов и 11 типов, среди последних присутствовали: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *TM7* (Candidatus Saccharibacteria), к отдельному 11-му типу были отнесены нуклеотидные последовательности, принадлежащие неидентифицированным бактериям (*Unclassified_Bacteria*) (Рис. 6).

На фукусах из акватории ДЗ были обнаружены только 5 из упомянутых выше 11-ти типов эпифитных бактерий: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, и еще один тип, который содержал незначительное количество неклассифицированных бактерий. При этом, независимо от места отбора материала для исследований, в бактериоценозах ЭБ из всех трех местообитаний доминировали бактерии двух типов - *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*.

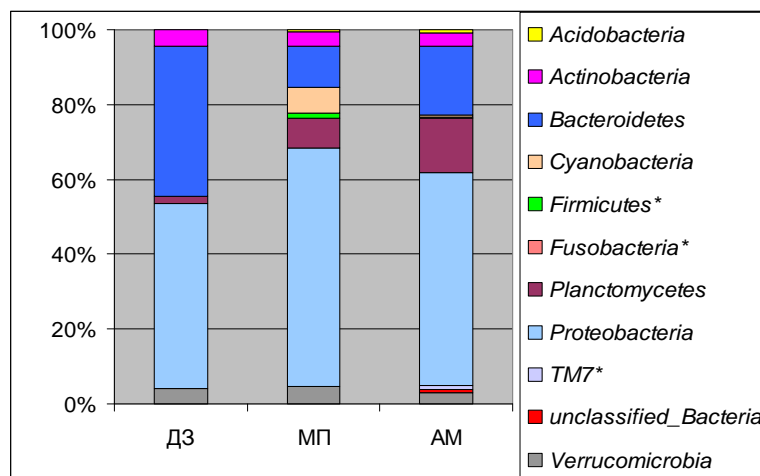


Рисунок 6. Доминирующие типы эпифитных бактерий водорослей *F. vesiculosus* из трех различных по степени загрязнения нефтяными углеводородами акваторий. * – доля бактерии данной группы может составлять менее 0,1%.

Таким образом, наименьшее разнообразие сообщества ЭБ водорослей *F. vesiculosus* наблюдалось в чистой от нефтепродуктов губе Зеленецкой (ДЗ). Это может быть обусловлено более узким по сравнению с двумя другими акваториями спектром присутствующих в ней органических субстратов, доступных для гетеротрофных бактерий. Среди нуклеотидных последовательностей бактерий, присутствующих в данной акватории, отмечены представители 28 родов, относящиеся к 8 классам и 5 типам: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*. Основными доминантами среди них были представители типов *Proteobacteria* (49,21%) и *Bacteroidetes* (40,13%) (Рис. 7).

Известно, что бактерии типов *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* являются обычным компонентом эпифитных бактериальных сообществ некоторых морских макрофитов в незагрязненных районах мирового океана (Коронелли, 1996, Ильинский, 2006, Burke et al., 2011; Tujula et al., 2010).

Среди ЭБ фукусов из акваторий МП и АМ, доминировали протеобактерии (63,72% и 56,93% соответственно), наряду с ними была отмечена большая доля представителей типа *Bacteroidetes* (11,10% и 18,45% соответственно). Значительную часть бактериоценоза фукуса пузырчатого из загрязненной нефтепродуктами акватории МП составляли цианобактерии (Рис. 7).

В смывах с талломов фукусов, отобранных из акваторий АМ и МП, среди прочих были обнаружены нуклеотидные последовательности, принадлежащие к группе ТМ7. Доля этих нуклеотидных последовательностей от общего их количества составила 0,025% и 1,045% соответственно.

Таксономическая структура прокариотных представителей эпифитных сообществ *F. vesiculosus* из прибрежных акваторий губы Зеленецкой. Среди ЭБ группы *Bacteroidetes* доминировали представители классов *Flavobacteria* (36,13 %) и *Sphingobacteria* (4,00 %) (Рис. 7).

