

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ МУРМАНСКИЙ МОРСКОЙ БИОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
КОЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
профессор кафедры гидробиологии
биологического факультета МГУ
им. М.В. Ломоносова,
доктор биологических наук
Ильинский В.В.

Мурманск, 2016

Оглавление.

Список используемых в работе сокращений.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. История микробиологических исследований северных морей.....	11
1.2. Эпифитные бактерии водорослей.....	14
1.3. Роль макрофитов и эпифитных бактерий в процессах разрушения нефтяных загрязнений водных экосистем.....	19
1.4. Численность и распределение эпифитных бактерий в пресноводных и морских экосистемах.....	22
1.5. Таксономический состав эпифитных бактерий в пресноводных и морских экосистемах.....	27
1.6. Проблемы выбора методик при учете эпифитных бактерий.....	33
1.7. Общая характеристика районов исследования.....	36
1.8. Общая характеристика объектов исследования.....	39
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ.....	41
2.1. Отбор и обработка проб	41
2.1.1. Отбор и обработка проб водорослей <i>F. vesiculous</i>	41
2.1.2. Отбор проб воды для микробиологического анализа.....	44
2.2. Подготовка материала для электронно-микроскопических исследований.....	44
2.3. Подготовка и проведение лабораторных экспериментов по определению углеводородокисляющей способности эпифитных бактерий фукуса.....	45
2.3.1. Определение численности бактерий.....	46
2.3.2. Определение физиологического состояния водорослей в эксперименте.....	46
2.3.2.1. Определение интенсивности фотосинтеза.....	46
2.3.2.2. Определение метаболической активности клеток водорослей....	46
2.4. Микробиологический анализ эпифитных бактерий водорослей	

<i>F. vesiculosus</i>	47
2.4.1. Определение численности культивируемых микроорганизмов методом предельных разведений.....	47
2.4.2. Определение общей численности бактерий по прямому счету.....	48
2.4.3. Выделение чистых культур культивируемых углеводородокисляющих микроорганизмов.....	48
2.4.4. Предварительная идентификация чистых культур углеводородокисляющих бактерий.....	49
2.5. Определение таксономического состава эпифитного бактериоценоза с использованием комплекса молекулярно-генетических методов.....	49
2.5.1. Идентификация штаммов чистых культур углеводородокисляющих бактерий с помощью анализа их 16S рРНК.....	49
2.5.2. Выделение бактериальной ДНК для последующей идентификации некультивируемых эпифитных бактерий	49
2.5.3. Секвенирование следующего поколения (NGS).....	51
2.5.4. Обработка данных, полученных в результате секвенирования.....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	56
3.1. Электронно-микроскопические исследования поверхности водорослей <i>F. vesiculosus</i> и эпифитных бактерий.....	56
3.2. Подбор оптимальных методов исследования эпифитных бактерий.....	60
3.2.1. Выбор среды для культивирования эпифитных бактерий.....	61
3.2.2. Сравнительный анализ разных методов удаления эпифитных бактерий с поверхности талломов фукуса.....	62
3.3. Количественное распределение сапротрофных культивируемых бактерий на поверхности талломов водорослей.....	65
3.4. Лабораторные эксперименты по определению углеводородокисляющей способности эпифитных бактерий фукуса.....	71
3.4.1. Определение углеводородокисляющей активности эпифитных бактерий, удаленных с талломов фукуса.....	71

3.4.2. Лабораторные эксперименты по потреблению дизельного топлива бактериально-водорослевой ассоциацией	73
3.4.2.1. Определение физиологического состояния водорослей.....	75
3.4.2.2. Учет численности углеводородокисляющих бактерий.....	76
3.4.2.3. Определение концентрации нефтепродуктов.....	78
3.5. Влияние нефтяного загрязнения на численность и таксономический состав эпифитных гетеротрофных бактерий, обитающих на фукусах губы Зеленецкой.....	80
3.5.1. Общая численность бактерий по прямому счету в воде и на талломах фукуса.....	81
3.5.2. Численность по посеву сапротрофных и углеводородокисляющих бактерий в пробах воды и на талломах фукуса.....	83
3.5.3. Определение таксономической принадлежности культивируемых углеводородокисляющих эпифитных бактерий.....	86
3.6. Таксономическая структура некультивируемых эпифитных бактериальных сообществ.....	92
3.6.1. Идентификация (типирование) нуклеотидных последовательностей, принадлежащих эпифитным бактериям водорослей <i>F. vesiculosus</i> из акваторий с разным уровнем загрязнения с использованием метода секвенирования нового поколения (NGS).....	92
3.6.2. Таксономическая структура эпифитных бактериальных сообществ <i>F. vesiculosus</i>	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ	116
Благодарности	118
Список литературы	120
Приложение 1	139
Приложение 2	141
Приложение 3	144

Список используемых в работе сокращений:

- БВА – бактериально-водорослевая ассоциация
- БО – биологическая очистка
- ДТ – дизельное топливо
- МАК – метаболическая активность клеток
- ММС – морская минеральная среда
- МП – Мурманский (морской) порт
- НП – нефтепродукты
- НУ – нефтяные углеводороды
- ОВ – органическое вещество
- ОЧБ – общая численность бактерий
- ПДК – предельно допустимая концентрация
- ПДУ – предельно допустимый уровень
- СБ – сапротрофные бактерии
- УОБ – углеводородокисляющие бактерии
- ЭБ – эпифитные бактерии
- эПЦР – эмульсионная полимеразно-цепная реакция
- ЭУОБ – эпифитные углеводородокисляющие бактерии
- NGS – секвенирование следующего поколения (Next-Generation Sequencing)
- OTU – оперативная таксономическая единица (Operative taxonomic unit)

ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность темы.

Ряд факторов, связанных с человеческой деятельностью, могут нарушить ход естественных процессов, происходящих в Мировом океане и биосфере в целом. Одним из них является нефтяное загрязнение. При планируемом расширении добычи углеводородного сырья на шельфе арктических морей, транспортировки, перегрузки, строительства перерабатывающих комплексов на побережье, возрастает возможность 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 организмов, обитающих в океане (Патин, 2008). 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 замедлено.

Основная нагрузка в процессах естественного очищения морских вод ложится на углеводородоокисляющие микроорганизмы, главным образом – на углеводородоокисляющие бактерии (УОБ). В последние годы внимание исследователей, работающих в этом направлении, привлекли ассоциации морских растений (водорослей-макрофитов) и микроорганизмов (бактерий). Показано, что водоросли-макрофиты способны аккумулировать на своей поверхности НП, а эпифитные углеводородоокисляющие бактерии (ЭУБ), преобразуют эти НП до более простых соединений, и в результате делают их доступными для водорослей.

Вопросы, связанные с состоянием и изменением активности УОБ, ассоциированных с водорослями-макрофитами прибрежной зоны, 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.

Научная новизна.

Экспериментальными и натурными наблюдениями показано влияние 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.

Практическая ценность.

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

Целью исследования являлось определение таксономической структуры культивируемых и некультивируемых эпифитных бактериальных сообществ бурой водоросли *F. vesiculosus* в акваториях, различающихся по степени нефтяного загрязнения, а также установление углеводородокисляющей активности эпифитных бактериоценозов фукуса.

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

1. Разработать оптимальный метод удаления эпифитных бактерий (ЭБ) с поверхности талломов макрофитов.
2. В эпифитных бактериальных сообществах *F. vesiculosus* из районов, различающихся по степени антропогенного загрязнения, определить:

- общую численность бактерий;
 - численность культивируемых бактерий;
 - количественное распределение культивируемых бактерий по таллону фукуса;
 - таксономический состав культивируемых УОБ;
 - таксономический состав некультивируемых бактерий.
3. Экспериментально оценить углеводородокисляющую способность эпифитных бактериоценозов в лабораторных условиях.

Апробация.

Результаты работы докладывались на российских и международных семинарах и конференциях:

- XVII конференция молодых ученых. Мурманск, ММБИ КНЦ РАН, 2009 г.
- Международная научная конференция «Природа морской Арктики: современные вызовы и роль науки», посвященная 75-летию ММБИ КНЦ РАН. Мурманск, 10–13 марта 2010 г.
- Школа молодых ученых по морской биологии «Биоресурсы и аквакультура» г. Мурманск (28-29 февраля 2012 г.)
- Workshop for CETIA' participants (Russian-Norwegian), Tromsø, Norway, 14 – 19 April 2012.
- «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии» г. Ростов-на-Дону, 25–29 марта 2013 г.
- XXXI конференция молодых учёных Мурманского морского биологического института, посвящённая 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

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

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

-Международная научная конференция «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 2015г.

Данные полученные в ходе выполнения работ вошли в отчеты ФЦП «Мировой океан», гранта РФФИ (14-04-32225 мол_a), совместного российско-норвежского проекта CETIA (Coastal Environment, Technology and Innovation in the Arctic), 2011 – 2014 гг.

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 *Gammaproteobacteria*, среди которых преобладают представители рода *Acinetobacter*. В незагрязненных НУ районах (в частности – в губе Зеленецкой Баренцева моря) доминируют представители типов *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*) и *Bacteroidetes* (*Sphingobacteria* и *Flavobacteria*).

2. Эпифитные бактериальные сообщества фукусовых водорослей способны к утилизации нефтяных углеводов 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. История микробиологических исследований северных морей.

Первые микробиологические исследования в акватории северных морей были выполнены в районе острова Медвежий, а также архипелагов Шпицберген и Земля Короля Карла (Палибин, 1904). Они показали, что микроскопическое население в этих районах весьма немногочисленно. Позже, в 1909 – 1914 гг., известный русский микробиолог Б. Л. Исаченко из вод Кольского залива и открытых районов Баренцева моря выделил значительное число микробных форм, участвующих в процессах круговоротов азота и углерода (Исаченко, 1914).

В 30-е годы прошлого века, при исследованиях водных масс в Карском море, было обнаружено, что плотность бактерий в воде была наибольшей вблизи о. Шмидта, а в северо-восточной части Карского моря наблюдались лишь их единичные клетки (Исаченко, 1937 а, б). Малое число бактерий, обнаруженное в водах этого района, объяснялось в первую очередь несовершенством использованного метода их учета (Родина, 1965).

Более точные сведения о численности бактерий в водах северных морей были получены В.С. Буткевичем (1928, 1932, 1938, 1958), применившим для определения ОЧБ микроскопический метод прямого счета клеток, сконцентрированных на мембранных фильтрах и окрашенных эритрозином, разработанный А.С. Разумовым (1932, 1962). Впоследствии данный метод был существенно усовершенствован и в таком виде до сих пор используется для определения общей численности, биомассы и продукции бактериопланктона. Кроме того, В.С. Буткевичем (1932) было показано, что определяющую роль в распределении сапротрофных бактерий играет ОВ, которое концентрируется в районах смешивания разнородных водных масс (Буткевич, 1932).

Работы, проведенные Е.Н. Боковой в Баренцевом, Гренландском и Карском морях показали, что количество бактерий в морях восточного сектора Арктики значительно выше, чем в западном (Бокова, 1937). Это объяснялось мощным обменом растворенным органическим веществом и клетками

микроорганизмов между водой и грунтом во время волнений и подвижек в более мелководных восточных районах (Теплинская, 1990).

При исследовании прибрежной зоны Баренцева моря было установлено, что значения ОЧБ в этой акватории изменяются в течение года (Лимберг, 1941). При этом максимальные величины ОЧБ были отмечены в осенние и весенние месяцы. Изменения численности бактерий в прибрежных водах связывались с распадом ОВ на литорали (Никитина, 1955 а, б).

В грунтах литорали Баренцева моря количество бактерий убывало от поверхности в глубину (Рубан, 1961).

50-е – 70-е годы прошлого века явились периодом активного исследования сапротрофных бактерий (СБ) Норвежского (Крисс, 1976) и Гренландского морей (Крисс, 1959; Мишустина, Мицкевич, 1963). Были определены количественное распределение, и морфологическая структура пелагических бактериальных сообществ, а также таксономический состав их культивируемых представителей.

К концу 70-х – началу 80-х годов появились сведения о продукционных характеристиках водных бактерий, их биомассе, времени генерации, суточной продукции (Россова, 1977; Пилипас, 1977; Мишустина, 1976; Мишустина, 1981; Дударенко, 1982; Dahlback et al., 1982; Мишустина, Батурина, 1984; Байтаз, Байтаз, 1987). Для измерения продукции бактерий в этот период активно применялся радиоуглеродный метода (Романенко, Кузнецов, 1974). В результате была показана важная роль бактериальных сообществ в круговороте углерода и их связь с другими группами организмов, обитающих в Арктических морях.

В Белом море в 70-е годы исследовалась сезонная динамика численности бактериопланктона у Карельского побережья (Кондрик, Огаркова, 1976). Была установлена связь между содержанием в воде нитратного азота, фосфатов, кремниевой кислоты и численностью, биомассой и продукцией бактерий (Белая, Потапова, 1976). Изучалась и ферментативная активность гетеротрофных микроорганизмов (Трунова, 1977, 1979).

В 90-е годы количество работ, посвященных микробиологическим исследованиям северных морей России, резко сократилось.

М.И Москвиной проводились исследования в пелагиали и сублиторали в зоне произрастания водоросли *Laminaria saccharina*. Была определена численность аэробных и анаэробных азотфиксаторов в воде, в отложениях и на поверхности ламинарии. Показано, что максимальные значения азотфиксирующей активности микроорганизмов приурочены к зонам смешивания атлантических и неатлантических водных масс (Москвина, 1991). Скорость азотфиксации в эпифитных сообществах ламинарии сахаристой варьировала в течение года и достигала максимума в летний период.

В начале XXI века появились работы посвященные микробиологическим исследованиям Кольского залива. Проведен микробиологический мониторинг водных экосистем (Перетрухина, 2002), исследована пространственно-временная изменчивость гетеротрофных бактериальных сообществ воды прибрежной зоны залива (Богданова, 2003), изучено распределение бактериобентоса литорали среднего и южного колен залива (Макаревич, 2004). Отмечены изменения в микробиологических показателях бентосных бактериальных сообществ под воздействием факторов внешней среды. Определена взаимосвязь между размерными характеристиками частиц грунта и численностью бентосных бактериальных сообществ. Установлено, что наибольшая численность бактериальных клеток приурочена к поверхностному слою грунта литорали. Среднее количество клеток в расчете на 1 см² поверхности грунта колебалось на уровне десятков тысяч.

Показано влияние антропогенных факторов, в частности нефтяного загрязнения Кольского залива, на численность и структуру микробных ценозов литорали Кольского залива (Перетрухина, 2006). На различных станциях отбора проб в Кольском заливе была установлена высокая численность бактерий. В работе также предпринята попытка оценить количественные показатели эпифитных бактериальных сообществ фукуса пузырчатого и их взаимосвязь с антропогенными факторами среды. Особое внимание уделялось определению углеводородокисляющей активности микроорганизмов, обитающих в воде вблизи зарослей макрофитов. В то же время в работе имеется ряд спорных моментов,

связанных с методами учета эпифитных бактериоценозов и определением таксономической структуры их сообществ. В этой работе определяли в основном только численность и таксономический состав культивируемых эпифитных бактерий, которые, в отличие от некультивируемых форм бактерий, не являются самыми массовыми в эпифитном сообществе.

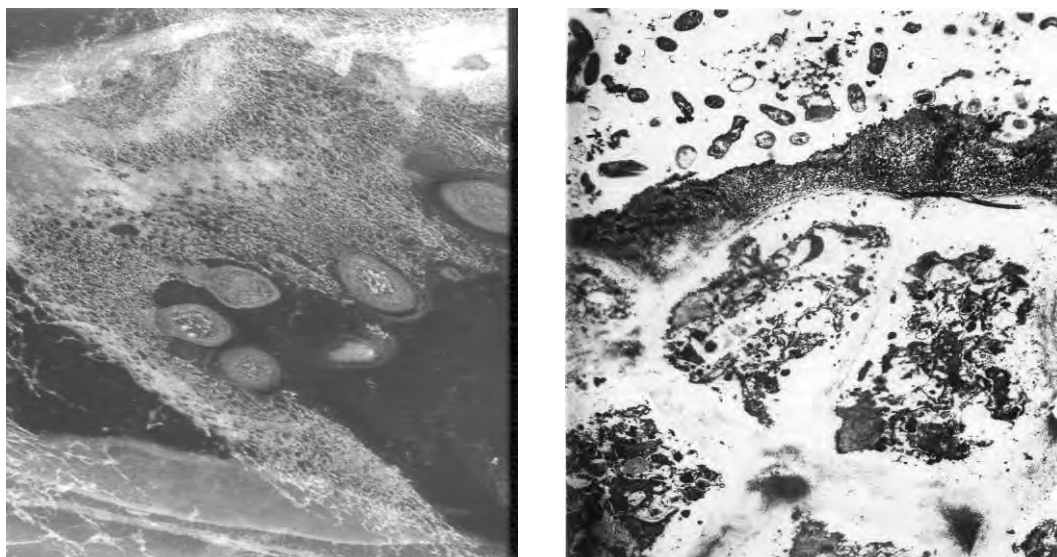
Т.И. Широколовой (2009) было проведено исследование бактериальных сообществ эстуарных зон и прибрежных экосистем Баренцева моря. Установлено, что основной вклад в бактериальную биомассу в этих акваториях вносят бактерии, имеющие форму палочек, кокков и эллипсов. Была показана связь между факторами среды и численностью фильтрующихся бактериальных клеток в составе планктонного микробного сообщества (Широколова, 2009).

1.2. Эпифитные бактерии водорослей.

Поверхности объектов, погруженных в водную среду, являются благоприятным субстратом для развития многих групп организмов, которые могут формировать целые структурированные сообщества со своими потоками вещества и энергии. В литературе такие сообщества называют биообрастаниями, а образующие их организмы относят к перифитону.

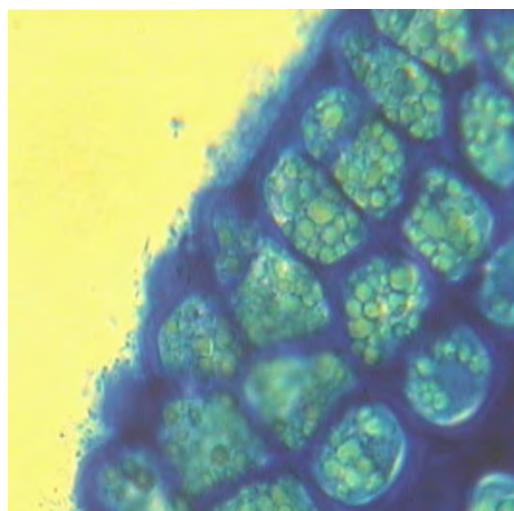
Неотъемлемым компонентом перифитонных сообществ являются ЭБ, обитающие на поверхности водных растений (Рис. 1).

Прикрепление бактерий к поверхности водорослей происходит различными путями. Бактериальные клетки, в частности, в этом случае могут использовать выросты клеточной стенки (пили) и ворсинки для закрепления на неровностях поверхности талломов.



А

Б



В

Рисунок 1. Эпифитные бактерии на поверхности *Fucus vesiculosus*. Увеличение: А – х500, Б – х1500, В – х600

По некоторым данным (Characklis, 1984), бактериальная колонизация поверхности может включать следующие этапы:

- транспорт органических молекул и бактерий к поверхности;
- воздействие на поверхности органических молекул, что делает ее более благоприятной для прикрепления бактерий;
- непосредственное прикрепление бактерий к поверхности;
- взаимодействие бактерий с поверхностью за счет выделения метаболитов;
- рост и развитие бактерий, образование бактериальной пленки;
- отрыв части уже сформированной биопленки.

А. И. Раилкин предположил, что не все отмеченные выше стадии являются непосредственно этапами колонизации, несмотря на то, что непосредственно способствуют облегчению заселения бактериями поверхностей, а отрыв части бактерий может происходить и под воздействием течений (Раилкин, 2008). Кроме того, данная схема была описана для неживых поверхностей. При рассмотрении процессов поселения живых организмов на поверхности других, в частности - живых объектов (зачастую с образованием симбиотических отношений) была предложена другая схема (Wahl, 1997): 1. Создание благоприятных условий на поверхности (за счет макромолекул и ионов), 2. Бактериальная колонизация поверхности, 3. Заселение поверхности одноклеточными эукариотами, 4. Заселение поверхности многоклеточными эукариотами.

У бактерий выделяют две основных стадии колонизации поверхности: обратимую и необратимую (ZoBell, 1946; Marshall et al., 1971).

Первая обратимая стадия представляет собой адгезию микроорганизмов, под которой понимают способность микроорганизмов адсорбироваться на твердых поверхностях. Адгезия микроорганизмов также является пусковым механизмом инфекционного процесса. Однако в нашем случае под адгезией можно понимать начальную стадию колонизации поверхности водорослей за которой следует установление симбиотических связей. Адгезия осуществляется за счет белковых структур (адгезинов) способствующих «прилипанию» бактериальных клеток к водорослям. Лабораторными экспериментами было показано, что прикрепление бактерий к субстрату может носить избирательных характер, и степень их прикрепления может быть различной. Время прикрепления бактериальных клеток также может различаться у различных морфологических форм (кокки, палочки). Некоторые клетки могут лишь временно поселяться на субстрате (Marshall et al., 1971; Wahl, 1989; Раилкин, 1994; Railkin, 1998)

На второй стадии некоторые бактерии выделяя метаболиты в среду, могут «врастать» в поверхностные структуры. Для здоровых мактофитов данный процесс не представляет опасности. В случае же повреждения поверхности водорослей, бактерии способны проникать внутрь таллома и даже отдельных его

клеток. Это может приводить к проникновению бактерий во внутренние структуры водорослей, что приводит к болезням, и гибели макрофитов. Однако зачастую бактерии, поселяясь на поверхностях живых организмов, могут вступать с ними в симбиотические отношения. Характер подобных взаимоотношений эпифитных бактерий и водорослей-макрофитов может быть различным.

Некоторые авторы под ЭБ подразумевают микроорганизмы, использующие поверхность таллома водоросли в качестве места предпочтительного или постоянного их обитания (Семенов и др., 2014). Водоросли в данном случае могут выступать в качестве питательного субстрата.

Предположения о наличии симбиотических отношений между водорослями и обитающими на них бактериями, при которых морские водоросли обеспечивают бактерий питательными веществами, а бактериальные сообщества способствуют росту водоросли-«хозяина» и защищают его от патогенных микроорганизмов (Рис. 3), появились довольно давно. При этом оба компонента ассоциации могут оказывать влияние как друг на друга, так и на окружающую среду, в которой они обитают (Ramanan et al., 2016).

Морские водоросли – макрофиты продуцируют большое количество биологически активных веществ: моно- и полисахаридов, пигментов, липидов, микроэлементов (Воскобойников, 2006).

Считается, что макроводоросли могут создавать вокруг себя благоприятную среду, формируя и контролируя видовой состав организмов, в том числе и УОБ (Хайлов, 1971). В настоящее время уже не возникает сомнений в том, что между водорослями и ЭБ существуют тесные взаимовыгодные отношения. Это было показано, в частности, для ЭБ *Ulva australis* (Tujula, 2006). Кроме того, была подробно изучена природа антагонистических и взаимовыгодных отношений (Рис.2), между макроводорослями и бактериями (Goecke et al., 2010).



Рисунок 2. Схема взаимовыгодных (зеленый) и антагонистических (красный) взаимодействий между макроводорослями и бактериями (Hollants et al. 2013).

Независимо от вида водорослей и места их произрастания, на них постоянно наблюдается высокая численность гетеротрофных ЭБ (Bolínches, Manuel, 1988). Они преобразуют сложные вещества в более простые, которые могут легко усваиваться водорослями (Atlas, Bartha, 1997). Так, например, было показано, что эпифитные азотфиксирующие микроорганизмы в летний период способны обеспечить до 10 % потребности ламинарии в азоте (Москвина, 1991). При этом азотфиксирующие цианобактерии *Synechococcus spp.* могут играть значительную роль в процессах жизнедеятельности самих водорослей, оказывая на них стимулирующее воздействие.

Многие виды ЭБ продуцируют антибиотические вещества, препятствующие развитию других эпифитных организмов. Они затрудняют, в частности, поселению на талломах водорослей бактерий других видов (Vairappan et al., 2008,

Wiese et al, 2009, Goecke et al., 2010, Goecke et al., 2013). Таким образом, они контролируют развитие биообрастателей.

Кроме питания и стимулирования роста водорослей, эпифитные бактериальные сообщества могут влиять на морфологию и жизненный цикл их водорослей – хозяев. Бактериальные эффекты на морфогенез были отмечены у зеленых микроводорослей, таких как *Ulva* и *Monostroma* (Fries, 1975; Provasoli, Pintner, 1980; Tatewaki et al., 1983; Nakanishi et al., 1996; Marshall et al., 2006, Singh, Reddy, 2014).

Некоторые макрофиты, в свою очередь, также могут выделять в водную среду антибактериальные вещества, которые ограничивают колонизацию их талломов бактериями. Подобное явление может отмечаться в определенные периоды развития водорослей (Iman et al., 1984). Взаимодействия между водорослями и бактериями, наряду с факторами внешней среды, влияют на характерные особенности ассоциаций, образуемых ЭБ и водорослями. В результате, у разных представителей макрофитов состав эпифитных микробных ассоциаций может отличаться. (Iman et al., 1984).