Флавобактерии в основном, были представлены родами *Ulvibacter* (11,43%), *Maribacter* (10,64%) и *Cytophaga* (10,22%). Входящие в эти таксоны бактерии хорошо известны как обитатели поверхностей пресноводных и морских макрофитов и микроводорослей, кроме того, их представители часто образуют ассоциации со взвешенным ОВ (Bolinches et al., 1988). Также среди ЭБ фукусов губы Зеленецкой были обнаружены представители

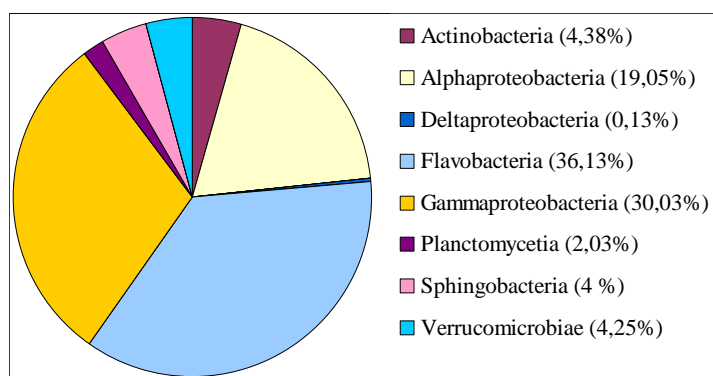


Рисунок 7. Классы эпифитных бактерий водорослей *F. vesiculosus* из губы Зеленецкой.

ЭБ фукусов губы Зеленецкой были обнаружены представители родов *Aquimarina* (0,19%), *Flaviramulus* (0,06%), *Leeuwenhoekella* (0,25%), *Persicivirga* (1,46%), *Winogradskyella* (0,38%) и незначительное количество неклассифицированных флавобактерий.

Основное количество протеобактерий, было представлено классами *Gamma*протеобактерий (30,03%) и *Alphaproteobacteria* (19,05%) (Рис. 8).

Большинство представителей гамма-протеобактерий входило в состав трех родов *Arenicella* (14,16%), *Granulosicoccus* (9,08%) и *Psychrobacter* (5,21%), а альфа-протеобактерий – в состав родов *Octadecabacter* (7,43%) и *Hellea* (10,10%). Дельта-протеобактерий было значительно меньше, а бета-протеобактерий вообще не было обнаружено. Доля бактерий еще трех типов – *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* и *Actinobacteria*, в совокупности составляла около 10,5 % от всего состава эпифитного бактериоценоза.

Таксономическая структура прокариотных представителей эпифитных сообществ *F.vesiculosus* из акватории Мурманского морского порта. Для всей акватории Кольского залива в целом характерен высокий уровень антропогенной нагрузки. Особенно сильно это проявляется в южном и среднем коленах, где находились две исследованные нами станции - МП и АМ. По нашим данным, в зоне хронического загрязнения на литорали МП содержание НУ достигало 1,2 мг/л.

На собранных здесь фукусах преобладали ЭБ из группы *Proteobacteria*. Они составляли более половины всего бактериального эпифитного сообщества (63,72%).

Среди протеобактерий были обнаружены представители 4-х классов: *Alphaproteobacteria* (17,63%), *Betaproteobacteria* (0,42%), *Gamma*протеобактерий (45,51%), *Deltaproteobacteria* (0,15%). Доминировали представители гамма-протеобактерий и альфа-протеобактерий (Рис. 8).

Важно отметить, что 32 % от всего бактериального сообщества составляли представители только одного рода *Acinetobacter*. В литературе акинетобактерии ранее были описаны