Исследования ламинариевых и ульвовых водорослей показали, что эпифитное бактериальное сообщество также может меняться в зависимости от времени года, в результате изменений физиологических показателей в различные сезоны за счет воздействия биотических и абиотических факторов (Staufenberger et al., 2008. Bengtsson et al., 2010. Tujula et al., 2010)

1.3. Роль макрофитов и эпифитных бактерий в процессах разрушения нефтяных загрязнений водных экосистем.

Скорость биodeградации нефтей и их устойчивость к микробному воздействию определяется, главным образом, их составом, с которым связаны также и физические свойства этой сложной многокомпонентной смеси различных соединений. Известно, что практически все углеводороды, входящие в состав нефтепродуктов, поддаются окислению микроорганизмами. При этом скорость разрушения зависит от соотношения компонентов, входящих в их состав.

Активнее всего микробному окислению подвергаются алифатические углеводороды (Haines, Alexander, 1974), при этом скорость их окисления будет определяться длиной цепи (Haines, Alexander, 1974; Fuhs, 1961; Atlas, 1978; Pirnik, 1977) Значительно медленнее подвергаются разрушению циклические и полициклические соединения (Шлегель, 1987; Hofmann, 1986), причем скорость разложения последних в большой степени зависит от количества циклов в их структуре (Heitkamp, Cerniglia, 1987).

Многие вопросы, связанные с участием ЭБ в процессах разрушения НУ в пресноводных и морских экосистемах остаются до сих пор малоизученными (Воскобойников, 2006).

Показано, что в присутствии как морских, так и пресноводных макрофитов разрушение НУ в водной среде происходит значительно быстрее. В частности, было установлено, что высшие водные растения ускоряют бактериальное разложение нефти в 3 – 5 раз. (Морозов, 2001; Воскобойников, 2006).

Известно, что поверхность макрофитов увеличивает площадь контактов бактериальных клеток с нефтью, а фотосинтетическая аэрация в дневное время приводит к повышению концентрации кислорода в воде в зарослях макрофитов в 2 – 3 раза по сравнению с открытыми частями водоема (Кроткевич, 1982; Морозов, 2001; Садчиков, 1997 Садчиков, Кудряшов, 2005). В результате могут создаваться благоприятные условия для аэробного микробного окисления НУ.

Предполагается, что ряд водорослей способны, помимо адсорбирования НУ на своей поверхности, непосредственно утилизировать некоторые из них (Степаньян, Воскобойников, 2006).

При исследовании макрофитов побережья Баренцева моря было установлено, что на пластине ламинарии доминируют гетеротрофные формы бактерий, расщепляющие широкий спектр органических соединений, включая нефтепродукты. (Дмитриева, Дмитриев, 1996). В процессе эволюции, у этих бактерий выработались соответствующие ферментные системы для биodeградации НУ и использования их в качестве субстрата для роста. Такие микроорганизмы широко распространены в природе и, как выяснилось, среди них

нет узкоспециализированных форм (Таусон, 1950; Шлегель, 1972; Шлегель, 1987). Например, было показано, что около 80% всех бактерий, выросших на рыбопептонном бульоне (РПБ) при посеве в него воды из реки Ангары, разлагают нефть, дизельное топливо, керосин, бензин, машинное масло, и только 20% культур не развивается в присутствии бензина (Мамонтова, Дутова, 1977). Помимо УОБ, существуют и такие микроорганизмы, которые не усваивают НУ, но могут расти в их присутствии за счет ОВ (в частности, агара или дрожжевого экстракта), если они входят в состав питательных сред. Это так называемые углеводородустойчивые микроорганизмы (Ильинский, 1979). Их численность может составлять до 50% от общего количества бактерий, вырастающих на агаризованных средах с НУ.

Доминирование определенных таксономических групп УОБ, обитающих, в том числе, и на поверхности водорослей, определяется, как правило, климатическими условиями и степенью нефтяного загрязнения среды (Гусев и др., 1978; Коронелли и др., 1994; Ильинский и др., 1998). После попадания НУ в среду их обитания, эти организмы получают преимущество перед остальными группами бактерий, так как у них появляется дополнительный источник углерода и энергии. В результате, численность УОБ будет возрастать. Соответственно, в районах, где наблюдается хроническое и интенсивное загрязнение нефтепродуктами, их численность будет выше, нежели в чистых зонах (Воскобойников и др, 2008).

УОБ при этом принимают активное участие в расщеплении НУ, поскольку включают их в свой метаболизм. В результате их деятельности в окружающую среду может выделяться ряд веществ, которые в значительной степени стимулируют развитие самих водорослей (Wrabel, Peckol , 2000). Было показано, что ЭБ, обитающие на талломах водоросли *Fucus vesiculosus*, при попадании в среду НУ начинают активно развиваться, и при наличии в среде достаточного количества соединений азота и фосфора, способны максимально утилизировать нефть и нефтепродукты. При этом снижается токсическое воздействие этих загрязнителей на водоросли (Wrabel, Peckol , 2000).

Разложение нефти в прибрежных зонах является совместным результатом деятельности гетеротрофных микроорганизмов и водных растений. Первые являются основными деструкторами и минерализаторами загрязняющих веществ, а вторые – индукторами, поглотителями и потребителями окисленных соединений. Поступающие в среду нефтепродукты, как правило, попадают в прибрежные районы, оседая на богатых растительностью участках. При этом не наблюдается их чрезмерного накопления. Считается, что соприкасаясь с биологическими поверхностями, НУ подвергаются окислению и вовлекаются в обменные процессы. Способность микроорганизмов окислять практически все углеводороды, входящие в состав нефтепродуктов, обуславливает их ведущую роль в процессах естественного очищения среды. Благодаря этой деятельности микробного населения, нефть трансформируется до простых соединений, происходит образование и накопление нового ОВ и дальнейшее включение его в круговорот углерода в водоемах.

В связи с этим было предложено использовать водоросли-макрофиты для борьбы с нефтяным загрязнением водных экосистем. В морских акваториях для этого были использованы искусственно созданные плантации морских водорослей – фукуса и ламинарии (Воскобойников, 2006).

1.4. Численность и распределение эпифитных бактерий в пресноводных и морских экосистемах.

Численность и распределение различных групп ЭБ по поверхности таллома макрофитов зависит от таксономической принадлежности водоросли, расположения участка таллома, сезона года и концентрации органических веществ в среде.

Степень изученности ЭБ, обитающих в пресноводных или морских экосистемах, различна. В настоящее время наиболее изученными являются бактерии, обитающие на поверхности пресноводных растений. Это касается их численности, распределения и таксономического состава. Известно, что численность и биомасса этих бактерий довольно высоки, а их роль в экосистеме

можно сравнивать с ролью бентосных форм (Naglund, 2004). В густых зарослях водных растений продукция обитающих здесь бактерий может быть равной или даже превосходить продукцию бактериопланктона.

Численность эпифитных СБ по посеву на листьях пресноводных макрофитов обычно на несколько порядков ниже, чем общая численность эпифитных бактерий по прямому счету, также как это имеет место и в других природных местообитаниях, к примеру в воде или почве. Было показано, что на зрелых листьях широко распространенных пресноводных макрофитов *Elodea canadensis* и *Chara vulgaris* численность СБ по посеву составляла $(1 - 10) \times 10^5$ и $(15 - 30) \times 10^5$ кл/см² соответственно (Ramsay, Fry, 1976).

Численность и распределение ЭБ и количество эпифитных СБ на отдельных участках таллома пресноводных макрофитов и влияние на эти микробиологические показатели факторов водной среды было подробно изучено на группе пресноводных растений, обитающих в озере Езёррак (Jeziorak) (Lalke-Porczyk, Donderski, 2003). Исследования проводили на нескольких видах водных растений – тростнике обыкновенном (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.), рогозе узколистом (*Typha angustifolia* L.), кубышке желтая (*Nuphar luteum* L.), рдесте плавающем (*Potamogeton natans* L.). Определяли ОЧБ по прямому счету и численность СБ по посеву, исследовали также отдельные участки листьев макрофитов с помощью сканирующей электронной микроскопии. На молодых частях рогоза узколистного в весенний период была отмечена низкая численность СБ (Lalke-Porczyk, Donderski, 2003). Летом и осенью число ЭБ значительно возрастает. Их распределение на листьях кубышки желтой было неравномерным. Минимальные значения численности ЭБ наблюдались на верхней части листьев, причем концентрировались они в районе устьиц. На нижней поверхности листьев бактерии формировали скопления вблизи выделительных волосков. У рдеста нижняя поверхность плавающих листьев была заселена бактериями более равномерно. Максимальная численность бактерий на поверхности листьев наблюдалась в осенний период (Lalke-Porczyk, Donderski, 2003). Из всех исследованных растений наибольшая численность ЭБ наблюдались на

поверхности стеблей рогоза узколистного (Lalke-Porczyk, Donderski, 2003). Она колебалась от $1,55 \times 10^9$ до $3,90 \times 10^{10}$ кл/см². В отличие от рдеста, максимум количества бактерий у рогоза узколистного приходился на лето, а осенью наблюдался спад. Этот феномен был отмечен для нижних и верхних частей растения (Lalke-Porczyk, Donderski, 2003). При определении количественных показателей микробного сообщества тростника отмечено, что численность ассоциированных с ним ЭБ значительно ниже, чем на других видах водных растений, однако характер их распределения на соответствовал таковому у других исследованных растений. Средние показатели общей численности ЭБ на плавающих листьях кубышки желтой варьировали от $1,50 \times 10^9$ до $1,18 \times 10^{12}$ кл/г сухой массы или от $1,30 \times 10^5$ до $8,80 \times 10^7$ кл/см², причем этот показатель всегда был выше на нижней стороне листовых пластин (Lalke-Porczyk, Donderski, 2003). При изучении данных посева на питательные среды обнаружено, что наибольшая численность гетеротрофных (сапротрофных) ЭБ, наблюдалась на поверхности стеблей рогоза узколистного, а наименьшая – на листьях рдеста плавающего. При этом, численность СБ по посеву была в 1000 раз ниже, чем ОЧБ по прямому счету. Колебания численности СБ зависели от вида растения, анализируемой его части и времени года, в которое проводили исследования (Lalke-Porczyk, Donderski, 2003).

Летний максимум численности эпифитных бактерий, обычно наблюдаемый на отдельных пресноводных растениях, объясняется возрастанием количества ОВ, выделяемых растениями и сезонным увеличением температуры воды (Niewolak, 1974; Olah, 1974). С другой стороны, падение величин ОЧБ, наблюдаемое летом на поверхности водных растений, может быть связано с выделением растениями антибактериальных веществ или с чрезмерной экспозицией растения под летними солнечными лучами (Lalke-Porczyk, Donderski, 2003).

Независимо от таксономической принадлежности растения, на нижней (подводной) части его листьев обычно наблюдается большее количество ЭБ. Это может объясняться их постоянным контактом с водой, относительно стабильной

температурой воды и отсутствием сильного солнечного излучения, а также обильным выходом питательных веществ из многочисленных выделительных волосков (Lalke-Porczyk, Donderski, 2003). Еще более высокая численность ЭБ была обнаружена на поверхности придонной части стебля. Обуславливается это тем, что в придонном слое, за счет перемешивания водных масс наблюдается высокие концентрации взвеси и ОВ, что позволяет бактериям активно развиваться. Большая часть таких бактерий может оседать на поверхность растений.

Уменьшение численности ЭБ в осенний сезон может быть связано с началом процессов отмирания и гниения поверхностных структур (клеток) у стеблей макрофитов. В результате происходит постепенное отслоение поверхностного слоя вместе с населяющими его микроорганизмами (Lalke-Porczyk, Donderski, 2003). Однако можно предположить, что впоследствии, за счет увеличения площади поврежденных поверхностей макрофита будет наблюдаться резкое возрастание количества гетеротрофных бактерий.

Эпифитные бактериальные сообщества морских растений и водорослей, в отличие от пресноводных, малоизучены. Большая часть опубликованных работ по данному вопросу касается морской травы *Zostera marina* и ряда бурых водорослей. Было показано, что планктонные формы ЭБ способны закрепляться на поверхности растения *Zostera marina*. Их количество на различных частях этого макрофита зависело от многих факторов, но в основном закрепление и дальнейшее развитие ЭБ контролируется продуктами метаболизма, секретируемыми зостерой (Куриленко и др., 2001).

Торнбломом и Сондергаардом были проведены работы с зостерой из фьорда Роскилд (Roskilde) в Дании (Tornblom, Sondergaard, 1999). Отмечено, что на поверхности листьев находились плотноупакованные палочковидные формы ЭБ, «сросшиеся» с растением и образующие сплошной бактериальный слой. В результате, старые листья были покрыты слоем слизистого вещества. Распределение и форма бактерий в этом слое носили неоднородный характер. Помимо ЭБ тут встречались также и микроскопические водоросли. Численность

клеток ЭБ возрастала с увеличением возраста листьев. Значительные различия в численности этих бактерий на молодых и старых листьях отмечались в весенне – летний период. Отмечена зависимость ОЧБ на поверхности как молодых так и старых листьев от времени года. Так, в середине августа наблюдалось увеличение численности бактерий в 4 – 7 раз.

Большая часть работ, касающихся ЭБ водорослей, относится к прикладным аспектам науки и связано с вопросами культивирования водорослей для различных целей, в том числе – для использования в пищевой промышленности. В этом случае, как правило, основной акцент делается на изучение патогенных и условно-патогенных эпифитных микроорганизмов. Большинство стран с развитыми технологиями культивирования водорослей относятся к Азиатско-Тихоокеанскому региону. Именно поэтому основная часть работ, посвященных микробиологии водорослей, касается макрофитов Дальневосточных морей и связана с изучением болезней водорослей и с разработкой методов борьбы с фитопатогенными микроорганизмами.

В европейских странах изучение ЭБ морских макрофитов, в частности бурых водорослей, не вызывает особого интереса. Поэтому данных по численности и распределению ЭБ на их поверхности значительно меньше.

Для бурых водорослей *Fucus vesiculosus* показано, что на молодой части таллома водоросли численность бактерий обычно минимальна. Максимальное же количество бактерий наблюдается на нижних, старых участках таллома. Объясняется это тем, что либо макрофитами в период роста именно на этих молодых участках выделяются в среду обитания бактериостатические или бактерицидные вещества, либо они не могут обеспечить благоприятные условия для прикрепления эпифитных организмов (Sieburth, 1968; Mikulski, 1982). Кроме того, на поверхности макрофитов может снижаться рН, что также может препятствовать развитию ЭБ.

Различия в численности ЭБ на различных участках таллома четко прослеживается при сканировании поверхности баренцевоморской *Saccharina latissima* (*Laminaria saccharina*). Причем эти различия могут быть как

количественными, так и качественными (Москвина. 1991). Минимальные значения численности - $(25 \pm 5,8)$ млн. кл/см² - наблюдались в нижней части пластины, в зоне интенсивного роста. Преобладали клетки округлой формы. По мере удаления от зоны роста численность бактерий увеличивалась до $(46,7 \pm 16,7)$ млн. кл/см² в центральной части и до $(100 \pm 11,5)$ млн. кл/см² - в верхней части.

Исследования *Saccharina latissima* (ранее в систематике имела название *Laminaria saccharina*) в Северном море (Oberbeckmann et al., 2007) показали, что максимальное количество ЭБ на пластине наблюдалось в ее центральной части и составляло $2,88 \times 10^8$ кл/см². Минимум ОЧБ был отмечен на меристематической зоне таллома - $2,09 \times 10^8$ кл/см² (Oberbeckmann et al., 2007).

Учет культивируемых эпифитных СБ некоторых водорослей Японского моря показал значительные различия в их численности у разных макрофитов (Chan, McManus, 1969).. Для *Chordaria flagelliphormis* средняя численность клеток ЭБ составила $3,66 \times 10^5$ КОЕ/г, для *Desmarestia viridis* – $6,14 \times 10^5$ КОЕ/г. Для бурой водоросли *Ascophyllum nodosum* численность эпифитных СБ составила порядка 10^4 кл/г сухой массы, а для красной водоросли - багрянки *Polysiphonia lanosa* - 10^5 кл/г сухой массы (Chan, McManus, 1969).

Количества культивируемых сапротрофных ЭБ на зеленых водорослях *Monostroma nitidum* и *Enteromorpha linza* из Японского моря составляли $10^4 - 10^6$ кл/см², на талломах красной водоросли *Porphyrea suborbiculata* – $10^3 - 10^4$ кл/см², а на бурой водоросли *Eisenia bicyclis* – $10^1 - 10^4$ кл/см² (Shiba, Taga, 1980).

1.5. Таксономический состав эпифитных бактерий в пресноводных и морских экосистемах.

Главной проблемой при изучении таксономического состава бактериоценозов является несовершенство методов выделения чистых культур для исследования и преобладание в составе ЭБ некультивируемых форм микроорганизмов. В настоящее время бурное развитие методов генетического анализа позволяет работать с генетическим материалом, выделяемым непосредственно из среды. Однако зачастую при определении таксономической

структуры используются стандартные микробиологические методы. Между тем известно, что к росту на питательных средах способна лишь незначительная часть бактериального сообщества, которая в незагрязненных акваториях составляет не более 10% от численности всего бактериоценоза (Zobell, 1946; Meyer-Reil, 1977 и др.).

Основными объектами для исследования видового состава культивируемых ЭБ как правило являются такие пресноводные растения, как камыш озерный, рогоз узколистный и элодея канадская (Морозов, 2001, Тумайкина и др., 2008).

С поверхности листьев элодеи канадской были выделены 6 культур бактерий, идентифицированных как *Acidovorax delafieldii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Brevundimonas diminuta*, *Aquaspirillum fasciculus*, *Pseudomonas sp.* и *Kocuria rosea* (Тумайкина и др., 2008).

На камыше озерном из Заинского водохранилища, в летний период были определены следующие виды бактерий: *Bacterium album*, *Bacterium delicatulum*, *Bacterium dendriticum*, *Bacterium lentulum*, *Bacterium ramigerum*, *Bacillus danicus*, *Bacillus gracilis*, *Bacillus mucilagenosus*, *Bacillus reniformis*, *Bacillus turgescens*, *Pseudomonas desmolyticum*, *Pseudomonas epsteinii*, *Pseudomonas citrine*, *Pseudomonas striata*, *Planosarcina samesii*, *Bacterium album* (Морозов, 2001). Доминирующей группой тут являлись представители родов *Bacillus* и *Bacterium*, которые составляли до 72 % от всех идентифицированных бактерий.

На рогозе узколистном, отобранного в это же время доминировали представители родов *Bacillus* (до 50%). В целом же с поверхности были выделены: *Bacillus circulans*, *Bacillus danicus*, *Bacillus gracilis*, *Bacillus reniformis*, *Bacillus valinoforans*, *Planosarcina samesii*, *Achromobacter cycloclastes*, *Achromobacter fairmountense*, *Achromobacter hartlebii*, *Achromobacter multistriatum*, *Achromobacter nebulosum*, *Achromobacter punctatum*, *Achromobacter superficiale*, *Pseudomonas centrifugans*, *Bacterium candidans* (Морозов, 2001).

Эпифитные микробные сообщества морских макрофитов могут отличаться большим таксономическим разнообразием. Так, при исследовании структуры микробных сообществ бурых и красных водорослей Японского моря был выделен

и описан 61 род гетеротрофных бактерий. На поверхности водорослей встречались: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Sulfitobacter* spp., *Halomonas* spp., *Acinetobacter* sp., *Planococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Agromyces* sp. Предполагается, что у разных видов водорослей существуют специфические бактериальные сообщества (Beleneva, Zhukova, 2006).

Видовой состав культивируемых эпифитных бактерий, обитающих на талломах морских макрофитов, был изучен на примере некоторых бурых водорослей: *Fucus vesiculosus*, *Chordaria flagelliphormis*, *Desmarestia viridis*, *Saccharina latissima* и *L. hyperborea*, 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).

При сравнении 159 видов зеленых, красных и бурых водорослей было обнаружено, что независимо от видов водорослей на их поверхности всегда отмечаются представители типов *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Fusobacteria*, *Tenericutes* (Hollants et al. 2013). Было показано этими же авторами, что только 33 вида ЭБ, среди которых были *Alteromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* и *Vibrio*, отмечались и на зеленых, и на красных, и на бурых водорослях. Рода же *Cytophaga*, *Planococcus* и *Tenacibaculum* выделялись только с поверхности красных и зеленых водорослей и отсутствовали у бурых водорослей.

В результате исследования бактерий, ассоциированных с поверхностью водорослей бурой водоросли *Fucus vesiculosus* и красной – *Delesseria sanguinea* из Кильского залива Балтийского моря было выделено 166 штаммов (Goeske et al., 2013). Наибольшее их число принадлежало бактериям, относящимся к классам *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*. Среди группы *Bacteroidetes* отмечались представители родов *Algoriphagus*, *Cellulophaga*, *Cyclobacterium*, *Formosa*, *Maribacter*, *Olleya*, *Tenacibaculum*, *Winogradskyella* и *Zobellia*. Протеобактерии (как альфа-, так и гаммапротеобактерии) были представлены родами *Hoeflea*, *Labrenzia*, *Paracoccus*, *Pseudorhodobacter*,

Sulfitobacter, *Thalassobacter*, *Aeromonas*, *Cobetia*, *Glaciecola*, *Marinomonas*, *Microbulbifer*, *Pantoea*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Rheinheimera*, *Shewanella*, *Vibrio* *Aeromonas*, *Cobetia*, *Glaciecola*, *Marinomonas*, *Microbulbifer*, *Pantoea*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Rheinheimera*, *Shewanella* и *Vibrio*. Среди *Firmicutes* обнаружены *Bacillus* и *Paenibacillus*, а *Actinobacteria* – *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Microbacterium* и *Salinibacterium*.

Бетапротеобактерии (*Hydrogenophaga*) были обнаружены лишь на фукусе.

В работе Лакнита с коллегами, которые исследовали фукус пузырчатый из той же акватории (Кильский залив) наблюдались схожие результаты (Lachnit et al., 2013). Доминантными группами были *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*. Также отмечена большая доля цианобактерий.

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

Представители этого рода также доминировали на талломах *Monostroma nitridium*, *Enteromorpha linza*, *Ascophyllum nodosum*, *Polifonia lanosa* и *Porphyra suborbiculata* (Chan, McManus, 1969). Нужно отметить, что, несмотря на их доминирование, на талломах водорослей наблюдались сезонные изменения количественных и качественных показателей сообществ ЭБ, связанные с изменениями условий среды в различные сезоны. Кроме того, относительная доля представителей этих бактерий в воде была довольно мала (Bolinches et al., 1988).

На всех видах ламинарии, произрастающих в Северном море, были обнаружены культивируемые ЭБ родов *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* и *Acinetobacter*. На двух видах ламинарии, *S. latissima* и *L. hyperborea*, были встречены представители группы *Alphaproteobacteria*, а на *L. hyperborea* – *Proteobacteria* (Oberbeckmann et al. 2007).

При изучении патогенных микроорганизмов бурой водоросли *Laminaria religiosa*, взятой для анализа из Японского моря в районе города Отару, на

разных питательных средах с поверхности здоровых листовых пластин было выделено семь видов бактерий: *Alcaligenes aquamarinas*, *Alteromonas sp.*, *Azomonas agilis*, *Azotobacter beijerinckii*, *Escherichia coli*, *Halobacterium sp.* и *Halococcus sp.* С талломов ламинарии, на которых развивались патогенные для водорослей микроорганизмы, были изолированы также представители вида *Erwinia amylovora* (Vairappan et al, 2001). При этом предполагается, что *Alteromonas sp.*, *Halococcus sp.* и *Alcaligenes aquamarinas* могут выступать и в качестве возможных фитоопатогенных микроорганизмов.

С поверхности *Saccharina japonica* (ранее – *Laminaria japonica*) выращенной на ферме в Ма-Шань, (провинция Шаньдун, Китай), было выделено на среде Зобелла 2216Е 42 штамма грам-отрицательных морских ЭБ (Zifeng et al, 2009). На основании генетического анализа было установлено, что они принадлежали к родам *Pseudoalteromonas* (61,9%), *Vibrio* (28,6%), *Halomonas* (7,1%) и *Bacillus* (2,4%). При этом обнаружено, что представители трех первых родов могут вызывать заболевания спорофита.

Микробное сообщество морского макрофита *Chordaria flagelliphormis* было представлено, в основном грамотрицательными бактериями (различными видами псевдомонад и *Flavobacterium sp.*). На поверхности другого макрофита, *Desmarestia viridis* доминировали грамположительные бактерии, в основном, различные виды бацилл. В небольшом количестве встречались артробактерии и агромицеты, из грамотрицательных - псевдомонады. Предполагается, что для отмеченных выше видов бурых водорослей существует специфичность таксономического состава ЭБ (Беленева, Жукова, 2006).