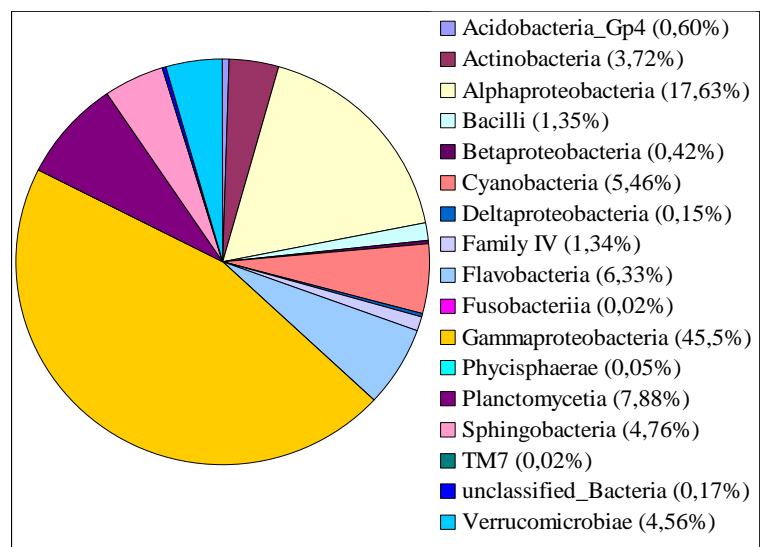


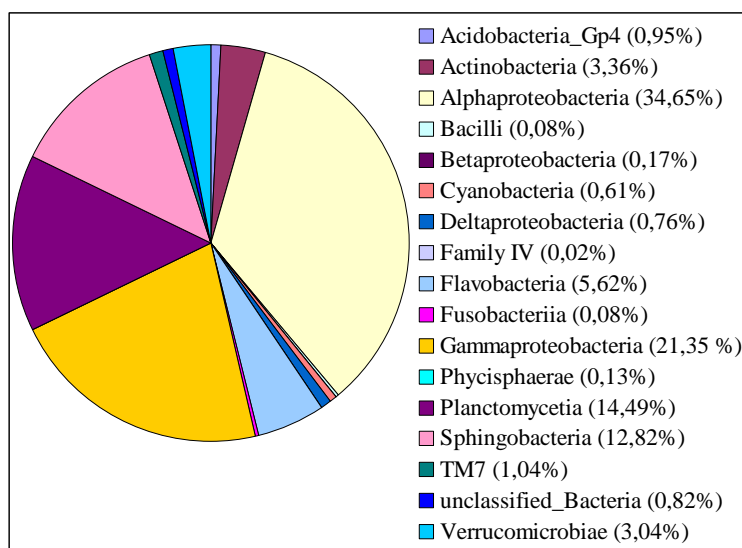
Рисунок 8. Классы эпифитных бактерий водоросли *F. vesiculosus* из района Мурманского морского порта.

как наиболее часто встречающиеся в загрязненных НУ акваториях (Корнелли, 1996, Ильинский, 2006). Кроме того известно, что представители этого рода способны к утилизации тяжелых фракций нефти и с различной степенью интенсивности могут разлагать сырую нефть (Hanson et al., 1997; Yu Chen et al., 2014).

Далее по убыванию численности следовали бактерии трех типов - *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* (7,93%), *Actinobacteria* (4,38%) и *Verrucomicrobia* (4,56%).

Таксономическая структура (классификация) прокариотных представителей эпифитных сообществ *F.vesiculosus* из акватории вблизи пос. Абрам-мыс. На фукусах из этой акватории были обнаружены те же основные типы ЭБ, что и на фукусах из акватории МП, при этом доминировали также представители протеобактерий. Однако, в отличие от МП, где преобладали гамма-протеобактерии, на водорослях, обитающих в акватории АМ, значительная часть сообщества ЭБ была представлена альфа-протеобактериями (34,65%). Доля гамма-протеобактерий составляла 21,35 % (Рис. 9).

Довольно большой (18,45 %) была и доля ЭБ типа *Bacteroidetes*, характерного также и для губы Зеленецкой. Среди них обнаружены представители флавобактерий таких как *Maribacter* (3,19%) и других, а также сфингобактерий – *Haliscomenobacter* (9,19%), *Lewinella* (1,03%).



Цианобактерий в составе сообщества ЭБ фукусов из акватории АМ было меньше, чем в составе ЭБ фукусов из акватории МП - 0,61% против 5,46% (Рис. 8, 9).

Рисунок 9. Классы эпифитных бактерий водоросли *F. vesiculosus* из акватории вблизи пос. Абрам-мыс.

В Заключение обобщены полученные данные о количественном, качественном и таксономическом составе некультивируемых и культивируемых эпифитных бактериоценозов фукусовых водорослей из чистых и загрязненных НУ прибрежных акваторий Баренцева моря. Проведенный критический анализ различных методов наряду с их апробацией в лабораторных и полевых условиях позволил выбрать наиболее репрезентативный способ удаления ЭБ, позволяющий сохранить их

жизнеспособность. Хотя ранее таксономическая структура морских ЭБ, обитающих на талломах макрофитов уже была исследована на примере отдельных представителей бурых водорослей, до сих пор нет информации о том, как меняются эпифитные бактериальные сообщества макрофитов в условиях НЗ. Использование молекулярно-генетических методов позволило с помощью анализа 16S рРНК идентифицировать доминирующих представителей культивируемых планктонных и эпифитных УОБ, а также впервые описать таксономическую структуру некультивируемого эпифитного бактериального сообщества фукусов из различных по степени загрязнения акваторий Баренцева моря.

Использование комплекса современных методов исследования, включая электронную микроскопию, позволило выявить закономерности в распределении культивируемых бактерий по поверхности таллома водорослей. Характер распределения объясняется физиологическими характеристиками различных участков таллома. Несомненное влияние на распределение ЭБ оказывает также и структура его поверхности, что было показано нами с использованием трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.

Результаты проведенных лабораторных экспериментов позволяют утверждать, что бактериально – водорослевая ассоциация обладает более высоким потенциалом в отношении деструкции НУ по сравнению со свободноживущими планктонными формами бактерий. ЭБ принимают активное участие в биологической деструкции НУ, при этом они могут успешно адаптироваться даже к высокому уровню нефтяного загрязнения среды. Важную роль в этой ассоциации играют также и сами фукусовые растения: нами было установлено, что в присутствии фукусовых водорослей разрушение НУ происходит быстрее, чем в присутствии только ЭБ без фукусов.

Полученные нами данные позволяют приблизиться к пониманию роли симбиотических ассоциаций водорослей – макрофитов и ЭБ в процессах естественного очищения водной среды от НЗ и могут способствовать созданию новых и модернизации уже существующих технологий очистки от НЗ прибрежных зон Мирового океана.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что метод удаления эпифитных бактерий с талломов бурых водорослей *Fucus vesiculosus* с помощью ватных аппликаторов является наиболее эффективным. Он позволяет получать достоверные данные при количественном учете культивируемых и некультивируемых форм бактерий и таксономическом анализе бактериоценозов.

2. Количества бактерий на поверхности талломов фукусов из загрязненной нефтепродуктами акватории значительно превышали тако-

вые на фукусах, отобранных в незагрязненных водах. При этом, во всех случаях, на поверхности таллома фукуса численность сапротрофных бактерий на два три порядка превышала таковую углеводородокисляющих.

3. Распределение эпифитных бактерий по поверхности таллома *F. vesiculosus* неравномерное. Численность культивируемых сапротрофных и углеводородокисляющих бактерий на поверхности *F. vesiculosus* увеличивается по направлению от апикальной части таллома к нижней, наиболее старой его части.

4. При сравнении углеводородокисляющей активности эпифитных бактериоценозов фукусов, извлеченных из загрязненной и чистой акваторий, между ними не обнаружено значимой разницы в количествах потребляемых углеводов дизельного топлива. Это может объясняться высокой адаптивной способностью эпифитных бактериоценозов фукуса к условиям нефтяного загрязнения.

5. Экспериментально показано, что в присутствии фукусовых водорослей нефтяные углеводороды наиболее активно разрушаются в первую неделю, при этом их концентрация снижается на 60 – 70%. В отсутствие водорослей концентрация НУ в воде за этот срок уменьшается только на 20 – 25%.

6. Доминирующими видами культивируемых эпифитных углеводородокисляющих бактерий фукусовых водорослей из акваторий с разным уровнем нефтяного загрязнения, определенными на основании анализа 16S рРНК, были *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas guinea*, *Ochrobactrum anthropi*, *Rhodococcus fascians*.