Что касается некультивируемых форм ЭБ, то в составе эпифитных бактериоценозов морской травы *Zostera marina* из Японского моря присутствовали актинобактерии, включая *Micrococcus/Halobacillus*, фирмикуты с низким Г+Ц в ДНК (*Bacillus/Halobacillus*), цитофаги (*Cytophaga*), флавобактерии (*Flavobacterium*) и протеобактерии (среди которых были представители *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter*, *Marinobacterium*, *Fundibacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Shewanella*, *Vibrio*). Гетеротрофные грамотрицательные

бактерии являлись доминантами и составляли до 80% от общего количества ЭБ. Таксономический состав ЭБ zostеры зависел от того, из какой морфологической части таллома были взяты пробы для анализа и от возраста исследуемой части листа морской травы. Представители *Flavobacterium*–*Cytophaga*–*Bacteroides*–*Flexibacter* присутствовали на всех частях морской травы и составляли 30 – 55% от общего числа ЭБ. Аэробные протеобактерии родов *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter*, *Marinobacterium* доминировали в филлоплане старых листьев и ризоплане корней (они составляли в этих местообитаниях 56 – 65% соответственно). Несмотря на то, что на поверхности молодых листьев наблюдалось минимальное количество ЭБ, среди них были идентифицированы представители всех изученных таксономических групп, при этом количество актинобактерий было максимальным (12%), а аэробных протеобактерий – минимальным (8%). Факультативно-анаэробные дидермные бактерии родов *Bacillus*/*Halobacillus* были выделены с поверхности стебля молодых и зрелых листьев. Однако эти два местообитания преимущественно были колонизированы бактериями родов *Flavobacterium* и *Cytophaga*. По мере старения листовых пластин и снижения общей численности ЭБ представители этих родов заменялись протеобактериями (Куриленко и д.р., 2001).

Таким образом, данные большинства рассмотренных литературных источников свидетельствуют, что видовой состав эпифитных бактерий часто бывает специфичен, зависит от вида исследуемого макрофита, расположения анализируемой части его таллома и сезона проведения исследований. Утверждается, что эволюционно близкие виды водорослей и даже виды, занимающие сходные экологические ниши, вовсе не обязательно будут иметь одинаковую структуру бактериальных сообществ. И напротив, достаточно далекие в эволюционном, генетическом и экологическом отношении виды могут иметь схожую таксономическую структуру бактериоценозов (Lachnit et al., 2009; Hollants et al., 2013).

1.6. Проблемы выбора методики при учете численности эпифитных бактерий.

Одной из главных методологических проблем при изучении ЭБ, в отличие от работ, связанных с группами свободноживущих бактерий, является отсутствие единого метода десорбции бактериальных клеток с поверхности таллома макрофита.

Разнообразие методик, используемых для этих целей разными специалистами, затрудняет сравнение результатов их исследований.

В настоящее время существует несколько наиболее распространенных методик для удаления бактерий с поверхности растительного субстрата. Это метод тотальной гомогенизации исследуемого образца (Москвина, 1991; Bolinches et al, 1988; Lalke-Porczyk, Donderski, 2003; Zifeng et al, 2009; Jutta et al, 2009), метод снятия бактерий при помощи стерильного ватного аппликатора или шпателя (Jensen et al, 1996; Vairappan et al, 2001), разной продолжительности и интенсивности механическое встряхивание субстрата в жидкой среде (Макаревич, 2004; Перетрухина, 2006; Wang et al, 2008). Теоретически, по примеру обработки проб почв, возможна также ультразвуковая обработка образца макрофита (Звягинцев, Галкина, 1967, Звягинцев, 1970). При этом необходимо правильно подобрать режим такой обработки, чтобы не разрушить бактериальные клетки, что может снизить численность бактерий при их последующем количественном учете.

Метод гомогенизации основан на механическом размельчении образца при помощи различных приборов (миксера – диспергатора, гомогенизатора, мельницы и т.д.). После такой обработки измельченный субстрат постепенно оседает, а оставшаяся над ним суспензия бактериальных клеток используется для дальнейших исследований.

В работе М.И. Москвиной основной акцент делался на учете численности конкретной группы микроорганизмов (азотфиксирующих бактерий) и изучении их физиолого-биохимических свойств. Определение общей численности ЭБ на

поверхности талломов водорослей в этой работе проводили методами сканирующей и эпифлюоресцентной микроскопии.

В работах Д. Болинчеса с соавторами и Вонга с коллегами метод гомогенизации был использован для удаления ЭБ с поверхности морских водорослей и исследования таксономической структуры их ценозов (Bolinches et al, 1988, Wang et al, 2009).

При изучении пресноводных растений озера Езёрак проводили определение ОЧБ по прямому счету и численности гетеротрофных бактерий по посеву на питательные среды (Lalke-Porczyk, Donderski, 2003). Результаты этих работ были приведены выше в разделе 1.5.

В работах Енсена с соавторами (Jensen et al, 1996) и Вайрапана с соавторами (Vairappan et al, 2001) был использован метод удаления бактериальных клеток с поверхности водорослей при помощи ватного аппликатора. Для этого небольшую площадь (как правило 1 – 2 см²) растительного субстрата протирали ватным аппликатором. Аппликатор затем помещали в стерильную воду, из которой после встряхивания производили посев аликвоты на питательные среды. В первом случае (Jensen et al, 1996) основной целью работ было определение возможности роста и поддержания жизнедеятельности ЭБ на питательных средах. Во втором (Vairappan et al, 2001) проводили сравнение состава доминирующих форм ЭБ на больных и здоровых талломах водорослей и определяли возможность их культивирования на питательных средах.

Все перечисленные выше методы имеют как положительные стороны, так и существенные недостатки. Так как все они основаны на механическом удалении бактерий с поверхности субстрата, то велика вероятность повреждения и гибели бактериальных клеток, что также может сказаться на результатах, особенно при учете бактерий на питательных средах. Так, например, неправильно подобранный режим обработки субстрата ультразвуком приводит к гибели значительного числа клеток. При гомогенизации в пробу вместе с бактериями попадает и внутреннее содержимое субстрата, на котором они находятся, в нашем случае – содержимое

талломов фукуса. Это может исказить результаты анализа численности ЭБ отдельных физиологических групп, например – углеводородокисляющих.

При использовании более щадящих методов удаления ЭБ с поверхности макрофитов, таких как применение ватных аппликаторов, часть клеток ЭБ может остаться на субстрате.

Поэтому при выборе метода десорбции ЭБ для их последующих качественных и количественных анализов следует руководствоваться, прежде всего, целями, которые необходимо достигнуть в результате этих исследований. Значимость подбора правильного метода остается довольно высокой, поскольку от этого зависит точность конечных результатов исследования.

Еще одним фактором, затрудняющим количественное изучение эпифитных бактериоценозов, является отсутствие единых единиц измерения численности ЭБ. При подсчете ЭБ в качестве таких единиц измерения используются: число клеток на квадратный сантиметр (кл/см²) (Chan, McManus, 1969; Tornblom, Sondergaard, 1999; Lalke-Porczyk, Donderski, 2003; Oberbeckmann et al., 2007), количество клеток на единицу массы водоросли (кл/г) (Chan, McManus, 1969), количество колониобразующих единиц единицу массы (КОЕ/г) (Chan, McManus, 1969).

При культивировании бактерий на жидких питательных средах удобнее использовать в качестве единиц измерения кл/см² той части таллома, с которой проводили смыв ЭБ, либо кл/г, в случае, если используется метод гомогенизации таллома. При учете бактерий на плотных средах как правило учитывают количество колониобразующих единиц в смыве с единицы поверхности субстрата (КОЕ/см²) или в грамме гомогенизированного субстрата (КОЕ/г).

При определении ОЧБ по прямому счету подсчитывают количество клеток ЭБ на квадратном сантиметре поверхности таллома. Для этого обычно используют метод люминесцентной микроскопии. В этом случае необходимо учитывать структуру поверхности исследуемого растительного субстрата, поскольку часть клеток ЭБ может находиться в его складках и трещинах и потому оставаться невидимой.

1.7. Общая характеристика районов исследования.

Баренцево море. Эта акватория, расположенная между северным берегом Европы и островами Вайгач, Новая Земля, ЗФИ, Шпицберген, и Медвежий, свободно сообщается с теплым Норвежским морем на западе и холодным Арктическим бассейном, Карским и Белым морями на востоке.

Площадь Баренцева моря составляет 1405 тыс.км², средний объем воды - 282 тыс.куб.км, средняя глубина 200 м.

В восточной части Кольского полуострова берег изобилует многочисленными мелкими бухтами и заливами. Глубина в таких бухтах составляет не более 20 – 30 м, грунт скальный, валунный и песок.

Несмотря на то, что Баренцево море относится к бассейну Северного Ледовитого океана, оно никогда не замерзает полностью. В зимний период около 1/4 его площади остается свободной ото льда. Это объясняется притоком теплых атлантических вод, препятствующих охлаждению поверхностного слоя Баренцева моря.

Наличие льда в прибрежных водах в отдельные годы отмечено за счет его приноса ветровыми течениями из восточных или северных районов моря в конце зимнего сезона, в феврале – апреле (Черновская, 1956).

Термический режим Баренцева моря формируется под воздействием материка. Колебания температуры воды могут составлять до 10 °С. При этом, четко прослеживается сезонная динамика в изменении температурного режима прибрежных вод, что является лимитирующим фактором для развития организмов (Богоров, 1967, 1974). В прибрежных водах выделяются два сезона: зимний (ноябрь - апрель) и летний (вторая половина июня - сентябрь). Минимальные значения температур воды (до -1.7°C) наблюдаются в конце февраля – начале марта (Бардан и др., 1988, 1989) в бухтах и заливах восточной части Баренцева моря, где за счет влияния материка происходит охлаждение водных масс.

Рельеф дна неоднороден, пересечен подводными возвышенностями, впадинами и желобами. В связи с этим он играет значительную роль в

формировании гидрологического режима.

Одной из характерных черт гидрологии Баренцева моря является хорошее перемешивание его вод. С этой особенностью моря тесно связано содержание и распределение растворенных в его водах газов и биогенных веществ. В результате воды моря хорошо аэрированы, а содержание кислорода в толще воды по всей площади моря близко к насыщению (Баренцево море, 1990).

Водные массы Баренцева моря неоднородны и формируются под совокупным влиянием энергообмена с атмосферой и циркуляции вод (Яковлев, 1961). Поступление вод из других бассейнов и неровный подводный рельеф создают весьма сложную систему поверхностных и глубинных течений, в которой ведущую роль играют многочисленные ветви Нордкапского течения и холодные воды, идущие из Арктического бассейна и Карского моря.

На систему постоянных течений накладываются периодические приливные течения, скорость которых в поверхностном слое достигает 150 см/с и, как правило, превышает скорость постоянных течений. Приливные волны с запада и с севера вызывают также значительные изменения уровня Баренцева моря. Приливоно - отливные колебания уровня моря достигают максимальных амплитуд в среднем от трех метров на западе до четырех на востоке района, вызывая тем самым периодические течения со скоростями, намного превышающими постоянные течения (Танцюра, 1959). У южных берегов высота подъема уровня при приливе достигает 3 – 6 м, а на севере и северо – востоке 0,5 – 2,0 м.

Соленость Баренцева моря формируется под воздействием Мурманского течения и материкового стока, и имеет ярко выраженный сезонный характер. Максимум солености приходится на зимний период, когда материковый сток ограничен, и составляет около 34,5‰ (Елшин, 1979). В летний период соленость может падать до 22 ‰ (Широколобов, 2004).

Кольский залив. Кольский залив по структуре представляет фьорд, и по своим физико-географическим характеристикам не отличается от других фьордов, образующих береговую линию Норвежского и Баренцевого морей.

Между Кольским заливом и Баренцевым морем существует интенсивный водообмен. Это подтверждается тем, что основная часть водных масс залива сформирована солеными водами атлантического происхождения. Постоянному водообмену залива с открытой частью Баренцева моря способствует наличие течений, которые обеспечиваются приливно-отливными циклами. Приливы охватывают всю водную толщу Кольского залива, вплоть до максимальных глубин (200 – 300 м). Наиболее сильные приливные течения отмечаются в вершине залива и устье р. Туломы. Здесь же возможны и наибольшие скорости стоковых течений. В среднем и северном коленах скорости течений невелики, так как площадь сечения залива здесь возрастает и в результате объем вод при приливах меняется незначительно.

При взаимодействии речного стока и океанических вод в поверхностном слое залива формируются отчетливо выраженные термоклин и галоклин. Такая стратификация вод наиболее характерна для весенне-летнего периода. Со стороны впадающих в залив рек находится зона солоноватых (0 – 25 ‰) вод. Далее по направлению к открытой части залива степень опреснения морских вод уменьшается и располагается зона распресненных (25 – 30 ‰) вод. У морской границы залива соленость поверхностных вод составляет 30 – 33.5 ‰ (Кольский залив, 2009).

Губа Зеленецкая (69°07'09" с.ш., 36°05'35" в.д.). Губа относится к закрытому типу губ. От открытого моря она защищена группами островов (острова Немецкий, Кречетов, Жилой, Сухой, Безымянный). Губа имеет практически квадратную форму, в поперечнике достигает около 2 км. В южной части губы можно выделить 2 бухты – юго-западную (бухта Оскара) и значительно превосходящую по размерам юго-восточную бухту. Во второй бухте кутовая часть занята обширным песчаным пляжем (Дальний пляж). В эту часть бухты впадает ручей, вытекающий из Дальнезеленецкого озера. Глубины ее не превышают 15 – 18 м. Субстрат в средней части губы преимущественно илисто-песчаный с небольшим количеством средних и мелких камней, в проливе имеются выходы скальных пород (Ушаков, 1948; Пригоровский, 1948; Лоция,

1983).

Соленость в губе в течение всего года держится достаточно высокой, в целом соответствует океанической и составляет в среднем 32 – 34‰.

Распространение макрофитов в губе определяется характером дна и типом грунтов. В губе Дальнезеленецкой выделяются несколько типов фаций (Гурьева, 1948; Матвеева, 1948). В западной и центральной частях губы преобладают каменистые фракции с крупными волунами и выходом скальных пород, которые и являются предпочтительным субстратом для роста и развития макрофитов.

В западной части губы Зеленецкой увеличивается сила прибоя, уклон составляет от 45 до 60°. Более открытый характер сказывается на изменении ассоциаций макрофитов.

В районе Дальнего пляжа (юго-восточная часть губы) преобладают фации мягких грунтов. В бухте Оскара отмечается смешанное распределение грунтов, с преобладанием илистого песка и глины, хорошо выражена слоистость грунта. Опресняющее действие ручья незначительно (Пригоровский, 1948).

1.8. Общая характеристика объектов исследования.

Fucus vesiculosus. Бореально – арктический вид, распространен в Атлантическом и Северном Ледовитом океанах. В России встречается в Белом, Баренцевом и Балтийском морях.

Фукусовые водоросли достаточно крупные водоросли с мощным слоевищем в виде крупных кустов до 100 см высоты, с плоскими ветвями, со срединной жилкой, с ровными или слегка волнистыми краями, дихотомически и неправильно разветвленными, обычно с парными пузырями, прикрепляется подошвой (Рис. 3). Рецептакулы округлые и овальные, простые и вильчатые, образуются на концах ветвей. Растения однополые. Рост апикальный.



Рисунок 3. Таллом *F. vesiculosus*.

Наряду с ламинариевыми, фукусовые водоросли являются самыми высокоорганизованными. Выделяются несколько слоев клеток, которые по мнению ряда авторов могут представлять собой примитивные ткани, формирующие таллом (Зинова, 1953; Петров, 1974; Камнев, 1989).

F. vesiculosus широко распространен, и является доминирующим видом водорослей в литоральной зоне Баренцева моря. Объясняется это высокой устойчивостью к воздействию неблагоприятных факторов (Воскобойников, 2004; Воскобойников и др., 2006).

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

2.1. Отбор и обработка проб.

2.1.1. Отбор и обработка проб водорослей *F. vesiculosus*.

Объектом исследования были бурые водоросли *Fucus vesiculosus* L. (*Phaeophyta*), доминирующие на литорали Баренцева моря и, согласно имеющимся данным (Воскобойников, 2006), обладающие высокой степенью устойчивости к нефтяному загрязнению.

Талломы фукусов отбирали на литорали акватории Баренцева моря на трех станциях (Рис. 4.): в губе Зеленецкой, в районе биостанции ММБИ КНЦ РАН (поселок Дальние Зеленцы), на западном берегу Кольского залива, в районее посёлка Абрам-Мыс (68°58' с.ш., 33°01' в.д.), входящего в состав Первомайского округа города Мурманска, а также в Мурманском морском порту, в районе Морского вокзала (68°58' с.ш., 33°03' в.д.).

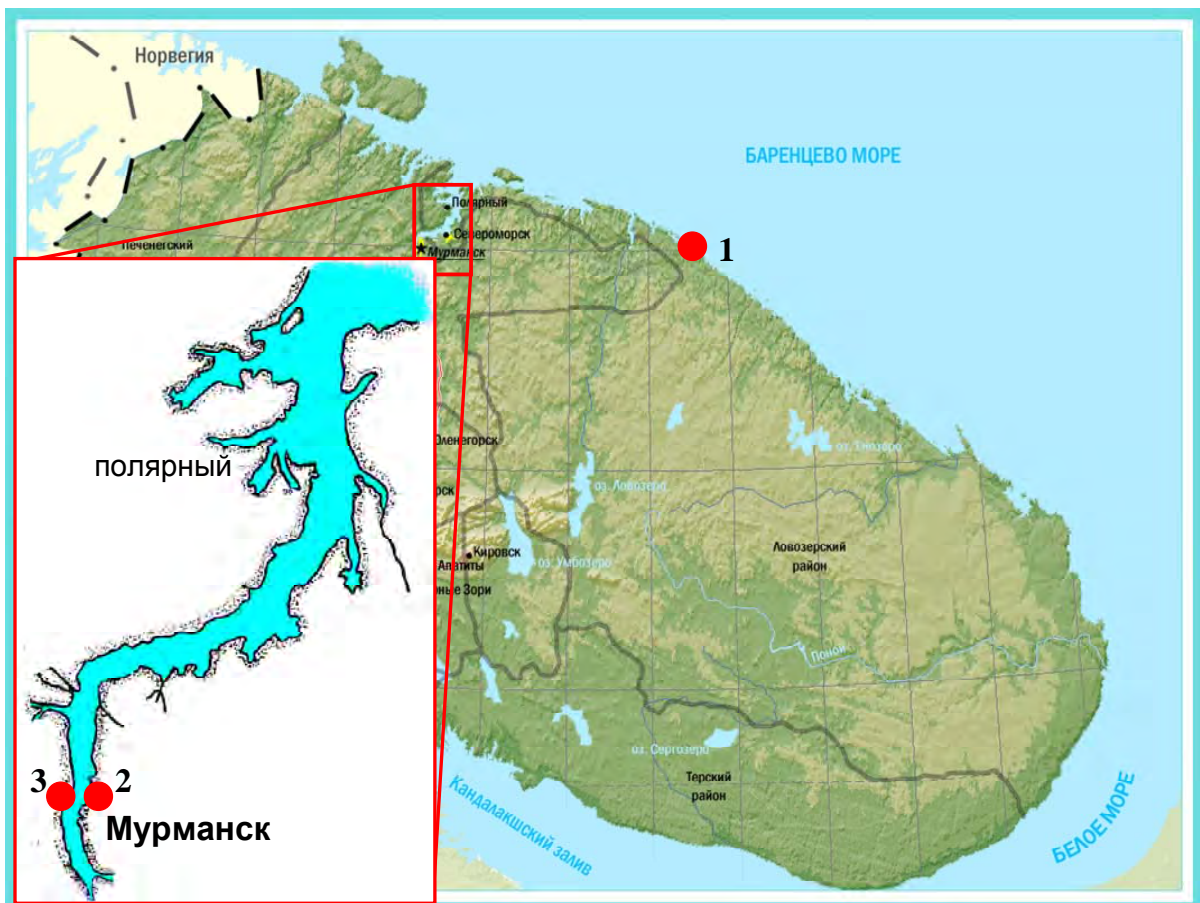
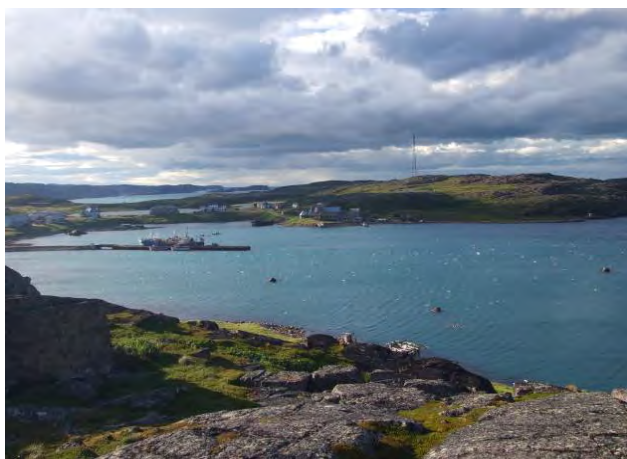


Рисунок 4. Станции отбора проб.

Выбор именно этих станций для отбора проб фукусов был обусловлен их различной степенью загрязнения морской среды нефтепродуктами.

Станция губа Зеленецкая, район поселка Дальние Зеленцы (Ст.1 – ДЗ) характеризуется практически полным отсутствием НУ в прибрежных водах, что позволяет использовать ее в качестве контрольной точки (Рис.5, А).



А.



Б.



В.

Рисунок 5. Районы отбора проб: А – губа Зеленецкая (район поселка Дальние Зеленцы); Б – участок литорали в районе Морского вокзала (Мурманск); В – литораль в районе поселка Абрам-мыс.

Станция 2 – Мурманский морской порт в районе морского вокзала (далее – МП) расположен в черте города Мурманска на восточном побережье южного колена Кольского залива. Характеризуется ярко выраженным многолетним нефтяным загрязнением за счет хронических утечек нефтепродуктов (керосин,

мазут), которые под действием приливоно – отливных процессов выносятся на берег и оседают на водорослях, обитающих в этой зоне (Рис.3, Б).

Станция Абрам-мыс (Ст. 3 – АМ) расположена на противоположном от Ст. 2 берегу Кольского залива (Рис. 5, В). Отличается меньшей степенью загрязнения по сравнению со ст. 2. Однако на этой станции могут наблюдаться отдельные несистематические единовременные сбросы нефтепродуктов в среду.

Для исследований отбирали апикальные, центральные и нижние части 2-х или 3-х летних талломов (имеющих от 4-х до 6-ти ветвлений).

Пробы водорослей отбирали в стерильные емкости (стеклянные или полипропиленовые стаканы) объемом до 1 л. При выборе талломов обязательным условием было отсутствие обрастателей на их поверхности.

Пробы талломов доставляли в лабораторию ММБИ, а их микробиологический анализ проводили не позднее, чем через 4 часа с момента отбора. Эти работы проводили в стерильных условиях.

Для удаления неприкрепленных бактерий, в стерильном боксе стерильными ножницами отрезали небольшие участки таллома водоросли размером не менее 1 см², их помещали в стеклянные стаканчики на 100 мл, содержащие около 50 мл стерильного изотоничного раствора NaCl соответствующей концентрации и несколько раз встряхивали. В некоторых случаях отрезанные участки таллома с двух сторон обмывали с помощью стерильной пипетки или шприца струей проточной стерильной морской воды

Обмытые участки таллома тщательно протирали стерильными ватными аппликаторами типа «ушных палочек» (Jensen et al., 1996) и фотографировали цифровым фотоаппаратом Casio Exilim Pro EX-P505 для последующего точного определения размеров обработанной площади талломов. После этого вату с ушных палочек снимали стерильным пинцетом или срезали ножницами и помещали в стерильную склянку с 10 мл стерильной морской воды, предварительно несколько раз профильтрованной через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм и встряхивали на вортексе в течение 3-5 минут. Полученный смыв

содержал суспензию эпифитных бактерий, в дальнейшем его использовали в качестве посевного материала.

Для определения ОЧБ смыв содержащий суспензию бактерий фиксировали 40%-ным формалином, профильтрованным через мембранный фильтр с диаметром по 0,22 мкм.

Для точного определения площади обработанного фрагмента таллома водоросли использовали программу VideoTest.

2.1.2. Отбор проб воды для микробиологического анализа.

Пробы воды отбирали с глубины около 0,5 – 1 м с помощью стерильного батометра-бутылки. Отбор проб производили с борта резиновой надувной лодки. Анализы проводили не позже 2-х часов после отбора пробы воды в стационарной лаборатории.

2.2. Подготовка материала для электронно-микроскопических исследований.

Все приведенные в настоящей работе электронно-микроскопические фотографии были получены Воскобойниковым Г.М.. согласно стандартным и модифицированным для водорослей методикам (Воскобойников, Титлянов, 1978; Уикли, 1975). Из разновозрастных частей таллома *Fucus vesiculosus*, отобранных в чистых и загрязненных нефтью местах обитания, делались высечки площадью около 0,25 см². Для просмотра в трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ) JEM-1011 (JEOL) при ускоряющем напряжении 80KV высечки фиксировались в 2,5% глутаровом альдегиде на 0,1 н какодилатном буфере при рН = 7,2 – 7,4. При приготовлении фиксатора в раствор добавляли танин (1,5 %). Далее для изучения образцов в ТЭМ выполняли их отмывку в буфере и постфиксацию 1% OsO₄ на том же буфере. Фиксаторы и буфер для отмывки были изотоничны среде обитания водорослей (1200 мосм), что достигалось добавлением в раствор сахарозы. Все операции имели продолжительность 24 часа, проводились при температуре +3 – +5 градуса С.

Дегидратацию осуществляли в спиртах восходящей концентрации: 30%-50%-70%-80%-90%-100% по 2 повторности x 5 мин в каждой. Далее в смеси 100% спирта и 100% ацетона – 20 мин, и 3 повторности в 100% ацетоне по 20 мин.

Пропитку и заливку экспериментального материала в эпоксидных смолах осуществляли по схеме, предложенной Уикли (1975).

Для изучения тонкой структуры срезы толщиной 20-30 нм, полученные на ультрамикротоме Reichert UM-2, контрастировали цитратом свинца, а затем просматривали в ТЭМ.