7. В составе эпифитных бактериоценозов фукусовых водорослей из различных по степени загрязнения нефтепродуктами акваторий идентифицировано 82 рода бактерий, которые относились к 16 классам и 10 типам, а также 20 неклассифицированных родов. В число 10 идентифицированных типов вошли *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* и представители группы ТМ7.

8. Наименьшее разнообразие эпифитного бактериального сообщества наблюдалось на фукусах из незагрязненной губы Зеленецкой. Среди них идентифицировано 5 типов, 8 классов и 28 родов, при этом доминировали представители типов *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*) и *Bacteroidetes* (*Sphingobacteria* и *Flavobacteria*). На фукусах, из акватории с самым высоким уровнем нефтяного загрязнения превалировали бактерии типа *Proteobacteria* (>63%) с доминированием рода *Acinetobacter* (32% от всего бактериоценоза). В умеренно загрязненной нефтепродуктами акватории поселка Абрам-мыс отмечено максимальное количество

родов (66), доминировали также представители типа *Proteobacteria*, среди них большинство (35 %) составляли альфапротеобактерии.

9. Эпифитные бактериоценозы фукусовых водорослей способны к утилизации нефтяных углеводородов, успешно выдерживают их высокие концентрации в водной среде и потому способны вносить значимый вклад в процессы деструкции нефтепродуктов в прибрежных морских акваториях полярных и умеренных широт.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях из перечня ВАК РФ:

1. Ильинский В.В., Воскобойников Г.М., Пуговкин Д.В., Комарова Т.И., Адейкина А.А. Влияние нефтяного загрязнения среды на состав и численность гетеротрофных эпифитных бактерий бурой водоросли *Fucus vesiculosus* // Вестник Южного научного центра РАН. – 2010. – Т. 6, № 2. – С. 98–100.

2. Воскобойников Г.М., Пуговкин Д.В. О возможной роли *Fucus vesiculosus* в очистке прибрежных акваторий от нефтяного загрязнения // Вестник МГТУ. – 2012. – Т. 15, В. 4. – С. 716–720.

3. Пуговкин Д.В., Ляймер А.В., Йенсен Дж.Б. Эпифитные бактериальные сообщества водорослей *Fucus vesiculosus* в разных по степени загрязнения нефтепродуктами акваториях Баренцева моря // Доклады академии наук. – 2016. – Т. 471, № 3. – С. – С. 371–373.

Другие публикации:

4. Перетрухина А.Т., Пуговкин Д.В., Волков И.Н. Исследования психрофильных бактерий в воде Баренцева моря // Биотехнология, экология, охрана окружающей среды. Сборник научных трудов под ред. проф. Садчикова А.П., д.б.н. Котелевцева С.В. – М.: Изд-во ООО Графикон-принт. 2005. – С. 218–220.

5. Пуговкин Д.В., Перетрухина А.Т. Исследование дрожжевых и плесневых грибов в воде Баренцева моря и рыбном сырье // Материалы II Международной научно-практической конференции "Современные научные достижения-2006". – Днепропетровск: Наука и образование, 2006. – Т. 20. – С. 47–51.

6. 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. Материалы международной конференции. – Мурманск, 2008. – С. 63–65.

7. Пуговкин Д.В. Эпифитные углеводородокисляющие бактерии бурых водорослей Баренцева моря. // Материалы XXVII конф. молодых ученых Мурманского морского биологического института (г. Мурманск, май 2009). – Мурманск: Изд. ММБИ КНЦ РАН, 2009. – С. 154–161.

8. **Пуговкин Д.В.** Особенности распределения бактерий на различных участках талломов бурых водорослей. Материалы XXVIII конференции молодых ученых Мурманского морского биологического института «Гидробиологические и экосистемные исследования морей европейского Севера» (г. Мурманск, май 2010 г.). – Мурманск: ММБИ КНЦ РАН, 2010. – С. 167-170.

9. **Пуговкин Д.В.** Распределение бактерий на разных участках талломов бурых водорослей // Природа морской Арктики: современные вызовы и роль науки: тез. междунар. науч. конф (г. Мурманск, март 2010). Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 2010. – С. 195-196.