Для просмотра в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) - JSM-6510LV (JEOL) при ускоряющем напряжении 30KV, детектор SEI образцы водорослей после фиксации глутаровым альдегидом размещали на «столиках» и напыляли золотом: напылительная установка JFC-1600 (JEOL).

2.3. Подготовка и проведение лабораторных экспериментов по определению углеводородокисляющей способности эпифитных бактерий фукуса.

Емкости объемом 3 л, содержащие морскую воду с ДТ (1 мл/л морской воды) и водорослями, устанавливали в термостатируемом помещении при температуре 6 – 8° С, Циркуляцию и аэрацию воды создавали при помощи аквариумных компрессоров. Во избежание чрезмерного испарения ДТ из опытных емкостей, их накрывали капроновыми крышками негерметично (для оттока излишков воздуха).

Определение микробиологических показателей и оценку физиологического состояния водорослей и определение концентрации НУ проводили в первые сутки, затем - на 7, 14 и 21 сутки. В эксперименте использовали водоросли имеющие 5 – 6 ветвлений (2+ года). В каждую емкость помещали по 1 таллону.

Экстракцию нефтепродуктов проводили при помощи гексана из расчета 10 мл/100 мл воды. Концентрацию НУ в емкостях определяли на приборе Флюорат 02-3М («Люмэкс», Санкт-Петербург).

2.3.1. Определение изменения численности бактерий.

Определение микробиологических показателей (НВЧ) проводили при помощи жидких питательных сред ММС и среды Зобелла (см. п. 2.4.1.).

2.3.2. Определение физиологического состояния водорослей в эксперименте.

Определение физиологического состояния водорослей производилось совместно со ст.н.с. лаборатории альгологии ММБИ КНЦ РАН к.б.н. Рыжик Инной Валериевной.

2.3.2.1. Определение интенсивности фотосинтеза.

Интенсивность видимого фотосинтеза определяли йодометрическим методом по Винклеру (Лурье, 1973), по изменению содержания кислорода за период инкубации в емкостях с водой, в которых находились водоросли. Для этого целое растение массой около 6 г. помещали в стеклянную колбу (1,5 л) на 1 час. В качестве контроля использовали колбу без растения. Интенсивность фотосинтеза рассчитывали в мкг O₂ на 1 г сырой массы таллома в час.

2.3.2.2. Определение метаболической активности клеток водорослей.

Метаболическую активность клеток *Fucus vesiculosus* L. анализировали в апикальной (наиболее функционально активной) части талломов. На 1 пробу из верхушек экспериментальных водорослей пробковым сверлом (d = 5 мм) брали по 1 – 2 высечки общей массой 15 – 20 мкг. Для оценки статистической достоверности получаемых результатов анализировали 15 проб (Рыжик, 2013).

Подготавливали 5% раствор МТТ в 12 mM трис-НСl-буфере (pH=7,5). Для экспериментов в каждую пробу вносили 200 мкл исходного раствора МТТ и инкубировали в течение 4 часов при температуре 18°C в полной темноте, периодически перемешивая. Затем пробу переносили в изопропанол на 2 часа для экстракции формазана. Экстракт центрифугировали при 3000 оборотов в течение 5 минут. Далее измеряли оптическую плотность (на чем?) при длине волны 570

нм. против вытяжки проб, инкубированных в морской воде без МТТ. МАК рассчитывал не единицу площади высечек.

2.4. Микробиологический анализ эпифитных бактерий водорослей *F. vesiculosus*.

2.4.1. Определение численности культивируемых микроорганизмов методом предельных разведений.

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

для СБ – модифицированной среды Зобелла 2216Е (Практическая гидробиология, 2006) следующего состава (г): пептон - 5,0; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,084; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,185; NaCl – 24,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; KCl – 0,7; дрожжевой экстракт – 1,0; вода дистиллированная – 1 л.; в отдельных случаях в экспериментальном порядке вместо среды Зобелла использовали рыбо-пептонный бульон (РПБ);

для УОБ – среды ММС: NaCl – 7,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; KCl – 0,7; K_2HPO_4 – 2,0; Na_2HPO_4 – 3,0; NH_4NO_3 – 1,0; вода дистиллированная – 1,0 л (Mills et al 1978). В качестве единственного источника углерода и энергии в каждую пробирку со средой (4,5 мл) добавляли 2 капли стерильного дизельного топлива марки «летнее» (Коронелли, Ильинский, 1984).

Посевы на среде Зобелла инкубировали 1,5 – 2 недели, на среде ММС – около 3-х недель при температуре, приближенной к природной. Определение наиболее вероятного числа бактерий проводили с использованием таблиц Мак – Креди (Практикум по микробиологии, 1976).

Численность эпифитных бактерий в смывах с талломов пересчитывали на 1 cm^2 их поверхности.

2.4.2. Определение общей численности бактерий по прямому счету.

Определение ОЧБ проводили на микроскопах ЛЮМАМ ИЗ и Carl Zeiss Axio Imager 2 методом эпифлюоресцентной микроскопии с использованием красителя акридиновый оранжевый (Ильинский, 1995; Ильинский, 2006). Бактерии предварительно концентрировали на поверхности черных мембранных нефлюоресцирующих фильтров Osmonics (США), либо черных поликарбонатных нефлюоресцирующих мембранных фильтрах Millipore с размером пор 0,22 мкм. Под микроскопом просчитывали не менее 40 полей зрения.

Пересчет бактерий в 1 мл производили по формуле (Романенко, Кузнецов, 1974):

$$X = \frac{e \cdot 10^6 \cdot \delta}{a \cdot \text{ж} \cdot z}$$

где X – количество бактерий в 1 мл воды; e – площадь фильтра, мм²; 10^6 – переводной коэффициент (мм² в мкм²); δ – сумма подсчитанных бактерий в полях зрения z ; a – площадь (в мкм²) окулярного сетчатого микрометра при том же увеличении; ж – объем профильтрованной пробы воды, мл; z – число полей зрения, в которых подсчитывали бактерий на площади a .

Численность бактерий пересчитывали на 1 см² таллома водорослей.

2.4.3. Выделение чистых культур культивируемых углеводородокисляющих микроорганизмов.

После появления видимого роста микроорганизмов на жидких питательных средах осуществляли высеивание из первого и последнего положительных разведений на агаризованную среду ММС с добавлением дизельного топлива (ДТ). После появления колоний материал из них переносили на косяки со средой ММС и ДТ. Все выделенные культуры проверяли на чистоту и затем использовали для таксономического исследования.

2.4.4. Предварительная идентификация чистых культур углеводородокисляющих бактерий.

Идентификацию УОБ проводили на основании культуральных, морфологических и физиолого-биохимических признаков (Практикум по микробиологии под ред. Н.С. Егорова, 1976).

2.5. Определение таксономического состава планктонных и эпифитных бактериоценозов с использованием комплекса молекулярно-генетических методов.

2.5.1. Идентификация штаммов чистых культур углеводородокисляющих бактерий с помощью анализа их 16S рРНК

Анализ 16S рРНК выделенных штаммов УОБ был проведен с целью уточнения их систематического положения. Он был выполнен в ФГУП ГосНИИ Генетика - ВКПМ (г. Москва).

2.5.2. Выделение бактериальной ДНК для последующей идентификации некультивируемых эпифитных бактерий.

Выделение всей бактериальной ДНК эпифитных бактерий фукуса проводили по методу «Total DNA» с помощью фенол-хлороформной экстракции (William, Feil, Copeland, 2012). Клеточные оболочки бактерий разрушали детергентами. Белки экстрагировали смесью фенола, хлороформа и изоамилового спирта. Из-за различий в плотности при центрифугировании лизата бактериальных клеток образовывалось два отдельных слоя: нижний, представляющий собой раствор на основе органических растворителей, и верхний, содержащий водный раствор (Рис. 6). Белки при этом денатурировали и формировали осадок, который располагался на границе раздела водной фазы и фазы органических растворителей. Фенол был уравновешен буфером с нейтральным значением рН, поэтому водная фаза содержала и ДНК, и РНК.

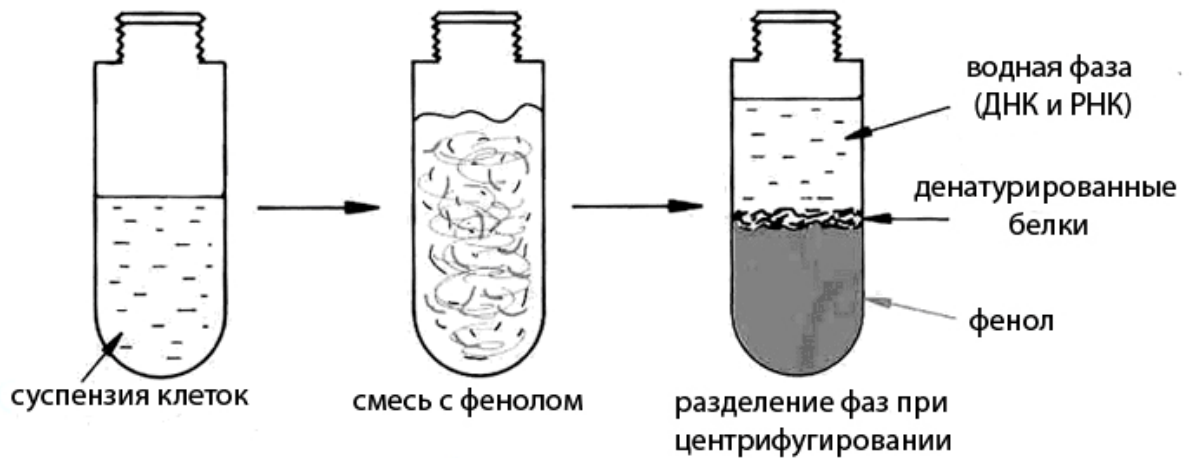


Рисунок 6. Общая схема выделения ДНК эпифитных бактерий фенол-хлороформным методом.

Работы по генетическому анализу эпифитного бактериоценоза проводили при личном участии автора настоящей работы на кафедре молекулярной биологии Арктического университета Норвегии (г. Тромсе) под руководством Ляймера А.Н. и Дженсена Д.

При помощи стерильных ножниц отрезали небольшой фрагмент таллома водоросли. Тщательно протирали поверхность этого фрагмента при помощи ватных аппликаторов. Затем вату помещали в 10 мл ультрафильтрованной (безбактериальной) морской воды. Встряхивали на вортексе в течение 5 минут. После этого полученную суспензию перемещали в пробирки объемом 2 мл и центрифугировали на максимальных оборотах в течение 3-5 минут. Надосадочную жидкость сливали, полученный осадок, содержащий бактериальные клетки, высушивали.

Процесс выделения бактериальной ДНК из сухой биомассы состоял из следующих стадий:

1. Получали суспензию клеток в ТЕ-буфере (10мМ Tris; 1мМ EDTA, pH=8) путем растворения осадка.
2. Для разрушения оболочек у грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий добавляли лизоцим (10 мг/мл). Тщательно перемешивали. Оставляли на 5 мин. при комнатной температуре.

3. Добавляли 10% SDS (40 μ l на 1,5 мл). Тщательно перемешивали.
4. Добавляли протеиназу К (10 мг/мл).
5. Добавляли охлажденный во льду 5M NaCl. Инкубировали в течение 1 ч. при 50 °C.
6. Добавляли СТАВ/NaCl, нагревали до 65 °C. Инкубировали в течение 10 мин.
7. Добавляли смесь хлороформ: изоамиловый спирт (24:1) (0.5ml/1,5мл), тщательно перемешивали. Центрифугировали на максимальных оборотах в течение 10 мин.
8. Водную фазу переносили в другую пробирку.
9. Добавляли смесь фенол: хлороформ: изоамил (25:24:1). Тщательно перемешивали. Центрифугировали на максимальных оборотах в течение 10 мин.
10. Добавляли 0,6 объемов изопропанола в водную фазу (- 20 °C). На 400 мкл необходимо 240 мкл изопропанола.
11. Инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Центрифугировали на максимальных оборотах 15 мин.
12. Промывали осадок 70% этанолом. Центрифугировали 5 мин.
13. Сливали надосадочную жидкость и высушивали осадок при комнатной температуре в течении 5 мин.
14. Растворяли осадок в TE+RNKаза (99 мкл TE + 1 мкл RNK азы (10мг/мл.)
15. Перемещали в стерильную микропробирку, инкубировали при 37 °C в течение 20 мин.

Концентрацию ДНК проверяли на 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (3,8-Диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид) со стандартами концентрации. Чистоту ДНК проверяли на приборе NanoDrop-1000 (ранее NanoDrop, совр. Thermo scientific).

2.5.3. Секвенирование следующего поколения (NGS).

Использовали метод определения последовательностей гипервариабельных участков генов 16S-рРНК, который является самым высокопроизводительным на данный момент. Избранный подход позволяет одновременно определять

множество нуклеотидных последовательностей, что значительно упрощает процесс одновременной работы с разными микроорганизмами (Рис. 7).

В данном методе применяется эмульсионная полимеразно-цепная реакция (эПЦР). Секвенирование проходит в пластинках с ячейками, в которых находятся «бусины» покрытые праймером. Единичные молекулы ДНК, присоединенные к этим бусинам, амплифицируются в каплях воды в растворе масла. При присоединении нуклеотидов к ДНК-цепи происходит вспышка, фиксируемая машиной, в которой проходит процесс (Рис.6).

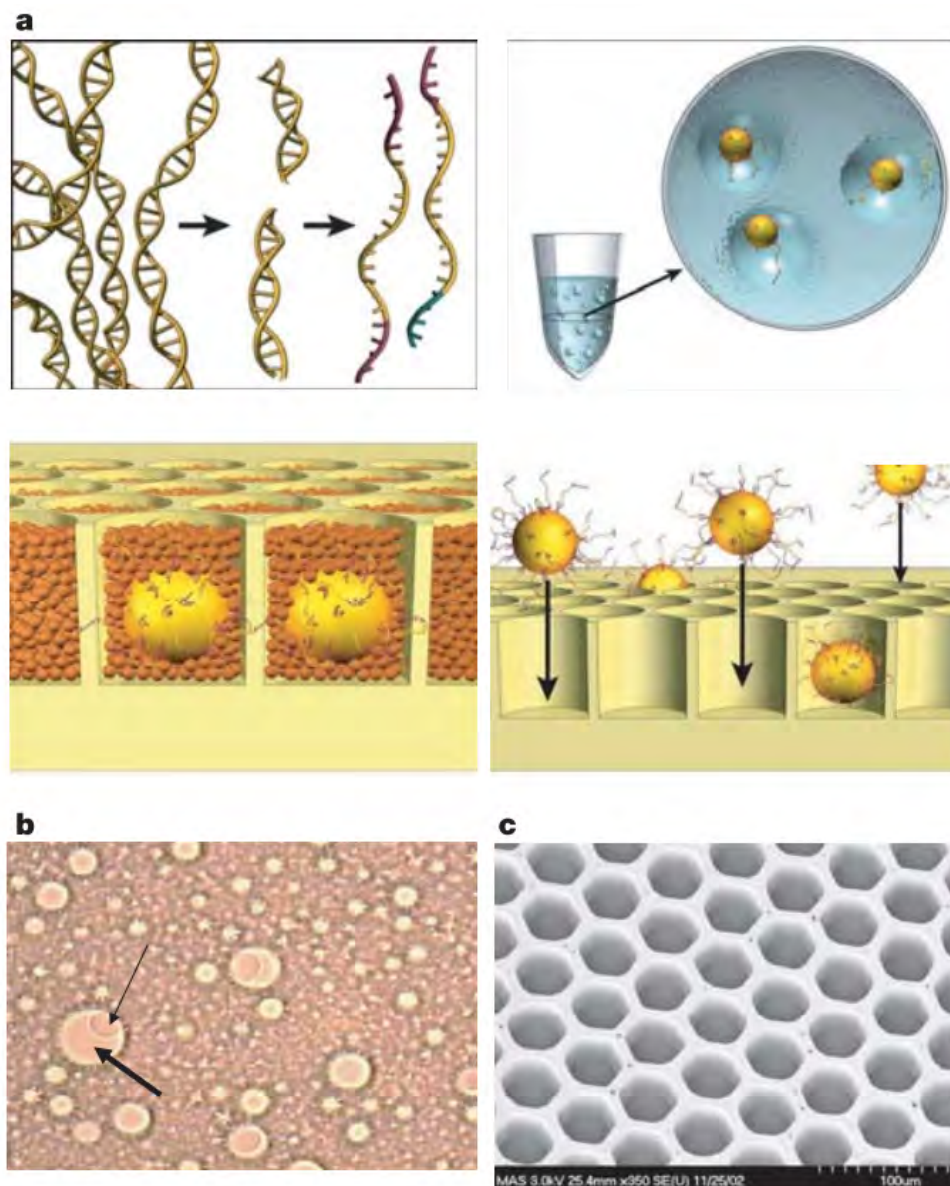
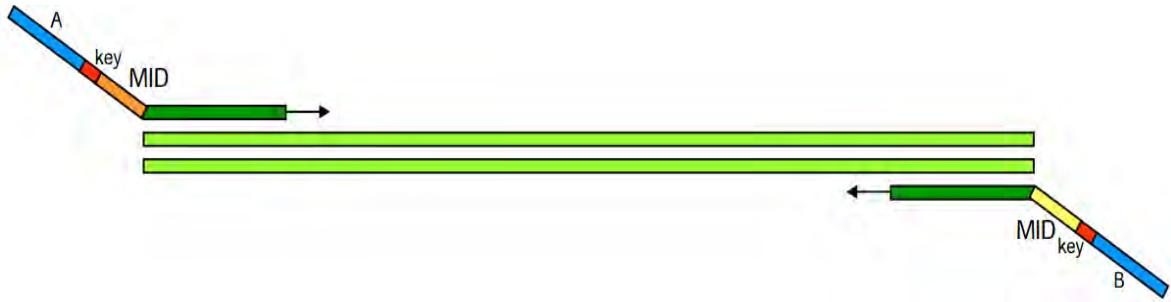


Рисунок 7. Общая схема пиросеквенирования (Marcel Margulies et al. 2005): а – выделенная геномная ДНК фрагментируется, лигируется с адаптерами,

разделяется на одиночные цепи (сверху слева). Одноцепочечные фрагменты молекулы ДНК прикрепляются к бусинам в условиях, стимулирующих попадание лишь одной молекулы на бусину. Отдельные бусины заключаются в капли ПЦР-смеси в масле. Амплификация происходит внутри капель. Количество молекул на бусинке увеличивается в миллионы раз в результате эмульсионной полимеразной цепной реакции (эПЦР) (сверху справа). Эмульсия затем разбивается, и фрагменты ДНК, образовавшиеся в результате эПЦР, разделяются. Бусинки, несущие на своей поверхности миллионы одноцепочечных копий первоначального фрагмента ДНК, помещаются в лунки опто-волоконного слайда, по одной в каждую ячейку (снизу слева). Затем в каждую ячейку добавляются меньшие бусины, несущие на своей поверхности ферменты, необходимые для пиросеквенирования (снизу слева). **б** – микрофотография эмульсии, изображающая «пустые» капли и капли, содержащие бусинки с ДНК-матрицей. Толстая стрелка указывает на 100-мкм каплю, тонкая — на 28-мкм бусинку. **с** — микрофотография фрагмента оптического-волоконного слайда, полученная при помощи сканирующего электронного микроскопа. Видна плакировка оптических волокон и пустые лунки.

Нами использовался один из методов секвенирования следующего поколения – 454-секвенирование, GS FLX Titanium Series Lib-A Chemistry (*Angel, Conrad, 2013*). Секвенирование проводили в компании MacroGen Inc. (Южная Корея), по методике разработанной компанией Roche (Южная Корея).

На этапе, предшествующем секвенированию, производили амплификацию фрагментов ДНК с фрагментами, содержащими специфичный адаптер и код. Данный баркод позволяет различить последовательности, относящиеся к пробам, отобраным в разных районах (Рис. 8). Схожие последовательности объединяются в кластеры - оперативные таксономические единицы (OTU), для этого полученные последовательности сравнивают с международными базами данных (см. п. 2.5.4.). Непрочитанные, а также неполные последовательности отбраковывали.



Прямой праймер (Primer A – key):

5'–CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG - {MID} - ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ–3'

Обратный праймер (Primer B – key):

5'–СТАТГCGCСТТGCCAGCCCGCTCAG - {MID} - ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ–3'

Рисунок 8. Схема построения нуклеотидных последовательностей при пиросеквенировании.

Специфические праймеры, используемые для секвенирования (соответственно для акваторий: губы Зеленецкой – F3, Морского порта – F4, вблизи поселка Абрам-мыс – F5):

F3-MID5	5'	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGTACGGGWGGCWGCA	3'
R3-MID6	5'	СТАТГCGCСТТGCCAGCCCGCTCAGATATCGCGAGGGGTMTСТААТССВКТТ	3'
F4-MID7	5'	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTGTCTCTATACGGGWGGCWGCA	3'
R4-MID8	5'	СТАТГCGCСТТGCCAGCCCGCTCAGCTCGCGTGTCTGGGTMTСТААТССВКТТ	3'
F5-MID9	5'	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAGTATCAGCTACGGGWGGCWGCA	3'
R5-MID10	5'	СТАТГCGCСТТGCCAGCCCGCTCAGTCTСТАТГCGGGGTMTСТААТССВКТТ	3'

2.5.4. Обработка данных, полученных в результате секвенирования.

Для обработки полученных данных использовали программы Microsoft Office 2003, а также онлайн ресурс http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html (Reverse Complement).

Для определения таксономической принадлежности у полученных сиквенсов использовали ресурс 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>).

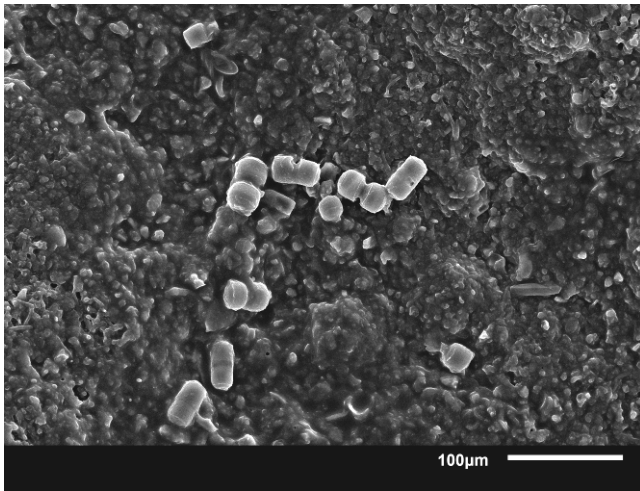
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

3.1. Электронно-микроскопические исследования поверхности водорослей *F. vesiculosus* и эпифитных бактерий.

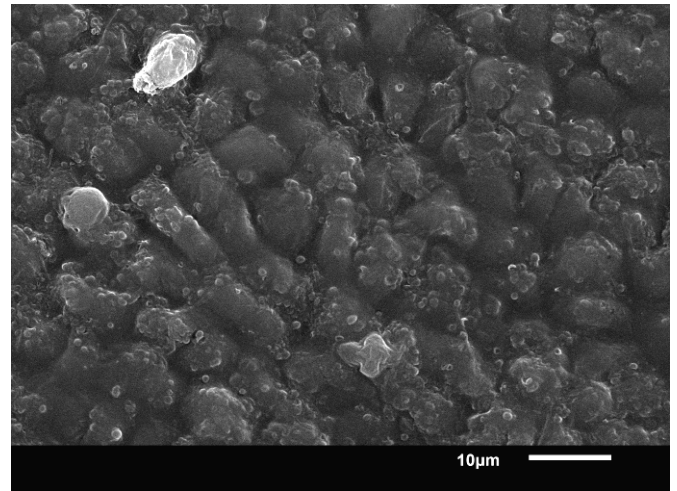
На первом этапе работы одной из главных наших задач был подбор оптимальной методики для удаления бактерий с поверхности водорослей. Для этого было необходимо понять, каким образом бактериальные клетки закрепляются на поверхности макрофитов, что дает возможность определить, какой из методов десорбции позволяет максимально эффективно удалять клетки микроорганизмов. Степень прикрепления бактериальных клеток к поверхности талломов водорослей, вероятно, зависит от продолжительности процесса колонизации, наличия у клеток-колонистов жгутиков, от возраста макрофитов и структуры поверхности водорослей, а также толщины и состава слизистого слоя.

Для решения этих вопросов нами были проведены электронно-микроскопические исследования поверхностей талломов водорослей *F. vesiculosus*, произрастающих в различных по степени загрязненности районах побережья Баренцева моря, и получены фотографии этих поверхностей, позволяющие определить структуру их поверхности.

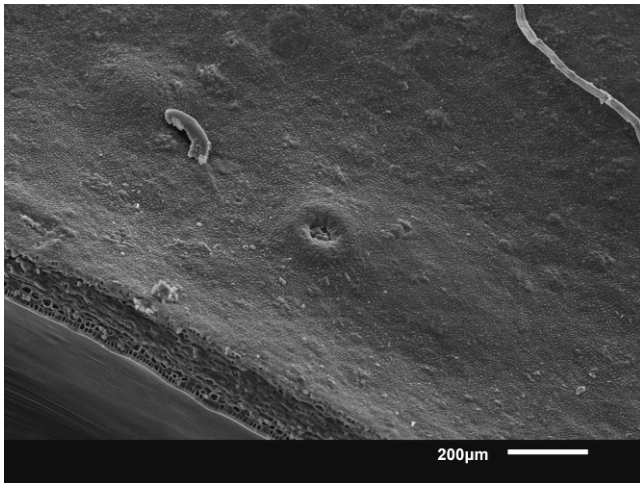
Было обнаружено, что у фукуса пузырчатого поверхность таллома неоднородна и не является гладкой (Рис. 9). На ней имеются неровности, впадины и трещины, которые позволяют микроорганизмам легче закрепляться и количество бактерий в которых будет значительно больше, чем на ровных участках таллома.



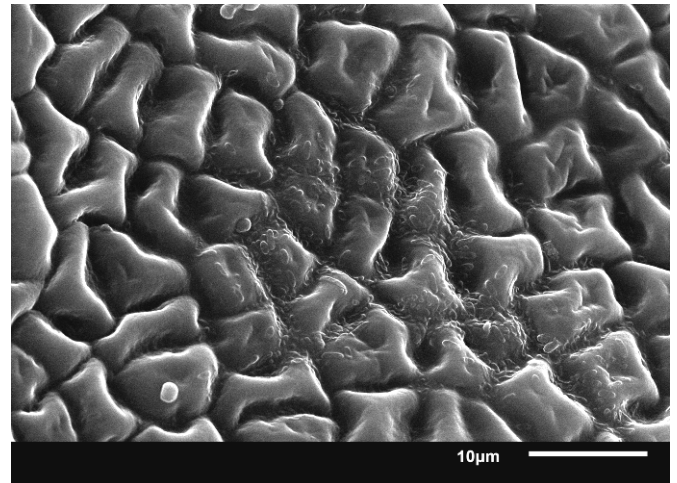
А.



Б.



В.



Г.

Рисунок 9. Электронно-микроскопические фотографии поверхности водорослей *F. vesiculosus*. Увеличение: А – x1800, Б – 3500, В – x3000, Г– 12500.

Распределение ЭБ и их численность зависит также от влияния факторов окружающей среды. Одним из таких факторов может явиться антропогенное загрязнение среды органическими веществами (в том числе нефтепродуктами). Нами показано, что при значительном загрязнении среды (и водорослей) нефтепродуктами, большая часть бактерий располагается непосредственно на поверхности, в слизистом слое водорослей (Рис. 10), либо концентрируется на пленке или под пленкой нефтепродуктов, адсорбирующейся на талломах фукуса и создающей дополнительные благоприятные условия для бактериальной колонизации.

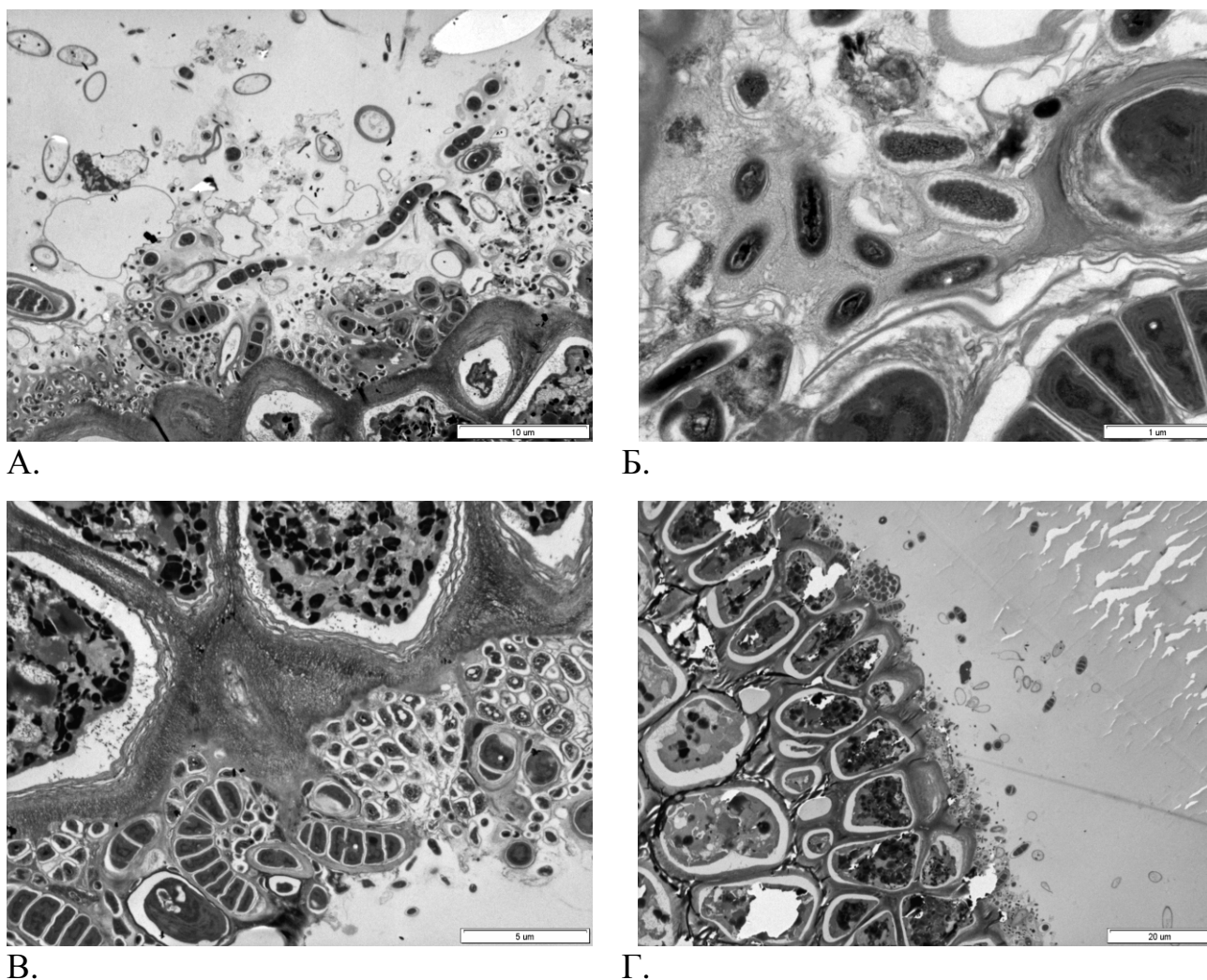
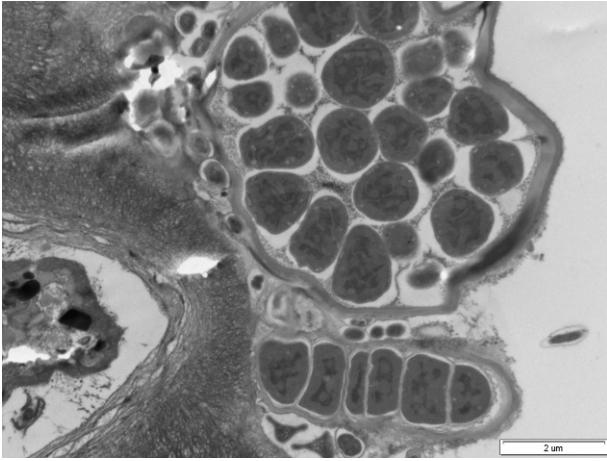


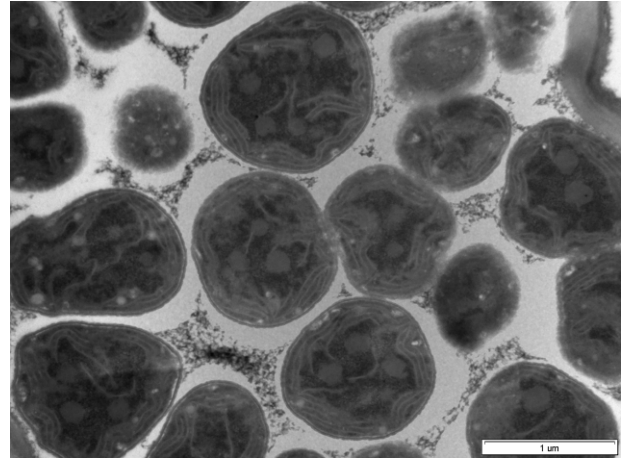
Рисунок 10. Эпифитные бактерии и цианобактерии на поверхности *F.vesiculosus* из загрязненной акватории. Увеличение: А – х3200, Б – х10000 , В – х6400, Г – х3500.

Помимо гетеротрофных бактерий на поверхности водорослей, отобранных в загрязненной НП морской воде, было обнаружено большое количество цианобактерий (Рис. 10).

Отмечаются как одиночные клетки, так и цепочки. Обнаружены колониальные формы, представляющие собой «упакованные» мелкие (1 – 2 мкм) клетки, заключенные в единую оболочку (Рис. 11.). Характерной особенностью цианобактериальных сообществ, обнаруженных на поверхности водорослей, обитающих в акватории с ярко выраженным хроническим загрязнением, является отсутствие гетероцист у колониальных форм.



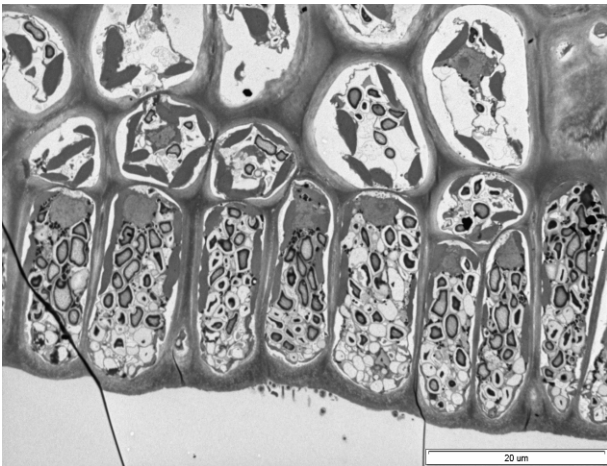
А.



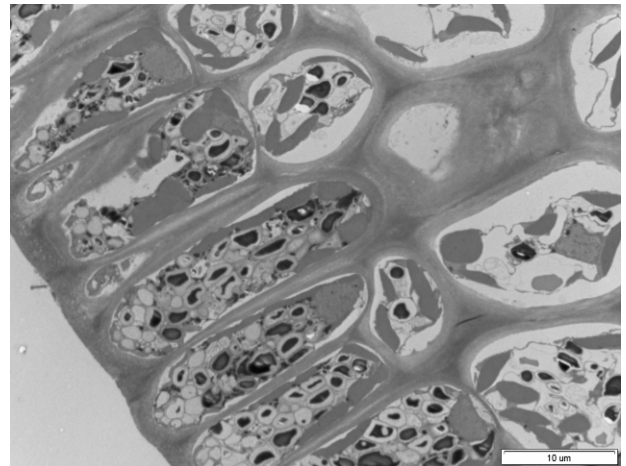
Б.

Рисунок 11. Колониальные формы цианобактерий: А – чехол с клетками, короткая цепочка; Б – клетки цианобактерии в общем чехле. Увеличение: А – $\times 16000$, Б – $\times 34000$.

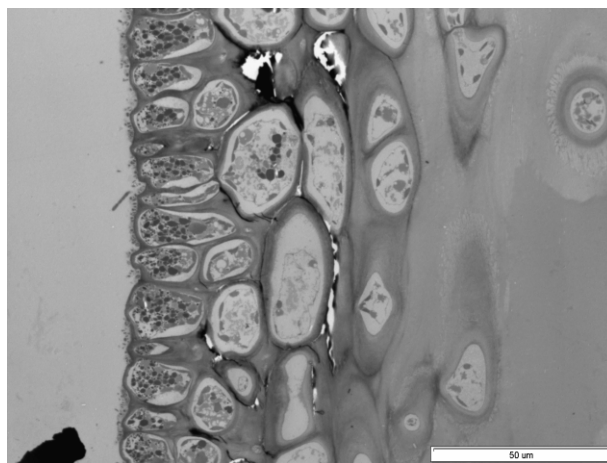
На поверхности водорослей из чистых акваторий отмечено значительно меньшее количество эпифитных гетеротрофных бактерий чем на водорослях из загрязненных районов (Рис. 12). Колоний и отдельных клеток цианобактерий в этом случае не отмечалось.



А.



Б.



В.

Рисунок 12. Эпифитные бактерии и цианобактерии на поверхности *F. vesiculosus* из чистой акватории. Увеличение: А – х3200, Б – х3800, В – х1800.

Большая часть клеток микроорганизмов локализуется в различного рода углублениях. На открытых, ровных участках отмечаются единичные бактериальные клетки. Это может объясняться тем, что в природных условиях в водной среде постоянно наблюдается движение водных масс, которое может препятствовать массовому поселению и закреплению бактерий на открытых участках. Кроме того, неприкрепленные и плохо прикрепленные бактериальные клетки могут смываться при подготовке фрагмента таллома водорослей к микроскопическим исследованиям, оставаясь при этом в неровностях. Тем не менее, бактериальные клетки отмечались и на ровных участках поверхности таллома, однако их количество было меньшим, чем на участках с выраженной рельефностью.

3.2. Подбор оптимальных методов исследования эпифитных бактерий.

Для проведения работ по определению оптимальных методов десорбции и культивирования эпифитных бактерий, водоросли отбирали в акватории Кольского залива в районе города Мурманска (Мурманский Морской порт – район Морского вокзала).

3.2.1. Выбор среды для культивирования эпифитных бактерий.

Для начала необходимо было выбрать питательную среду, которая позволяет учитывать максимальное количество культивируемых сапротрофных эпифитных бактерий фукуса. Для этого был проведен сравнительный анализ трех жидких сред с разным содержанием лабильного ОВ: рыбопептонного бульона (РПБ), 10% РПБ и среды Зобелла (см. Главу 2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ). На эти среды проводили высевы суспензии клеток ЭБ и определяли, на каких из них вырастает максимальное количество культивируемых бактерий.

Таблица 1.

Наиболее вероятное число культивируемых сапротрофных эпифитных бактерий, выросшее при посеве их суспензии на разные питательные среды.

Среда Зобелла	Среда РПБ	Среда РПБ 10%
До 65000	до 25000	до 2400

При посеве суспензии клеток ЭБ на среду РПБ (100%) выросло большее количество бактерий, чем на голодной среде РПБ (10%) (Табл. 1). Так, на богатой среде РПБ выросло до 25000 кл/мл, в то время как на разбавленной в 10 раз только до 2400 кл/мл. Однако максимальное количество клеток сапротрофных ЭБ (до 65000 кл/мл), т.е. практически в два раза больше чем на среде РПБ, дало рост на среде Зобелл.

Из литературных источников известно, что при учете бактерий из прибрежных зон Мирового океана, наибольшее количество бактерий вырастает на богатых питательных средах. Было показано, что из агаризованных сред, наиболее благоприятной для развития морских гетеротрофных бактерий является СПА (сухой питательный агар), разбавленный в 10 раз (Горбенко; 1961). Кроме того, на агаризованной среде Зобелла вырастает в 3 – 7 раз больше бактерий, чем на мясо – пептонном агаре, среда Горбенко дает результаты более близкие со средой Зобелла (Kunnis, 1990). Помимо этого, при сравнении эффективности метода предельных разведений и метода посева на поверхность плотной питательной

среды, было показано, что на жидкой среде удавалось учитывать на один - два порядка больше бактерий, чем на агаризованной (Ishida et al., 1990).

В нашем случае объяснить хороший рост ЭБ именно на богатых лабильным ОВ питательных средах, вероятно, можно следующим образом. Макроводоросли создают благоприятные условия для развития биопленки эпифитных микроорганизмов за счет выделения ОВ в окружающую среду (Хайлов, 1971). Кроме того дополнительные количества ОВ могут за счет течений попадать в толщу воды из грунтов на которых закреплены макрофиты. Особенно сильно это будет проявляться в литоральной зоне, где наблюдаются приливно-отливные течения и небольшие глубины. Использование высоких концентраций лабильных ОВ в питательных средах для учета ЭБ вероятно создает благоприятные условия для развития этих бактерий, схожие с теми, в которых они обитают в морской среде. Поэтому обогащенные ОВ питательные среды дают возможность учитывать большее количество бактерий при культивировании эпифитных микроорганизмов.

Необходимо учитывать, что к росту на питательных средах способна небольшая часть бактериоценоза (Meyer-Reil, 1977). Наиболее точным методом учета численности бактерий является метод прямого подсчета бактериальных клеток под микроскопом (ОЧБ). Однако данный метод не позволяет учитывать численность микроорганизмов различных трофических групп (эвтрофных, олиготрофных, углеводородокисляющих и других). Для их учета обычно используют плотные (агаризованные) либо жидкие питательные среды.

3.2.2. Сравнительный анализ разных методов удаления эпифитных бактерий с поверхности талломов фукуса

Для сравнительного анализа брали фрагменты из средней части талломов одного и того же растения, их предварительно дважды обмывали в стерильном растворе хлористого натрия для удаления не связанных прочно с талломом (не эпифитных) бактерий. После этого фрагмент таллома помещали в стерильный 3%

раствор хлористого натрия (50 мл) и подвергали обработке для удаления с его поверхности ЭБ.

Было опробовано 5 разных вариаций методов десорбции ЭБ с поверхности таллома:

- ультразвуковая обработка талломов;
- обработка талломов на миксере-диспергаторе;
- обработка талломов на вортексе;
- обработка талломов ватными аппликаторами

1. Ультразвуковую обработку (УЗ-обработку) проводили с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-1А. Время обработки – 1 мин, ток 0,4 А, частота – 22 кГц. Фрагменты таллома после УЗ-обработки удаляли из стакана, а раствор, содержащий десорбированных с фукуса бактерий, использовали для посевов.

2. Обработка талломов на миксере-диспергаторе (IKA ULTRA-TURRAX Tube Drive (Германия).

Фрагмент таллома помещали в стерильный флакон-насадку, добавляли в нее стерильный 3% раствор хлористого натрия в количестве 15 мл. Для обработки была выбрана максимальная интенсивность работы прибора, ее продолжительность составила 1 мин.

4. Обработка талломов на вортексе (Reax Top Vortex Mixer/Shaker).

Фрагмент таллома помещали в стерильную пробирку с 10 мл стерильного раствора хлорида натрия. Режим обработки – максимальный, время обработки – 5 мин.

5. Обработка талломов ватными аппликаторами.

После тщательной протирки ватным тампоном фрагмента таллома фукуса, вату помещали в стерильный стеклянный флакон объемом 20 мл с 10 мл стерильного раствора хлорида натрия. Флакон с ватой затем обрабатывали на вортексе (Reax Top Vortex Mixer/Shaker). Время обработки - 5 мин. Вату из флакона извлекали с помощью стерильного пинцета и им же ее отжимали в тот же самый флакон.

Для определения численности десорбированных с талломов фукуса эпифитных СБ, суспензию этих микроорганизмов после соответствующей обработки талломов фукуса в одном из перечисленных выше режимов высевали на модифицированную жидкую среду Зобелла 2216Е (Ильинский, 2006). Эффективность использования различных методов десорбции эпифитных бактерий оценивали по количеству сапротрофных бактерий, способных к росту на питательных средах.

Для определения численности ЭБ использовали метод предельных разведений. Посевы СБ инкубировали в течение 5 суток при комнатной температуре, а УОБ – от недели до месяца.

Сравнение эффективности разных методов удаления сапротрофных ЭБ с поверхности фукуса показало, что наиболее эффективными является метод с применением ватных аппликаторов (Табл. 2).

Таблица 2.

Максимальные значения численности эпифитных бактерий, удаленных с поверхности талломов фукуса при посеве их суспензии на среду Зобелла.

Метод	Численность эпифитных бактерий (кл/см ²)
Ультразвук	Около 752809
Миксер-диспергатор IKA ULTRA-TURRAX	Около 1071357
Мешалка Vortex	Около 5062935
Ватные аппликаторы	Около 7054717

В этом случае численность культивируемых СБ, удаленных с поверхности водорослей, достигала максимальной величины – более 7 млн. кл/см².

При использовании миксера-диспергатора и мешалки «Вортекс» были получены также высокие результаты. Однако максимальные значения

численности десорбированных клеток ЭБ, наблюдались именно при применении аппликаторов.

Как уже отмечалось выше в разделе **1.6.**, метод, основанный на применении аппликаторов, является более щадящим по отношению к бактериальным клеткам, и, в отличие от методов с применением ультразвука или мешалки – диспергатора позволяет сохранить целостность клеток, сохраняя их жизнеспособность.

Метод удаления ЭБ с поверхности талломов фукуса с помощью аппликаторов был нами использован при дальнейших исследованиях, связанных с определением численности ЭБ на талломах макрофитов, а также при проведении исследований, связанных с изучением таксономической структуры эпифитных бактериоценозов.

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

На количество и распределение ЭБ по поверхности талломов фукуса оказывают влияние различные факторы окружающей среды. На разновозрастных участках талломов численность ЭБ также, вероятно, будет отличаться. Нами для учета пространственного распределения количества бактерий таллом фукуса был разделен на верхушечную апикальную часть («верх»), центральную и нижнюю («низ») части. Анализ этих частей таллома фукуса, взятого из незагрязненной НУ акватории показал, что количество эпифитных СБ на них увеличивается от верхушечной части таллома к нижней (Рис. 13).



Рисунок 13. Обобщенная схема изменения наиболее вероятной численности эпифитных бактерий по таллому *F.vesiculosus* из губы Зеленецкой при посеве их суспензии на среду Зобелла.

В наших исследованиях, по результатам использования метода предельных разведений, максимальная численность культивируемых сапротрофных ЭБ наблюдалась в нижней части таллома фукуса и колебалась в различные сезоны года от 9926,1 до 14304,3 кл/см². На верхушечной части таллома фукуса НВЧ культивируемых бактерий составляла 247,7 – 1463,5 кл/см², а в центральной части таллома значение НВЧ составило от 1452,9 – 11137,3 кл/см².

При этом, учитывая высокую погрешность используемого для определения культивируемых бактерий метода предельных разведений, колебания численности эпифитных бактерий в губе Зеленецкой в различные сезоны года были незначительными и составляли от нескольких десятков, до тысяч клеток, в зависимости от участка таллома (рис. 14).

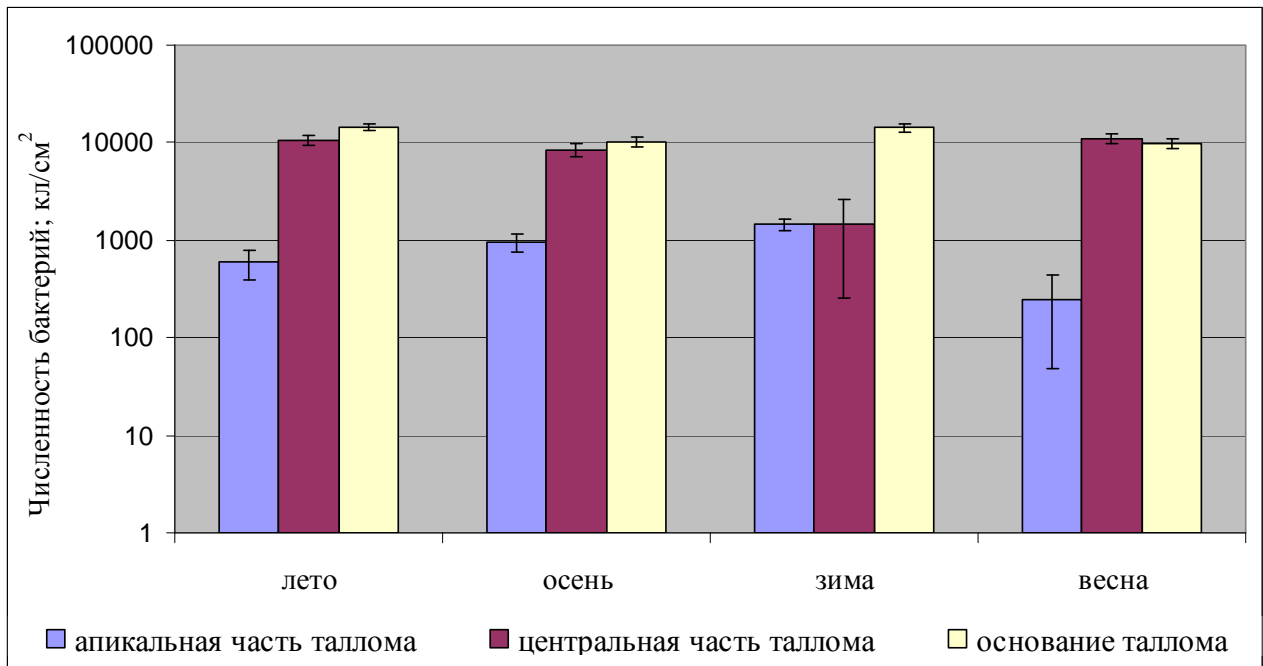


Рисунок 14. Сезонные изменения численности культивируемых эпифитных бактерий в трех различных частях талломов фукусов из губы Зеленецкой.

Ранее в литературе уже отмечалось, что, сезонные изменения численности эпифитных бактерий (особенно общей, по прямому счету) менее выражены, чем у пелагических форм, что связывается со специфическими условиями существования эпифитных микроорганизмов. (Перетрухина, 2006).