10. **Пуговкин Д.В.** Сравнительный анализ методов десорбции эпифитных бактерий. Материалы XXIX конференция молодых ученых, посвященная 140-летию со дня рождения Г.А.Клюге «Морские исследования экосистем Европейской Арктики» (г. Мурманск, май 2011 г.) – Мурманск: ММБИ КНЦ РАН, 2011. – С. 177-180.

11. **Пуговкин Д.В., Рыжик И.В.** О возможности стерилизации водоросли *Fucus vesiculosus* ультрафиолетовым излучением // Матер. XXX конф. мол. ученых Мурманского морского биологического института, посвящённой 150-летию со дня рождения Н.М. Книповича «Проблемы океанографии, биологии и освоения биоресурсов морей российской Арктики» (г. Мурманск, май 2012). – Мурманск: ММБИ КНЦ РАН, 2012. – С. 148-151.

12. **Воскобойников Г.М., Пуговкин Д.В., Ильинский В.В., Зубова Е.Ю.** О возможной роли *Fucus vesiculosus* в очистке прибрежных акваторий // Изучение и освоение морских и наземных экосистем в условиях арктического и аридного климата: Матер. междунар. конф. (6-11 июня 2011 г.). Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – С. 32.

13. **Воскобойников Г.М., Зубова Е.Ю., Мишина Н.Н., Пуговкин Д.В., Рыжик И.В.** К вопросу о возможности использования фукусовых водорослей в санитарной аквакультуре // Глобальные климатические процессы и их влияние на экосистемы арктических и субарктических регионов: Тез. докл. Междунар. науч. конф. (г. Мурманск, 8-11 ноября 2011 г.) под ред. Г.Г. Матишова, – Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 2011. – С. 18-19.

14. **Воскобойников Г.М., Зубова Е.Ю., Макаров М.В., Пуговкин Д.В., Рыжик И.В.** Санитарная водорослевая плантация (СВП): Варианты // Биоразнообразие и устойчивое развитие: Материалы докладов III международной научно-практической конференции развитие (Симферополь, 15-19 сентября 2014 г.). – Симферополь, 2014. – С. 66.

15. **Воскобойников Г.М., Макаров М.В., Рыжик И.В., Пуговкин Д.В.** Санитарная аквакультура: от гипотезы до демонстрационного проекта // Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге: Материалы докладов III Международной научно-практической конференции. – Ярославль: ИБВВ им. И.Д. Папанина, 2014. – С. 213–214.

16. **Пуговкин Д.В., Ильинский В.В., Ляймер А. В.** Таксономический состав эпифитных бактериоценозов бурых водорослей *Fucus vesiculosus* из чистых и загрязненных нефтепродуктами акваторий Баренцева моря // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова. Биологический факультет (24–27 декабря 2014 г.). – М.: МАКС Пресс, 2014. – С 191.

17. **Пуговкин Д.В., Ильинский В.В., Ляймер А.В.** Эпифитные бактериальные сообщества бурых водорослей *Fucus vesiculosus* Баренцева моря // Международная научно-практическая конференция «Охрана окружающей среды и здоровья человека в РФ и странах ЕС» [Электронный ресурс]. – Мурманск: Изд-во МГТУ, 2014. – С. 134 – 137.

18. **Пуговкин Д.В., Ляймер А.В.** Бактерии-эпифиты водорослей *F. vesiculosus* в губе Зеленецкой Баренцева моря. // Арктическое морское природопользование в XXI веке – современный баланс научных традиций и инноваций: тезисы докладов международной научной конференции (г. Мурманск, 1-3 апреля 2015 г.) [отв. ред. Г.Г. Матишов]; Мурман. мор. биол. ин-т КНЦ РАН. – Апатиты: КНЦ РАН, 2015. – С. 204.

19. **Пуговкин Д.В., Рыжик И.В., Воскобойников Г.М.** Эффективность деструкции нефтяных углеводов бактериально-водорослевой ассоциацией (БВА) в лабораторных условиях. Материалы VIII Международной научно-практической конференции молодых учёных «Актуальные проблемы науки и техники-2015» Том I. Уфа: Издательство УГНТУ, 2015. – С. 341-342.