Нельзя не отметить, что сезонные изменения у пелагических бактериальных сообществ изучены гораздо лучше. В большинстве случаев колебания численности пелагических форм бактерий в разные сезоны года может различаться на порядки (Перетрухина, 2006; Ильинский, 2000) и привязана к гидрологическому режиму и развитию фитопланктона, в частности динофлагеллят (Бардан и др., 1990). Однако отмечаются случаи, когда в течение года не наблюдалось ярко выраженных изменений количества бактерий и структура бактериального сообщества оставалось устойчивой. Данное явление, как правило, описывалось для прибрежных вод и связывалось со значительными колебаниями океанологических и гидрохимических факторов (Бардан и др, 1990; Штукова, 1996). С другой стороны, Рейнхаймером было показано, что в закрытых прибрежных районах (Кильский залив) с устойчивым гидрологическим режимом

в течение года численность бактерий может значительно изменяться (Rheinheimer, 1992). При этом количество сапротрофных бактерий подвержено значительно более сильным региональным и сезонным изменениям по сравнению с общей численностью гетеротрофных бактерий.

Значимых количеств УОБ на поверхности таллома фукусовых водорослей, отобранных из чистой акватории, не наблюдалось. Вполне вероятно, что они там присутствовали, но их численность оказалась ниже чувствительности использованного метода ее определения (чувствительность метода предельных разведений – 10 кл/мл смыва с поверхности водорослей. При более низких значениях численности бактерий видимого роста на питательной среде не наблюдалось).

Для понимания закономерности количественного распределения микроорганизмов по поверхности таллома водорослей необходимо обратить внимание на характер роста *F. vesiculosus*.

Как отмечалось выше, фукусовые водоросли относятся к многолетним водорослям с осевым типом таллома, состоящим из базальной подошвы, стволика и ветвей. Для фукусовых водорослей характерен апикальный рост, который осуществляется за счет апикальной меристематической ткани (Камнев, 1989).

Известно, что выделенные нами три зоны таллома фукуса отличаются по метаболической активности и интенсивности протекающих в них процессов (Камнев и др., 1989; Воскобойников, Камнев, 1991; Рыжик, 2005).

В апикальной части преобладают процессы деления, наблюдается уменьшение содержания сухого вещества, а покровы клеток истончены. В центральной части активно идут процессы дыхания и запасания питательных веществ. В нижней части происходит затухание скорости метаболической активности, наблюдается распад листовидной структуры, что способствует выделению ОВ, которое может являться пищевым субстратом для бактерий. Данная часть выполняет в основном механическую функцию - удержание таллома на субстрате. В стволике отмечено наибольшее количество сухого вещества.

Данное разделение таллома на участки является условным, и четкой границы между зонами нет. Поэтому при учете численности ЭБ на исследуемом участке может наблюдаться влияние соседней зоны, что может отражаться на результатах исследования количества ЭБ на различных участках таллома.

Минимальное количество ЭБ на апикальной части водорослей можно объяснить тем, что в период роста на этих участках фукус либо выделяет бактериостатические или бактерицидные вещества, либо структура их поверхности не обеспечивает благоприятных условий для прикрепления эпифитных организмов (Mikulski, 1982). Частично вывод о зависимости характера распределения количества бактерий от характера роста макрофитов можно подтвердить данными литературы по другим водорослям. Так, у водорослей *Saccharina latissima*, имеющей иной, по сравнению с фукусовыми водорослями, характер роста, минимальная численность бактерий наблюдается в меристематической зоне (зоне роста), в которой происходят процессы деления клеток. Интеркалярная зона на талломе ламинарии и апикальная зона фукуса выполняют одинаковые функции (роста) и в них происходят сходные метаболические процессы. В центральной части таллома, где наблюдается снижение скорости метаболических реакций и происходит уменьшение скорости деления клеток, количество бактерий, как правило, выше (Oberbeckmann et al., 2007).

Нами было установлено, что максимальная численность культивируемых ЭБ была обнаружена в нижней части таллома фукусов и превышала 14000 кл/см².

Учитывая, что в отличие от ламинарии, характер роста у фукуса, – апикальный, нижняя часть его таллома является наиболее старой. В ней идут интенсивные процессы отмирания и распада тканей. Вероятнее всего, именно за счет этого процесса может обеспечиваться благоприятная среда для развития СБ, использующих отмирающие ткани водоросли в качестве пищевого субстрата. Этим может объясняться максимальное количество культивируемых бактерий, присутствующих на данном участке таллома.

По нашим данным, на фукусе из загрязненного района количество ассоциированных с ним культивируемых эпифитных СБ многократно превышало таковую на фукусе из чистой акватории (Рис.15).

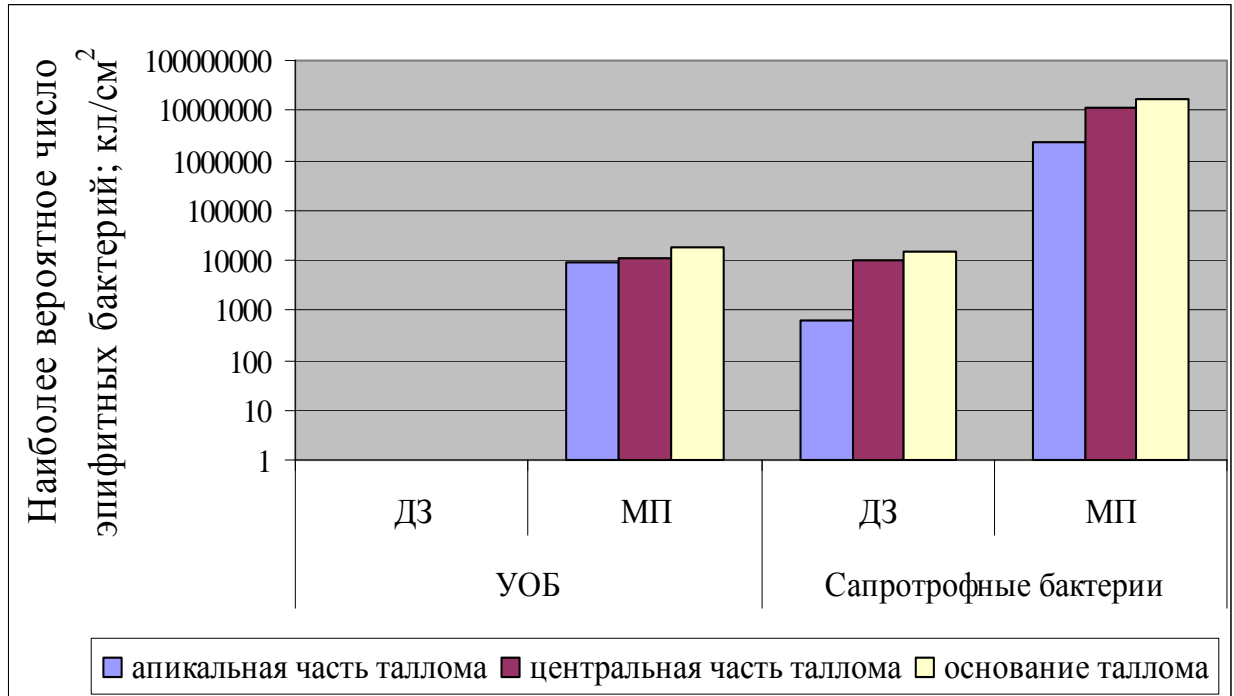


Рисунок 15. Численность эпифитных сапротрофных и углеводородокисляющих бактерий на различных участках талломов фукусов из загрязненной НУ акватории Мурманского морского порта (МП) и чистой акватории вблизи пос. Дальние Зеленцы (ДЗ).

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

Максимальная численность культивируемых эпифитных СБ на поверхности фукуса из акватории с хроническим загрязнением НУ 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 по посеву на талломе фукуса из загрязненного НУ местообитания МП (табл. 4) было на два – три порядка меньше, чем СБ и колебалось от 9,5 до 17,4 тысяч, в то же время на поверхности талломов фукусов

из акватории ДЗ этих бактерий вообще не было обнаружено. Их количество в этом случае оказалось, скорее всего, ниже чувствительности использованного нами метода их анализа. Максимальное количество УОБ на фукусе из загрязненной НУ акватории было обнаружено на нижнем участке таллома, минимальное – на верхушечном.

Полученные нами данные о распределении бактерий по поверхности талломов фукуса, в целом, укладываются в приведенные выше диапазоны значений из данных литературы, касающихся исследований других водорослей. Минимальная численность эпифитных СБ в наших исследованиях составляла сотни кл/см², и была отмечена в верхней части таллома.

3.4. Лабораторные эксперименты по определению углеводородокисляющей способности эпифитных бактерий фукуса.

3.4.1. Определение углеводородокисляющей активности эпифитных бактерий, удаленных с талломов фукуса.

Ранее была отмечена высокая устойчивость фукусовых водорослей к нефтяному загрязнению (Воскобойников и др., 2004; Степаньян, Воскобойников, 2006). Показано, что даже при длительном воздействии нефтепродуктов *Fucus vesiculosus* сохраняет способность к фотосинтезу, росту и синтезу полисахаридов. В связи с этим была высказана гипотеза о роли макрофитов в очистке акватории от нефтепродуктов не только за счет их удержания водорослями по аналогии с боновыми заграждениями, но и в результате включения НУ в метаболизм как самого макрофита, так и УОБ (Семенова и др., 2009), обитающих на поверхности водорослей, и образующих с ними устойчивую симбиотическую ассоциацию.

Кроме того, в литературе можно обнаружить информацию о том, что углеводородокисляющая активность свободноживущих УОБ в районах массового развития фукусовых может быть значительно выше, чем в акваториях, где отмечаются либо единичные водоросли, либо они вообще отсутствуют (Перетрухина и др., 2006). Вполне возможно, что в данном случае также может наблюдаться эффект стимулирования углеводородокисляющей активности

бактерий растениями, отмеченный ранее в пресных водоемах умеренных широт для прибрежно-водной растительности и свободноживущих УОБ (Морозов, 2001; Морозов, 2003).

Для определения углеводородокисляющей активности ЭБ, ассоциированных с водорослями *F. vesiculosus*, были проведены лабораторные эксперименты. Их основными целями были:

-определить способность эпифитных углеводородокисляющих бактерий (ЭУБ), удаленных с поверхности талломов водорослей, к деструкции НУ.

-сравнить способность ЭБ, удаленных с поверхности талломов водорослей из чистых и загрязненных нефтепродуктами морских вод, к разрушению НУ.

В результате проведенных экспериментов было установлено:

1. ЭБ, обитающие на талломах фукуса, способны к деструкции нефтепродуктов в условиях лабораторного эксперимента. Максимальное потребление ДТ эпифитными бактериями за 3 недели экспозиции составило до 57 % от исходно внесенного количества ДТ (Табл. 5). В контроле без фукусовых водорослей за это время разрушалось не более 18%, внесенного в среду ДТ.

Таблица 5.

Результаты эксперимента по определению способности к деструкции дизельного топлива эпифитных бактерий из чистой и загрязненной нефтяными углеводородами акватории (в % от исходной концентрации).

	Остаточные количества ДТ в различных вариантах эксперимента, в %
Контроль (без фукуса)	18
Фукус из чистой акватории	53
Фукус из загрязненного НУ местообитания	57

2. ЭБ, удаленные с талломов водорослей из загрязненной нефтепродуктами акватории потребляли в целом незначительно больше ДТ (до 57%) по сравнению с ЭБ фукуса, извлеченного из чистой акватории (до 53%). Столь незначительная разница между конечными результатами этого эксперимента может объясняться, высокой адаптационной способностью ЭБ из чистой акватории к потреблению НУ. Учитывая тот факт, что дизельное топливо, используемое в эксперименте, состоит в основном из углеводородов, входящих в состав легко разрушаемой бактериями фракции n-алканов, можно предположить, что при использовании в эксперименте НП с преобладанием в их составе тяжелых фракций (в частности, таких как мазут или сырая нефть), ЭБ, выделенным с поверхности фукуса из чистой акватории потребовалось бы значительно больше времени. В этом случае, разница в результатах эксперимента могла бы быть более значимой. 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.

Полученные результаты позволяют предположить непосредственное участие ЭУБ фукуса в процессах естественного очищения вод от нефтяных загрязнений, попавших в акваторию с зарослями фукусовых водорослей.

3.4.2. Лабораторные эксперименты по потреблению дизельного топлива бактериально-водорослевой ассоциацией.

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 (Рис. 16).



Рисунок 16. Экспериментальные емкости с морской водой, фукусовыми водорослями и дизельным топливом

Описанные выше лабораторные эксперименты показали, что ЭБ, обитающие на фукусе из загрязненного НУ участка Кольского залива способны быстрее потреблять НУ по сравнению с ЭБ фукуса из чистого участка залива (Воскобойников и др., 2008).

Однако надо было учитывать, что в биодеградации НУ принимают участие не только ЭБ, но и водоросли-макрофиты, которые являются средой обитания этих ЭБ и создают, вероятно, условия для их развития. Для оценки роли макрофитов в процессах биодеградации НУ бактериально-водорослевыми ассоциациями были проведены лабораторные исследования на базе сезонной биостанции ММБИ КНЦ РАН. В ходе этих экспериментов определяли концентрацию ДТ в воде, численность по посеву ЭУБ и сапротрофных ЭБ на поверхности растений, интенсивность фотосинтеза и метаболическую активность клеток *F. vesiculosus*. Отбор проб для определения всех этих показателей проводили в начале эксперимента (0 день), на 7, 14 и 21 сутки (см. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ).

3.4.2.1. Определение физиологического состояния водорослей.

Исходная метаболическая активность клеток (МАК) макрофитов находившихся в морской воде без добавления НУ (контроль) и макрофитов, пребывавших в морской воде с НУ (опыт) в начале эксперимента не различалась. Только на 7 день эксперимента МАК по сравнению с начальным ее уровнем уменьшилась в 1.5 раза, а на 21 день – в 3 раза (Рис. 17).

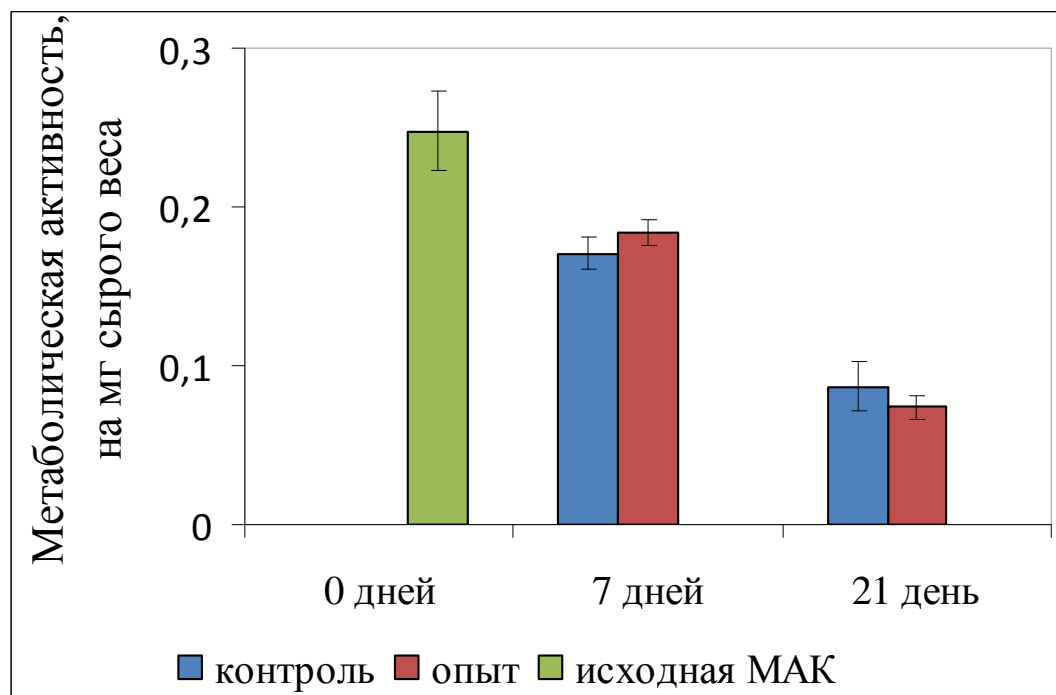


Рисунок 17. Изменение метаболической активности (МАК) фукуса в ходе эксперимента.

Интенсивность фотосинтеза талломов фукуса в опыте оказалась примерно в 2 раза выше, чем в контроле, причем этот эффект сохранялся до конца эксперимента (Рис. 18). Также значения данного показателя были выше чем исходные – природные значения. Возможно, что стимулирование процесса фотосинтеза в данном случае было обусловлено низкими исходными концентрациями нефтепродуктов, использованными в эксперименте (до 10 мг/л). Подобное явление уже было описано ранее (Степаньян, 2003). В течение эксперимента интенсивность фотосинтеза в контроле и опыте снижалась.

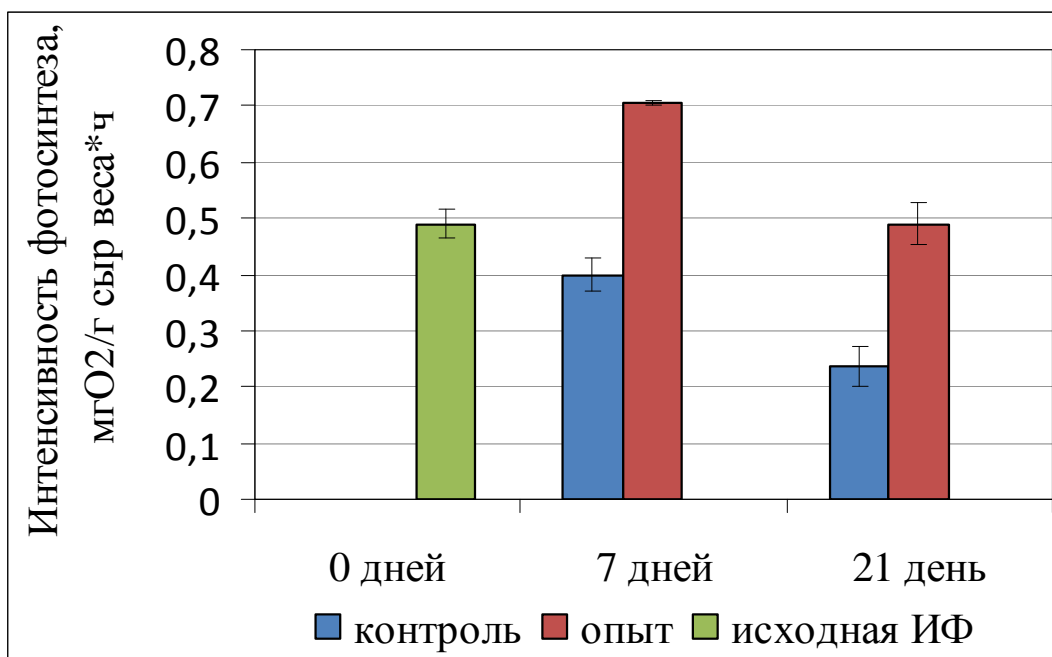


Рисунок 18. Изменение интенсивности фотосинтеза в течение эксперимента.

Результаты этих экспериментов показали, что наибольшая физиологическая активность водорослей как в опыте, так и в контроле наблюдается в первую неделю эксперимента. Ее снижение может быть связано с накоплением продуктов метаболизма фукусов в замкнутой экспериментальной системе.

3.4.2.2. Учет численности углеводородокисляющих бактерий.

Присутствие ДТ в опытных сосудах приводило к возрастанию в них численности УОБ по сравнению с контролем (Рис. 19).

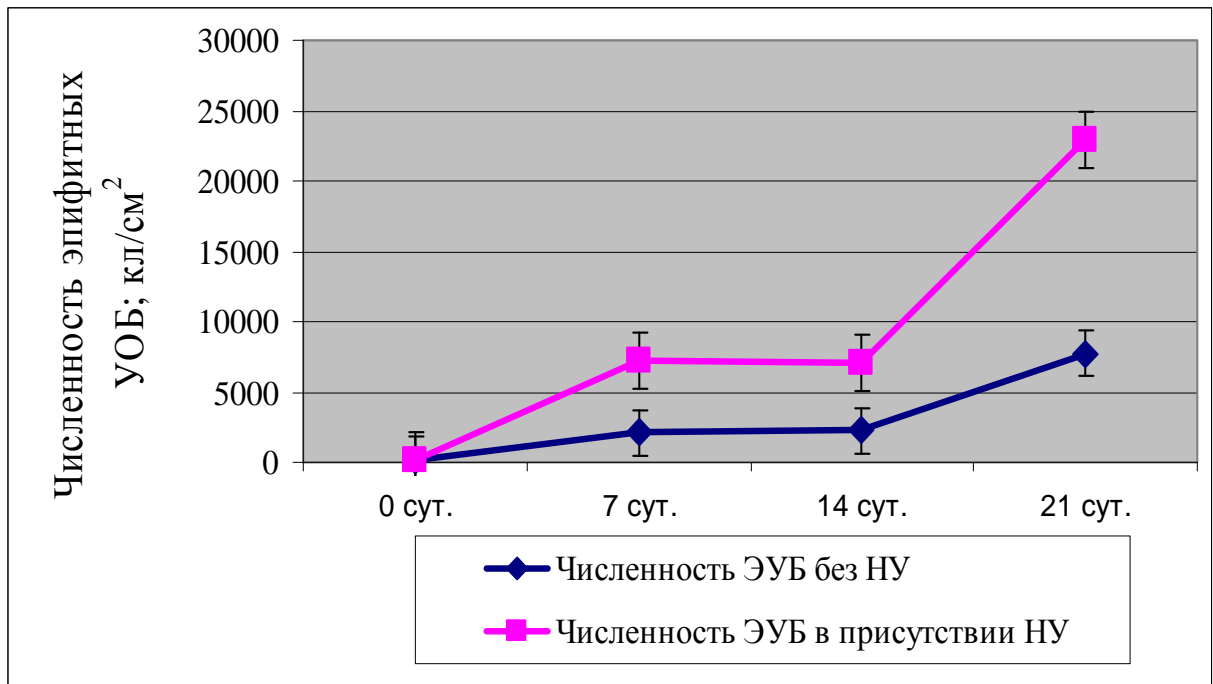


Рисунок 19. Изменение численности эпифитных глеводородокисляющих бактерий (ЭУОБ) в морской воде в присутствии нефтяных углеводородов и без них.

Численность УОБ в контрольных сосудах также 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 поверхности *F. vesiculosus* могло постепенно увеличиваться за счет накопления в среде продуктов метаболизма растений. Эти продукты представляют собой ОВ, доступные для микробной утилизации и потому могут способствовать увеличению численности гетеротрофных микроорганизмов. Работами К.М. Хайлова было показано, что макроводоросли, за счет выделения метаболитов могут создавать вокруг себя благоприятную среду для развития микроорганизмов (в том числе и УОБ), при этом формируя и контролируя их видовой состав (Хайлов, 1971).

Известно также, что микробное окисление НУ может приводить к значительному снижению токсического эффекта поллютантов на макрофиты (Wrabel, Peskol, 2000), а выделение в среду метаболитов микроорганизмов может

даже в значительной степени стимулировать развитие самих водорослей (Wrabel, Peckol, 2000).

3.4.2.3. Определение содержания нефтепродуктов

К концу эксперимента содержание нефтепродуктов в сосудах, причем как с водорослями, так и без них, значительно уменьшалась (Рис. 20).

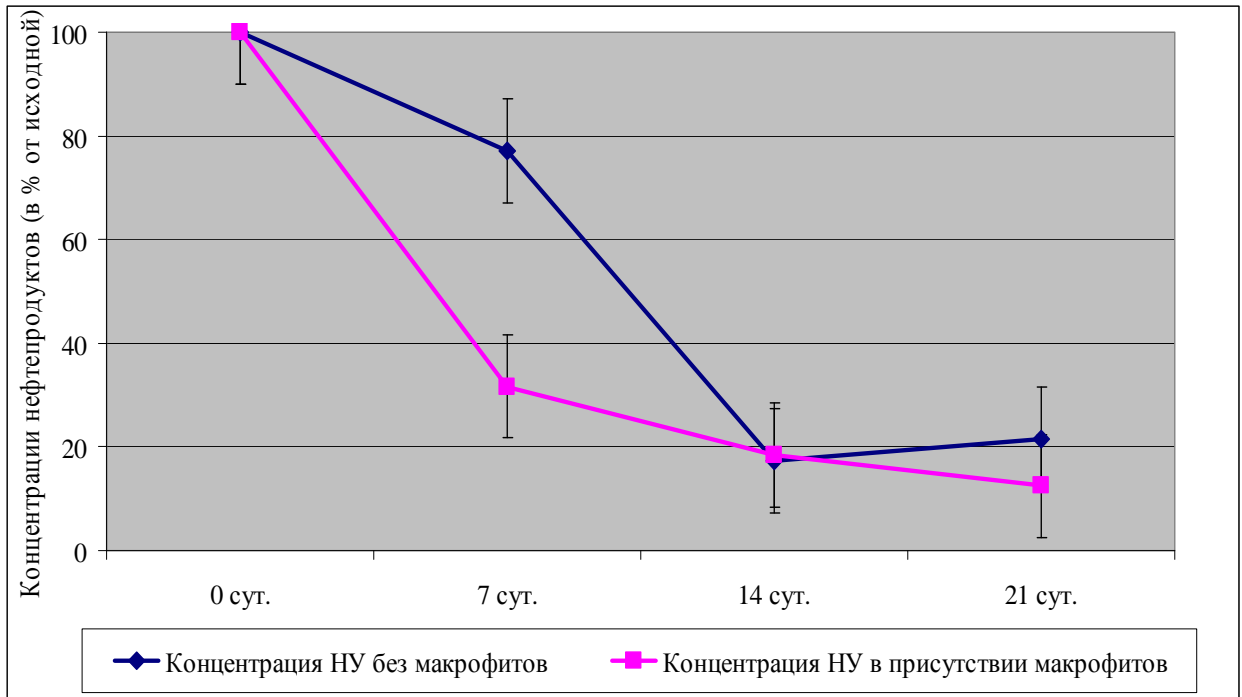


Рисунок 20. Изменение содержания нефтепродуктов в экспериментальных сосудах в присутствии фукуса и без него.

В присутствии водорослей наиболее активно НУ разрушались в первую неделю эксперимента, при этом их концентрация снижалась на 60 – 70%, затем скорость этого процесса заметно снижалась. Минимальная концентрация НУ в воде с фукусами достигается на 14 день и в дальнейшем практически не изменяется. В сосудах без растений в первую неделю опыта концентрация НУ уменьшалась всего на 20 – 25%, однако на 14 день она уже не отличалась от таковой в сосуде с фукусами и в дальнейшем также практически не изменялась.

Не вызывает сомнения, что деструкция НУ в экспериментальных сосудах происходит не только за счет биотического фактора. Известно, что на судьбу

нефти, попавшей в морскую среду, влияют также испарение, температура, солнечный свет, давление, соленость и другие абиотические факторы среды. Однако в закрытых системах, подобной использованной нами, их влияние было, вероятно, сравнительно невелико. Используемое нами в эксперименте ДТ (марки летнее) в России регламентируется ГОСТ 305-82. В своем составе эта марка ДТ имеет 15 – 30% ароматических углеводородов, 10 – 40 % парафиновых углеводородов и 20 - 60% нафтеновых углеводородов. В зависимости от предполагаемых условий эксплуатации ДТ, производители могут заметно менять процентное соотношение его компонентов. При попадании в морскую среду большая часть летучих низкомолекулярных углеводородов, входящих в состав ДТ, выветривается. Этому, безусловно, способствовала принудительная аэрация, использованная нами в экспериментах. Ароматические углеводороды, входящие в состав ДТ растворимы в воде, при этом влияние на растворимость компонентов нефтепродуктов в среде определяется интенсивностью движения воды и ее перемешивания (Boehm, Quinn, 1973). Этому также способствовала аэрация экспериментальных сосудов. В нашем случае, однако, для уменьшения влияния испарения, экспериментальные и контрольные емкости закрывались капроновой крышкой. Однако, как было отмечено в главе «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ», емкости закрывались крышками не герметично, для оттока излишков нагнетаемого компрессорами воздуха.

Эксперименты, ранее проведенные на элодее канадской (Тумайкина и др., 2008), показали, что максимальное потребление НУ этой нативной растительно-микробной ассоциацией наблюдается на 3 – 5 сутки. Ее углеводородокисляющая активность оказалась довольно высокой, всего за 10 суток было утилизировано 55,6% НУ от их исходного количества.

Анализ результатов проведенного нами эксперимента показал, что наиболее эффективно удаление ДТ из экспериментальных сосудов происходит в течение первых дней после внесения нефтепродуктов. Вероятно, часть ДТ из сосудов с фукусами и без, удаляется именно за счет испарения летучих фракций углеводородов. В то же время, при сравнении концентраций НУ в опытных и

контрольных емкостях, установлено, что за первые 7 суток в сосудах, где присутствовали фукусы вместе с ассоциированными с ними ЭБ, концентрация ДТ снизилась значительно больше, на 60-70%, чем в сосудах с ДТ, но без макрофитов, в которых убыль ДТ составила всего 25% от их исходно внесенного количества. Можно полагать, что эта разница объясняется именно суммарным вкладом и самого фукуса и ассоциированных с ним ЭБ.

В природе водоросли *F. vesiculosus* обитают в литоральной зоне, наиболее подверженной различным формам антропогенного загрязнения, в том числе – и нефтепродуктами. При аварийных разливах, либо при хроническом загрязнении среды, нефтепродукты могут выбрасываться на побережье, таким образом воздействуя, на обитателей литорали. Как отмечалось ранее, фукусовые водоросли обладают высокой устойчивостью к нефтяному загрязнению и, вероятно, могут включать НУ в процессы своего метаболизма. Как экспериментально показано нами, эпифитные УОБ, ассоциированные с фукусами, способны принимать активное участие в процессах разрушения нефтепродуктов и их роль скорее всего является при этом ведущей. Благодаря их деятельности нефть трансформируется до простых соединений, происходит накопление нового ОВ, которое в дальнейшем включается в круговорот углерода в водоемах.

3.5. Влияние нефтяного загрязнения на численность и таксономический состав эпифитных гетеротрофных бактерий, обитающих на фукусах в губе Зеленецкой.

Микробиологические исследования сообществ гетеротрофных бактерий, обитающих в воде и на поверхности талломов водорослей, были проведены в губе Зеленецкой (см. «МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ») в летний период времени. Пробы фукусов отбирали на загрязненной НУ станции, в районе причала, где находилось недавно затонувшее судно (Рис. 21), из которого наблюдался постоянный выход ДТ в воду.



Рисунок 21. Загрязненная станция в губе Зеленецкой. Вставка в правом нижнем углу: пленка нефтепродуктов на поверхности воды в районе этой станции.

В результате, концентрация НУ в воде возле причала достигала 0.26 мг/л (в 5 раз выше ПДК), а на удалении более 500 м от него она снижалась до 0.04 мг/л, т.е. не превышала ПДК (0,05 мг/л). В качестве фоновой, чистой станции для отбора проб нами был выбран участок литорали, находящийся на значительном удалении от упомянутого выше источника загрязнения.

3.5.1.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 (Табл. 6).

В целом, они были достаточно высокими, но вполне сопоставимыми с данными литературы. Ранее проведенные исследования ОЧБ в прибрежных зонах Баренцева моря показали, что максимальные значения ОЧБ в зимний период составляли в среднем $1,963 \times 10^6$ кл/мл (Теплинская, 1990). В летний период количество бактерий сокращалось вдвое. Подобная нетипичная динамика численности бактерий объяснялась не сезонными колебаниями температуры, а

количеством и качеством доступного для бактерий ОВ. Полученное Н.Г.Теплинской среднее значение ОЧБ очень близко к таковому, полученному нами.

Таблица 6.

Общая численность бактерий по прямому счету в пробах воды и на талломах фукуса, отобранных в губе Зеленецкой на чистой и загрязненной станциях.

Объект, использованный для отбора проб	Численность бактерий в воде, кл/мл	Численность на макрофитах, кл/см ²
Вода из загрязненной точки	4.92×10^6	-
Вода из чистой точки	$(4.91 - 5.51) \times 10^6$	-
Фукус из загрязненной точки	-	$(3.86 - 4.93) \times 10^7$
Фукус из чистой точки	-	$(1.42 - 1.48) \times 10^7$

Вместе с тем, исследования гетеротрофного бактериопланктона, ранее проведенные в южном колене Кольского залива (Перетрухина, 2006), показали, что на станциях в литоральной зоне значения ОЧБ колебались в течение года от $2,4 \times 10^6$ кл/мл до $1,2 \times 10^8$ кл/мл при максимуме в летний период, а минимуме – зимой. Верхняя граница полученных этим автором значений ОЧБ существенно превышает максимальные величины этого показателя, обнаруженные нами в бухте Зеленецкой. Возможное объяснение этому заключается в том, что работы И.В. Перетрухиной проводились с пробами воды из Южного колена Кольского залива, которое подвержено хроническому антропогенному загрязнению. В этой акватории постоянно присутствуют повышенные концентрации тяжелых металлов, нефтепродуктов и ряда других ОВ (Государственный доклад..., 2005, 2006). В то же время Губа Зеленецкая практически постоянно является чистым районом, поэтому редкое попадание в воду данной акватории небольших количеств нефтепродуктов может вызвать лишь кратковременное увеличение

численности бактерий, которая вскоре будет уже значительно ниже, чем в акваториях с хроническим загрязнением.

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

Несмотря на недостаточное количество публикаций по общей численности ЭБ на талломах бурых водорослей *Fucus vesiculosus*, полученные нами данные в целом соответствуют таковым, представленным в имеющихся в литературе и касающихся исследования ЭБ других водных растений. К примеру, полученные нами значения численности ЭБ на талломах фукуса соответствуют максимальным величинам этого показателя ($2,18 \times 10^7$ кл/см²), ранее обнаруженным для талломов морской травы *Zostera marina* (Tornblom, Sondergaard, 1999). Микробиологические исследования талломов водорослей *Sacharina latissima* (*Laminaria saccharina*) из чистого местообитания показали, что величина ОЧБ на центральной части пластины составила $2,88 \times 10^8$ кл/см², а для меристематической области этот показатель был ниже – $2,09 \times 10^8$ кл/см² (Oberbeckmann et al., 2007). Эти данные значительно превышают полученные нами величины общей численности ЭБ на талломах фукуса.

3.5.2. Численность по посеву сапротрофных и углеводородокисляющих бактерий в пробах воды и на талломах фукуса.

Численность как СБ, так и УОБ в загрязненных и незагрязненных НУ водах губы оказалась примерно одинаковой и составила 1200 – 5000 кл/см² для СБ и 50 – 120 кл/см² для УОБ соответственно (Табл. 7).

В то же время численность СБ на поверхности макрофитов, отобранных в загрязненном НУ участке губы, была более чем на два порядка выше, чем на водорослях, отобранных на чистом участке акватории.

Численность культивируемых эпифитных сапротрофных и углеводородокисляющих бактерий на талломах водорослей из чистого и загрязненного нефтяными углеводородами участков губы Зеленецкая.

Объект наблюдения	Численность культивируемых УОБ		Численность культивируемых сапротрофных бактерий	
	кл/мл	кл/см ²	кл/мл	кл/см ²
Вода – район причала	50	-	1200	-
Вода – из чистого места	50 -120	-	1200 - 5000	-
Фукус – район причала	-	1587	-	432278
Фукус из чистого места	-	124	-	1971

Сходная картина наблюдалась и для эпифитных УОБ – их количество на талломах фукуса из района причала оказалась более чем на порядок выше, чем на водорослях, отобранных на удалении от него.

Из полученных нами данных также следует, что, численность СБ (табл. 7) в воде и на фукусах, взятых на чистой и грязной станциях существенно превосходит количество УОБ, что является вполне естественным, поскольку не все СБ способны к окислению НУ. При этом если на чистой станции численность эпифитных СБ превышает таковую УОБ примерно на порядок, то на фукусе из загрязненной акватории эта разница увеличивается уже более чем на два порядка величин. Причины этого явления вероятнее всего связаны с резкими перестройками в составе эпифитного бактериоценоза на фукусе из загрязненной акватории и требуют дальнейших исследований.

Для водорослей *Eisenia bicyclis* из Японского моря (Shiba, Taga, 1980) определенная численность бактерий составляла $10^1 - 10^4$ кл/см².

В проведенных ранее исследованиях бурых водорослей было показано, что максимальные значения численности культивируемых эпифитных бактерий в южном колене Кольского залива составляли около 68000 кл/см² ($6,8 \times 10^4$ кл/см²) (Перетрухина, 2006). В нашей работе обнаруженное количество культивируемых микроорганизмов значительно превышало эти показатели (≈ 432278), и было в 6,35 раз больше. Различия в количестве НВЧ можно объяснить тем, что в описываемых исследованиях использовались разные методы удаления бактериальных клеток с поверхности таллома. В работе Перетрухиной применялся метод встряхивания образца водоросли в пробирке со стерильным физраствором. Затем полученную суспензию бактерий использовали для дальнейших работ (прямого счета и посева на питательную среду). В наших исследованиях в качестве метода для удаления культивируемых ЭБ был выбран метод с использованием ватных аппликаторов (см. п. 3.2.2.), который позволял извлечь большее количество ЭБ для последующих анализов.

Таким образом, численность эпифитных СБ, в число которых входят и УОБ, существенно возрастает на фукусах со станции, подверженной загрязнению НУ. Участок акватории бухты в районе причала подвержен также влиянию берегового стока (за счет впадения в него пресноводных ручьев), что также может быть причиной возрастания численности ЭБ обеих групп. При этом на численности бактерий в воде загрязнение вод 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 ЭБ. В воде при небольших разливах нефти и нефтепродуктов подобное явление наблюдается только в области поверхностной пленки, где концентрируются эти поллютанты. Поскольку для микробиологических анализов мы отбирали пробы воды с глубины 1 м, то содержание НУ здесь было невелико и они по этой причине не оказывали на численность СБ (включая и УОБ в их составе) существенного влияния.

В ряде работ по исследованию бактериальных ценозов за единицу численности сапротрофных (и углеводородокисляющих) бактерий было принято

количество клеток на 1 грамм таллома (Chan, McManus, 1969; Беленева, Жукова, 2006; Тумайкина и др., 2006). Это, как уже отмечалось выше, создает трудности при сравнении результатов наших работ с данными литературы.

3.5.3. Определение таксономической принадлежности культивируемых эпифитных углеводородокисляющих бактерий.

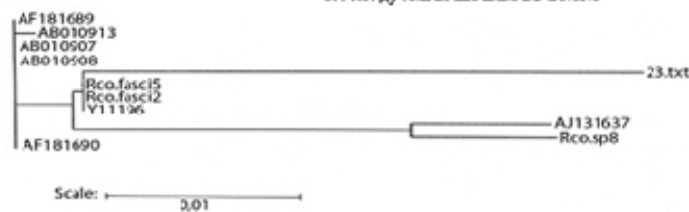
Из проб воды и с поверхности талломов фукуса нами было выделено 67 штаммов УОБ. На основании физиолого-биохимического и морфологического анализа все штаммы были разделены на 4 группы (Табл. 8). Из каждой группы нами было отобрано по одному наиболее характерному и массовому представителю для установления таксономической принадлежности на основании анализа 16S рРНК.

Таблица 8. Описание штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных с поверхности фукусовых водорослей Баренцева моря.

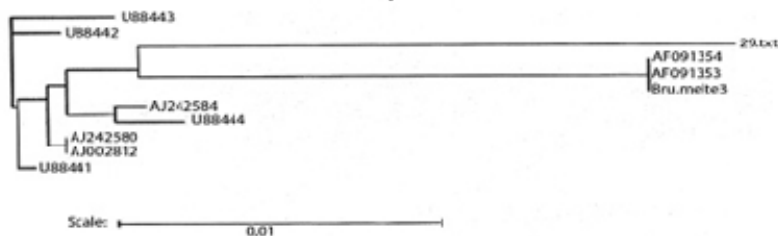
№ штамма	Описание колоний		Подвижность	Окраска по Граму	Тест на каталазу	Кислотоустойчивость	Морфология клетки	Спорообразование	Родовое и видовое название на основе анализа 16S рРНК (количество штаммов/доля бактерий данной группы в % от числа выделенных штаммов)
	Среда ММС	Среда Мюллера							
18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 88, 89, 90, 91, 92	Менее 1 мм, светло-бежевые, выпуклые блестящие, край ровный	1–3 мм, желтые, выпуклые, сухие, край ровный	—	— +	+	—	Цикл: кокк-палочка-кокк	—	<i>Rhodococcus fascians</i> (18/27)
13, 14, 15, 16, 17, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34	Менее 1 мм, светло-бежевые, выпуклые блестящие, край ровный	1–3 мм, бежевые, выпуклые, сухие, край ровный	+	—	+	—	палочки с закругленными концами	—	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (15/22)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70	флуоресцируют в проходящем свете, 1мм, бежевые, блестящие, выпуклые, край ровный	флуоресцируют в проходящем свете, 1–5 мм, бежевые, блестящие, выпуклые, край ровный, ослизненные	+	—	+	—	палочки	—	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (26/39)
49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56,	Менее 1 мм, белые, выпуклые блестящие, край ровный	Менее 1 мм, белые, выпуклые матовые, край ровный	+	—	+	—	палочки	—	<i>Pseudomonas guinea</i> (8/12)

На основании этого анализа, морфологического исследования и физиолого-биохимических тестов отобранные штаммы были определены до вида (Рис. 22; табл. 9).

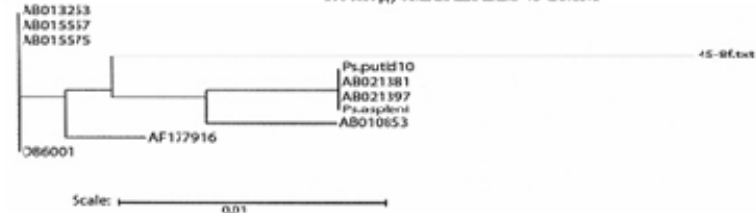
Sequence description		
Y11196	<i>Rhodococcus fascians</i> str. D188	
Rco.fasci5	<i>Rhodococcus fascians</i>	1.
Rco.fasci2	<i>Rhodococcus fascians</i>	
AB010907	<i>Rhodococcus</i> sp. str. SGB1168-116	
A7181639	<i>Rhodococcus</i> 5/1 str. 5/1	
AB010908	<i>Rhodococcus</i> sp. str. SGB1168-118	
A7181690	<i>Rhodococcus</i> 5/14 str. 5/14	
AB010913	<i>Rhodococcus</i> sp. str. SRB1948-240	
Rco.sp8	<i>Rhodococcus</i> sp.	
AJ131637	<i>Rhodococcus erythropolis</i> str. DCL14	
23.txt	Исследуемый штамм 23 EMM	



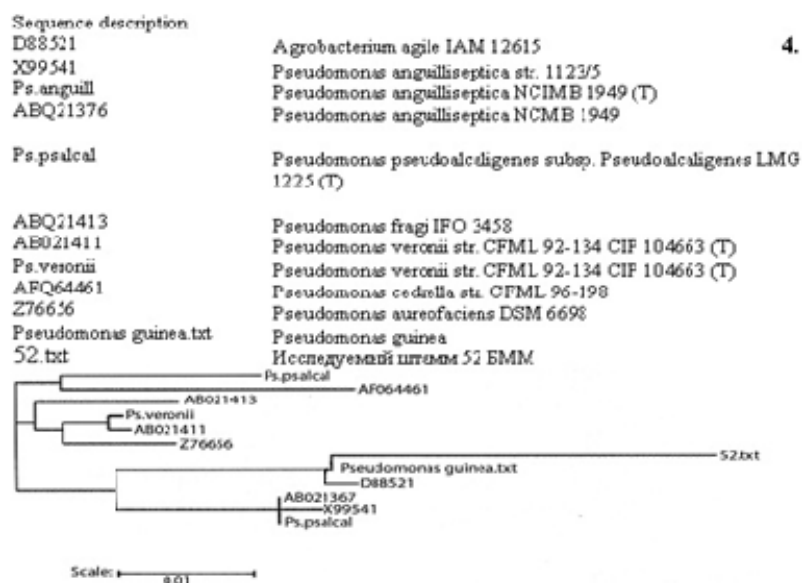
Sequence description		
AJ002812	<i>Cehrobactrum</i> sp. str. S1	2.
AJ242584	<i>Cehrobactrum anthuopi</i> str. SC1124	
U88441	<i>Cehrobactrum anthuopi</i> LMG 3309	
U88442	<i>Cehrobactrum anthuopi</i> LMG 3310	
U88443	<i>Cehrobactrum anthuopi</i> LMG 3329	
U88444	<i>Cehrobactrum anthuopi</i> LMG 2520	
AF091354	<i>Brucella abortus</i> str. J44	
AF091353	<i>Brucella</i> M2357/93 str. M2357/93	
Bru.melite3	<i>Brucella meliënsis</i>	
AJ242580	<i>Cehrobactrum anthuopi</i> LMG 5140	
29.txt	Исследуемый штамм 29 EMM	



Sequence description		
ADQ15575	str. BD6-5	3.
ABQ15557	Str. BD4-3	
ABQ13253	str. NKB1	
AF177916	<i>Pseudomonas</i> DhA.91 str DhA.91	
D86Q01	<i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM 12022 (T)	
AB010853	str. HTB095	
Ps.aspleni	<i>Pseudomonas aspleni</i> LMG 2137 (T)	
Ps.putid0	<i>Pseudomonas putida</i> DSM 291 (T)	
AB021397	<i>Pseudomonas aspleni</i> ATCC 23835	
AB021381	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i> MAFF 301177	
45-8f.txt	Исследуемый штамм 45 EMM	



A.



Б.

Рисунок 22. Филогенетическое положение выделенных штаммов: А. 1 – штамма 23 (*Rhodococcus fascians*); 2 – штамма 29 (*Ochrobactrum anthropi*); 3 – штамма 45 (*Pseudomonas fluorescens*); Б. 4 – штамма 52 (*Pseudomonas guinea*).

Далее все штаммы были разделены на группы в зависимости от места их выделения (Табл. 9):

- бактерии, обитающие на поверхности фукуса из загрязненного НУ местообитания;
- бактерии, обитающие на поверхности фукуса из чистой акватории;
- бактерии, обитающие в воде загрязненной НУ;
- бактерии, обитающие в воде чистой от НУ акватории.

В результате было установлено, что на поверхности талломов *F. vesiculosus*, отобранных и в чистом, и в загрязненном НУ местообитаниях, встречаются два вида бактерий – *Pseudomonas fluorescens* и *Ochrobactrum anthropi*.

У фукуса из чистого района губы на талломах обнаружен также *Pseudomonas guinea*, а из загрязненного – *Rhodococcus fascians*. Важно отметить, что эти же виды микроорганизмов – *Pseudomonas guinea* и *Rhodococcus fascians*, были обнаружены нами и в воде чистого и

загрязненного НУ районов соответственно. В то же время, обнаруженный на фукусах из обоих местообитаний вид *Ochrobactrum anthropi* не встречался в воде губы Зеленецкая, и был обнаружен исключительно на поверхности талломов макрофитов.

Таблица 9.

Таксономический состав штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных с поверхности макрофитов в губе Зеленецкая.

Место выделения	№ штамма	Родовое и видовое название на основе анализа 16S РНК
Фукус из загрязненного НУ местообитания	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 35, 36, 37, 38, 39, 40	<i>Rhodococcus fascians</i>
	29, 30, 31, 32, 33, 34	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
Фукус из чистой акватории	66, 67, 68, 69, 70	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	13, 14, 15, 16, 17, 25, 26, 27, 28	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
	49, 50, 51, 52	<i>Pseudomonas guinea</i>
Вода из загрязненного НУ местообитания	88, 89, 90, 91, 92	<i>Rhodococcus fascians</i>
Вода из чистой акватории	53, 54, 55, 56	<i>Pseudomonas guinea</i>

На основании проведенных таксономических исследований выделенных штаммов эпифитных углеводородокисляющих бактерий можно сделать следующие выводы:

1. Вид *Pseudomonas fluorescens* не обнаружен в воде, но встречается на фукусе из обоих местообитаний, как чистого, так и загрязненного НУ.

2. Вид *Ochrobactrum anthropi* обнаружен только на фукусах из обоих местообитаний, возможно, он обладает видоспецифичной избирательностью к фукусу пузырчатому.

3. Вид *Rhodococcus fascians* встречается только в воде и на поверхности талломов фукусов в районе губы, загрязненной НУ. Ранее в литературе уже отмечалась приуроченность микроорганизмов этого рода к местообитаниям, хронически загрязненным НУ (Коронелли и др., 1994).

4. Вид *Pseudomonas guinea* встречается только на чистой станции, причем как на талломах фукуса, так и в воде вблизи его зарослей.

Имеются данные, что именно псевдомонады составляли от 60 до 90% культур микроорганизмов, выделенных из незагрязненных вод (Коронелли и др., 1994). В нашем случае доля *Pseudomonas fluorescens* от общего числа выделенных штаммов составляла 49 %, а *Pseudomonas guinea* – 9% (Табл. 7).

Что касается вод Баренцева моря, то углеводородокисляющие псевдомонады и родококки по данным И.В. Перетрухиной (2006), являлись обычными компонентами углеводородокисляющего микробного сообщества литорали как загрязненной НУ, так и чистой станций в Кольском заливе.

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

В литературе также отмечается, что на поверхности водорослей могут обнаруживаться бактерии рода *Bacillus*. В частности, ранее бактерии данного рода выделялись с поверхности морской травы *Zostera marina* отобранной из Японского моря (Куриленко и др., 2001; Беленева, Жукова, 2006). Отмечалось, что бактерии этого рода зачастую выделяются с поверхности

пресноводных макрофитов. Например, на рогозе узколистом они составляли до 50% от всего эпифитного бактериального сообщества (Морозов, 2001). Помимо этого, известно, что представители рода *Bacillus* могут присутствовать в водной среде, подверженной хроническому нефтяному загрязнению (Коронелли и др., 1994; Ильинский, 1998). В нашем случае с поверхности водорослей *F. vesiculosus* и из омывающей его воды данная группа бактерий не выделялась.

Таким образом, в ходе работы нами были выделены только 5 видов культивируемых УОБ, относящиеся к четырем родам. Поэтому можно было с уверенностью полагать, что основная часть углеводородокисляющих микробных ценозов как водорослей-макрофитов, так и морских вод, представляют собой некультивируемые формы микроорганизмов (ZoBell, 1946). Это подтвердили и наши дальнейшие исследования.

3.6. Таксономическая структура некультивируемых эпифитных бактериальных сообществ.

3.6.1. Идентификация (типирование) с использованием метода секвенирования нового поколения (NGS) нуклеотидных последовательностей, принадлежащих эпифитным бактериям водорослей *F. vesiculosus* из акваторий с разным уровнем загрязнения .

В результате молекулярно-генетического анализа образцов бактериальной ДНК, извлеченных с талломов фукусов, с использованием NGS, было идентифицировано 232 OTU (оперативных таксономических единицы), прочитано 10849 нуклеотидных последовательностей (НП) (1575 – из фукусов губы Зеленецкой (ДЗ), 4001 – Морского порта в районе Мурманского морского вокзала (МП), 5258 – Абрам-мыса (АМ) (Табл. 10).

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* (положение данного таксона в системе неясно).

Таблица 10.

Результаты секвенирования и типирования прокариотных нуклеотидных последовательностей из смывов с поверхности талломов *Fucus vesiculosus* из трех различных местообитаний.

Тип эпифитных бактерий	Всего нуклеотидных последовательностей	ДЗ		МП		АМ	
		Число нуклеотидных последовательностей	% от общего числа последовательностей	Число нуклеотидных последовательностей	% от общего числа последовательностей	Число нуклеотидных последовательностей	% от общего числа последовательностей
<i>Proteobacteria</i>	6327	775	49,21	2555	63,72	2997	56,93
<i>Bacteroidetes</i>	2048	632	40,13	445	11,10	971	18,45
<i>Actinobacteria</i>	395	69	4,38	149	3,72	177	3,36
<i>Verrucomicrobia</i>	410	67	4,25	183	4,56	160	3,04
<i>Planctomycetes</i>	1120	32	2,03	318	7,93	770	14,63
<i>Firmicutes</i>	58	-	-	54	1,35	4	0,08
<i>Cyanobacteria</i>	306	-	-	273	6,81	33	0,63
<i>Acidobacteria</i>	74	-	-	24	0,60	50	0,95
<i>Fusobacteria</i>	5	-	-	1	0,02	4	0,08
TM7	56	-	-	1	0,02	55	1,04
<i>Unclassified_Bacteria</i>	50	-	-	7	0,17	43	0,82
Всего	10849	1575		4010		5264	

Кроме этих 10 типов, к отдельному, 11-му типу, были отнесены все неидентифицированные НП (табл. 10). Соотношение обнаруженных типов НП в исследованных сообществах ЭБ из трех различных местообитаний зависело от степени загрязненности водной среды нефтепродуктами. Еще 50

нуклеотидных последовательностей были определены как принадлежащие неклассифицированным бактериям (*unclassified_Bacteria*).

На фукусах из ДЗ были обнаружены только 5 из упомянутых выше 11-ти типов эпифитных бактерий: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, и еще один не вошедший в табл. 10 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 типов *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*.

Кривая разрежения, отражающая связь между количеством OTU и числом прочтенных НП, построенная для станции, расположенной в губе Зеленецкая, возрастает медленнее, чем таковая для двух станций Кольского залива (МП и АМ), что также свидетельствует о меньшем разнообразии бактериального сообщества в губе Зеленецкой (Рис. 23).

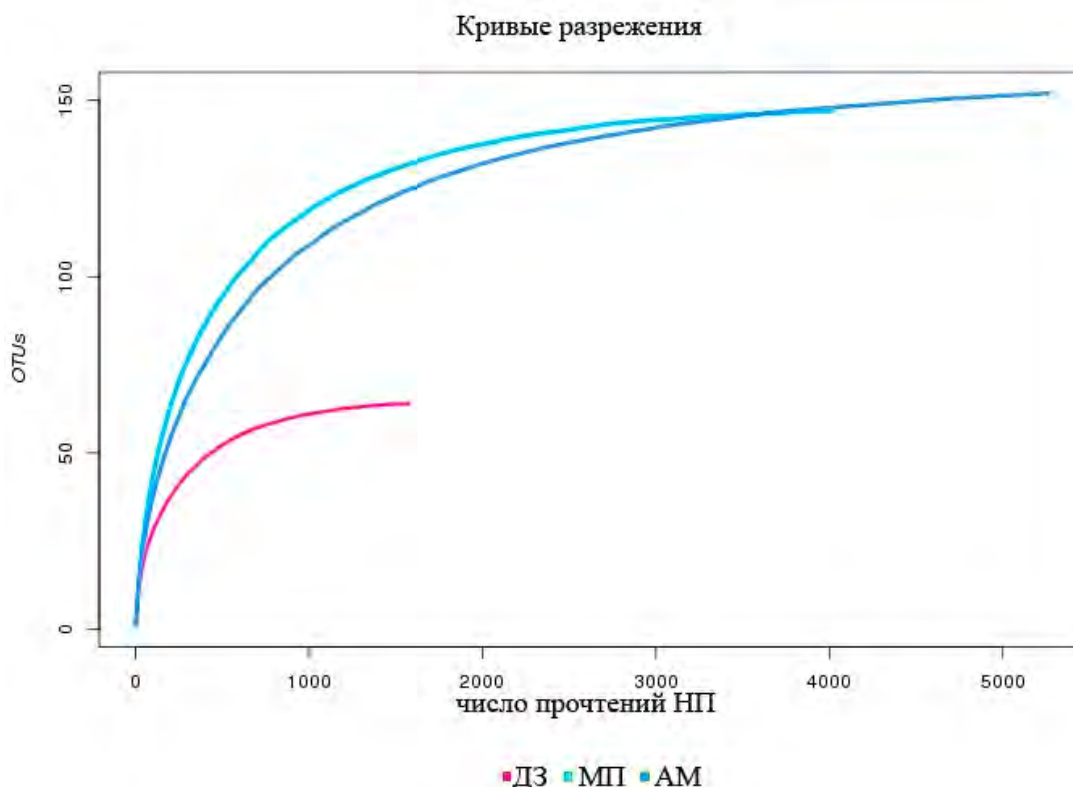


Рисунок 23. Кривые разрежения (Rarefaction curve) таксономического разнообразия, построенные на основании генетического анализа проб

бактериальной ДНК, выделенных из воды и фукусов трех отличающихся по степени загрязнения НУ акваторий.

Этот вывод подтверждается также и рассчитанными для этих местообитаний индексами разнообразия Шеннона (Рис. 24). Максимальные значения этого индекса приходятся на ЭБ фукусов из акватории МП, а минимальные – ДЗ.

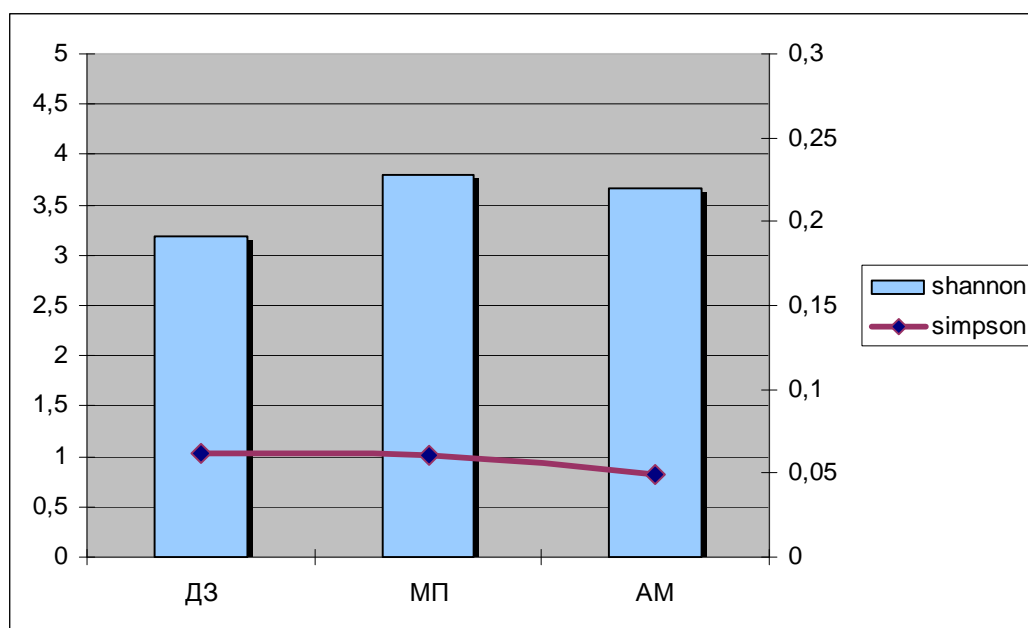


Рисунок 24. Индексы Шеннона и Симпсона, рассчитанные для эпифитных бактериальных сообществ фукусов из отличающихся по степени загрязнения НУ акваторий.

Как отмечено выше, наименьшее разнообразие сообщества ЭБ водорослей *F. vesiculosus* наблюдалось в чистой от нефтепродуктов губе Зеленецкой. Среди них отмечены представители 28 родов, относящиеся к 8 классам, 5 типам: Actinobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Proteobacteria, Verrucomicrobia. Основными доминантами при этом были представители типов *Proteobacteria* (49,21%) и *Bacteroidetes* (40,13%) (Рис. 25, Табл. 10). Значительную часть эпифитного бактериоценоза фукуса пузырьчатого из

загрязненной нефтепродуктами акватории составляли цианобактерии (табл. 10).

Среди ЭБ фукусов из акватории в районе поселка Абрам-мыс, так же как и из акватории МП доминировали протеобактерии (56,93%), наряду с ними отмечена большая доля представителей типа *Bacteroidetes* (18,44%).

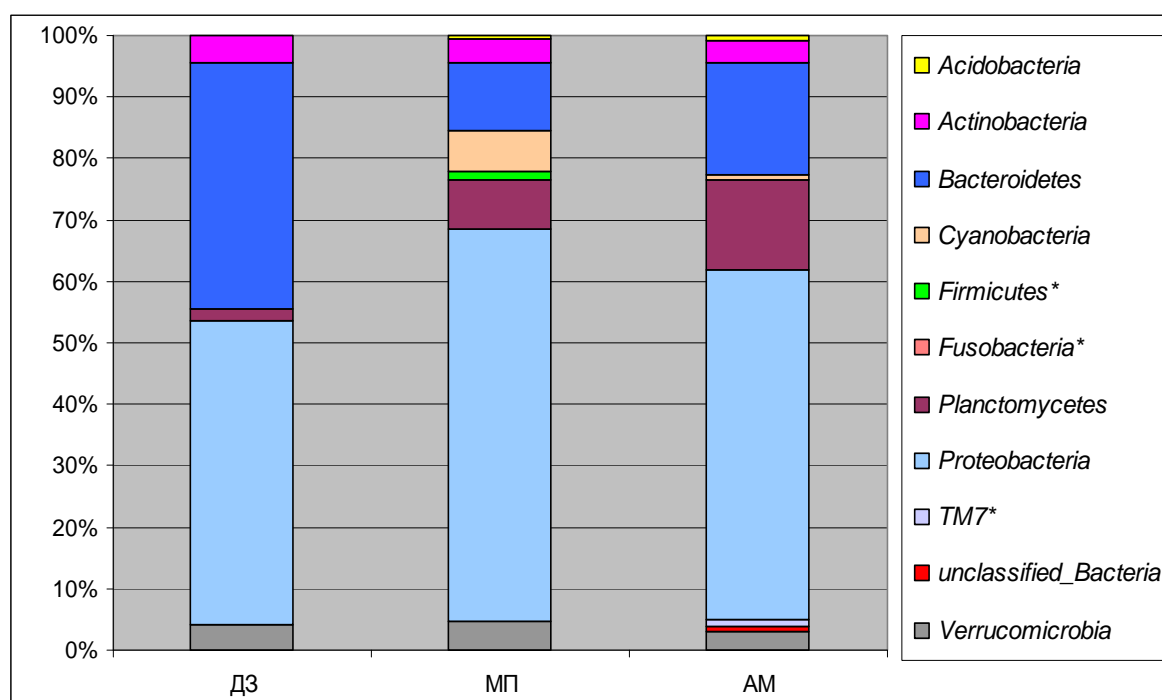


Рисунок 25. Доминирующие типы эпифитных бактерий водорослей *F. vesiculosus* из трех различных по степени загрязнения нефтяными углеводородами акваторий. * – доля бактерии данной группы может составлять менее 0,1%.

В пробах фукусов, отобранных из акваторий АМ и МП, были среди прочих обнаружены НП, принадлежащие к группе с неясным таксономическим положением (TM7). Доля ЭБ из числа представителей этой группы, обнаруженных на фукусах из акваторий МП и АМ, составила 0,025% и 1,045% соответственно. Известно, что группа TM7 является кандидатом на отнесение к типу *Saccharibacteria* (*Candidatus Saccharibacteria*) (Albertsen et al., 2013) и является одной из групп бактерий, о существовании которых известно только по обнаруженным соответствующим ей 16S рНК

сиквенсам. Представители этой группы широко распространены в природе и ранее их генотипы были обнаружены в донных осадках и осадках сточных вод, а также в загрязненных ДТ полярных почвах (Winsley et al., 2014). Ни один из видов этой группы до недавнего времени не был выделен в лабораторных условиях.

3.6.2. Таксономическая структура (классификация) представителей эпифитных бактериальных сообществ *F. vesiculosus*.

Таксономическая структура прокариотных представителей эпифитных сообществ *F. vesiculosus* из прибрежных акваторий губы Зеленецкой. Как уже отмечалось выше, доминантами сообщества ЭБ фукусов из акватории губы Зеленецкой были представители типов *Bacteroidetes* (40,138%) и *Proteobacteria* (49,21%). В литературе тип *Bacteroidetes* описывается как один из главных компонентов морских бактериоценозов (Bernardet, Nakagawa, 2006; Abell, Bowman, 2005). Среди ЭБ этой группы доминировали представители классов *Flavobacteria* (36,13 %) и *Sphingobacteria* (4,00 %) (Рис. 26).

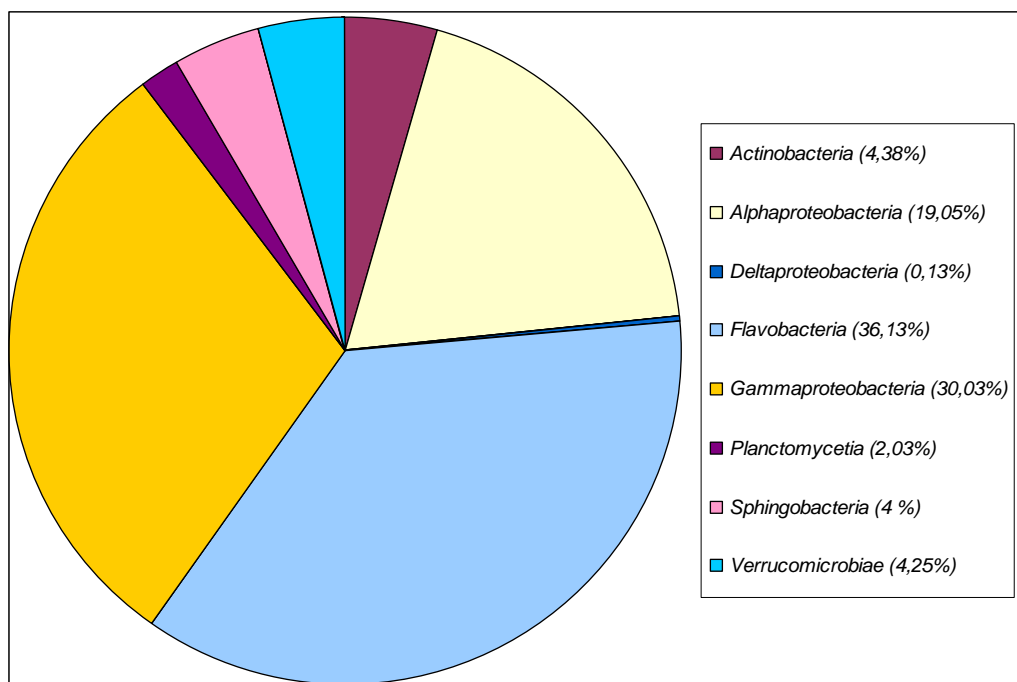


Рисунок 26. Классы эпифитных бактерий водоросли *F. vesiculosus* из губы Зеленецкой.

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 взвесью (Bolinches et al., 1988).

Кроме того, среди ЭБ фукусов губы Зеленецкой были обнаружены представители родов *Aquimarina* (0,19%), *Flaviramulus* (0,06%), *Leeuwenhoekiella* (0,25%), *Persicivirga* (1,46%), *Winogradskyella* (0,38%) и незначительное количество неклассифицированных флавобактерий (Рис. 27, Прил. 1).

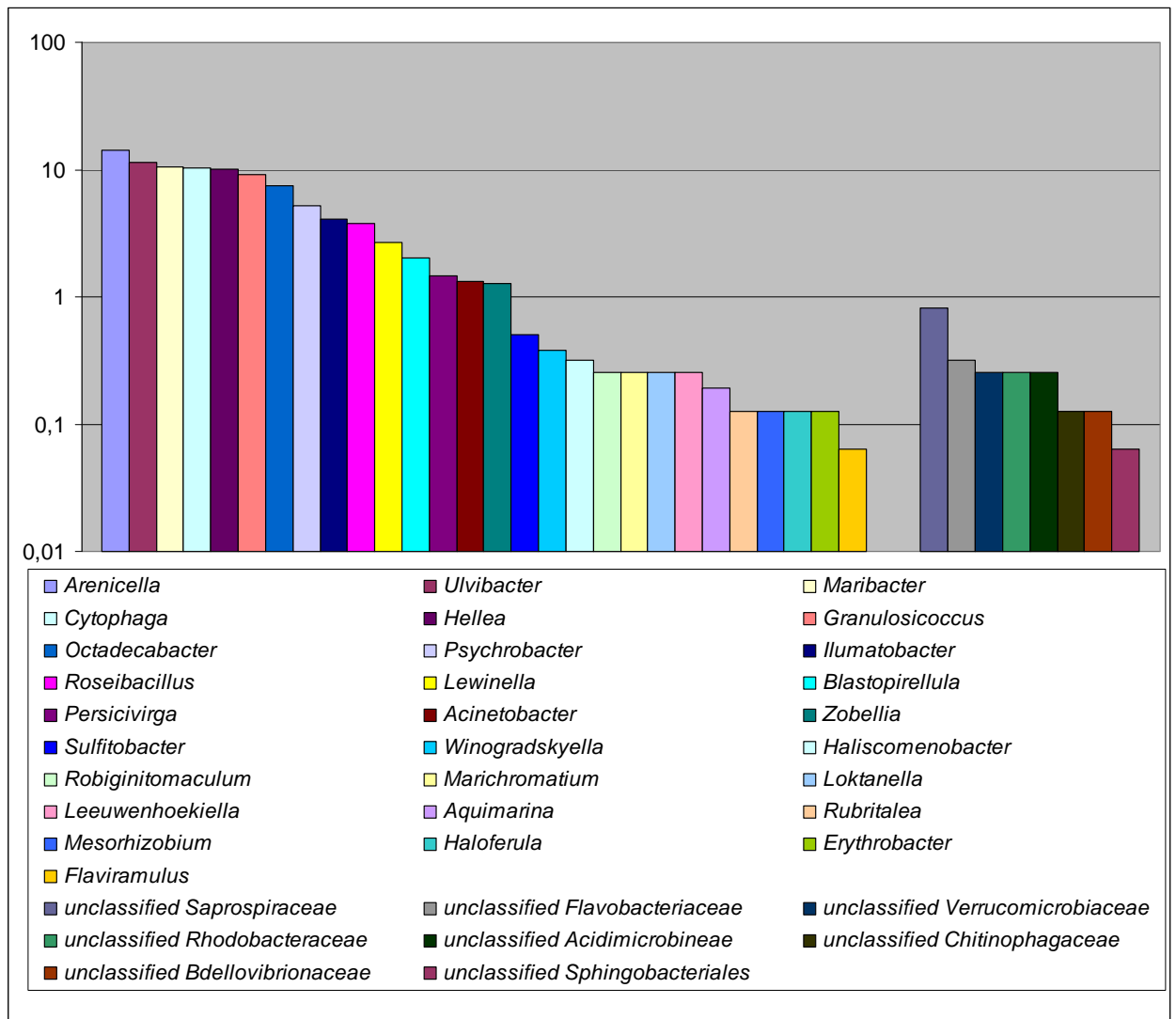


Рисунок 27. Список родов эпифитных бактерий водоросли *F. vesiculosus* из губы Зеленецкой и доля каждого из них.

Основное количество протеобактерий, обнаруженных наряду с другими таксономическими группами в составе ЭБ фукуса из губы Зеленецкой, было представлено классами *Gamma*proteobacteria и *Alphaproteobacteria* (Рис. 26). Большинство представителей гамма-протеобактерий входило в состав 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 не было отмечено вообще (см. Приложение 1). Доля бактерий трех типов – *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* и *Actinobacteria*, в совокупности составляла около 10,5 % от всего эпифитного бактериоценоза (табл. 10).

Таксономическая структура прокариотных представителей эпифитных сообществ *F.vesiculosus* из акватории Морского порта. Для акватории Кольского залива в целом характерен высокий уровень антропогенной нагрузки. Особенно сильно это проявляется в южном и среднем коленах, где находились две станции - МП и АМ, на которых производился отбор проб для молекулярно-генетического анализа. Есть сведения («Кольский залив. Освоение и рациональное природопользование»), что концентрации НУ в зоне МП могли превышать ПДК более чем в 20 раз и достигать 1 мг/л. В других районах отмечались концентрации НУ свыше 0,20 мг/л (Кольский залив..., 2009). Также высокое содержание НУ было отмечено в донных осадках этих станций. Согласно ежегодным Докладам о состоянии и об охране окружающей среды Мурманской области за 2012 – 2014 гг., индекс загрязненности вод в южном колене в 2012 г. составлял 1,49, а в 2013 г. – 2,76, что соответствовало IV и V классу загрязненности - водам грязным.

В акватории МП концентрация НУ в течение 2012 – 2014 гг. были достаточно высокими и в 2012 году изменялись в пределах от 0,05 до 0,66 мг/дм³ (1 – 13 ПДК), а в 2013 г. – от 0,07 до 0,83 мг/дм³ (1 – 16 ПДК).

Среднегодовое содержание нефтепродуктов в акватории МП составляло 4 – 5 ПДК (Доклад о состоянии..., 2012, 2013). Отмечается также, что кислородный режим здесь за исследуемый период был удовлетворительным.

В наших исследованиях в зоне хронического загрязнения на литорали Морского порта концентрация НУ достигала 1,2 мг/л, что значительно превышало ПДК.

На фукусах, собранных на участке побережья МП с высоким уровнем нефтяного загрязнения, расположенном вблизи Мурманского морского вокзала, преобладали бактерии из группы *Proteobacteria* (табл. 10). Они составляли более половины бактериального эпифитного сообщества (63,72%). Среди протеобактерий были обнаружены представители 4-х классов: *Alphaproteobacteria* (17,63%), *Betaproteobacteria* (0,42%), *Gamma**proteobacteria* (45,51%), *Deltaproteobacteria* (0,15%). Доминировали представители гамма-протеобактерий (45,5%) и альфа-протеобактерий (более 17,6%) (Рис. 28).

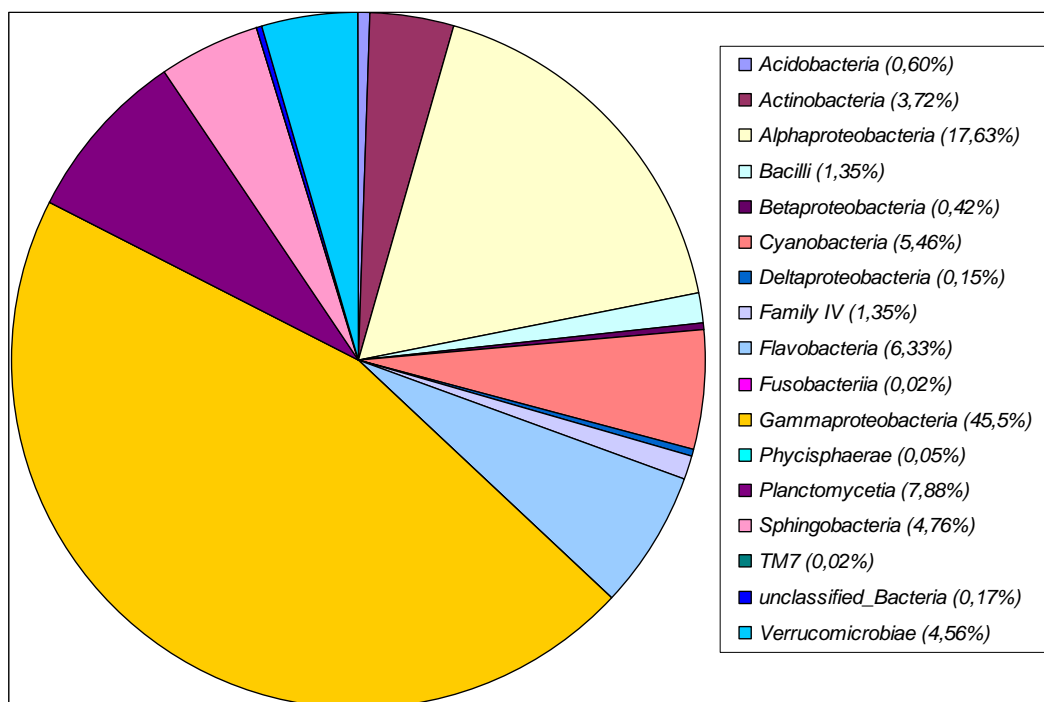


Рисунок 28. Классы эпифитных бактерий водоросли *F. vesiculosus* из района Мурманского морского вокзала.

При этом, 32 % протеобактерий составляли представители рода *Acinetobacter* (Рис. 29, Прил. 2).

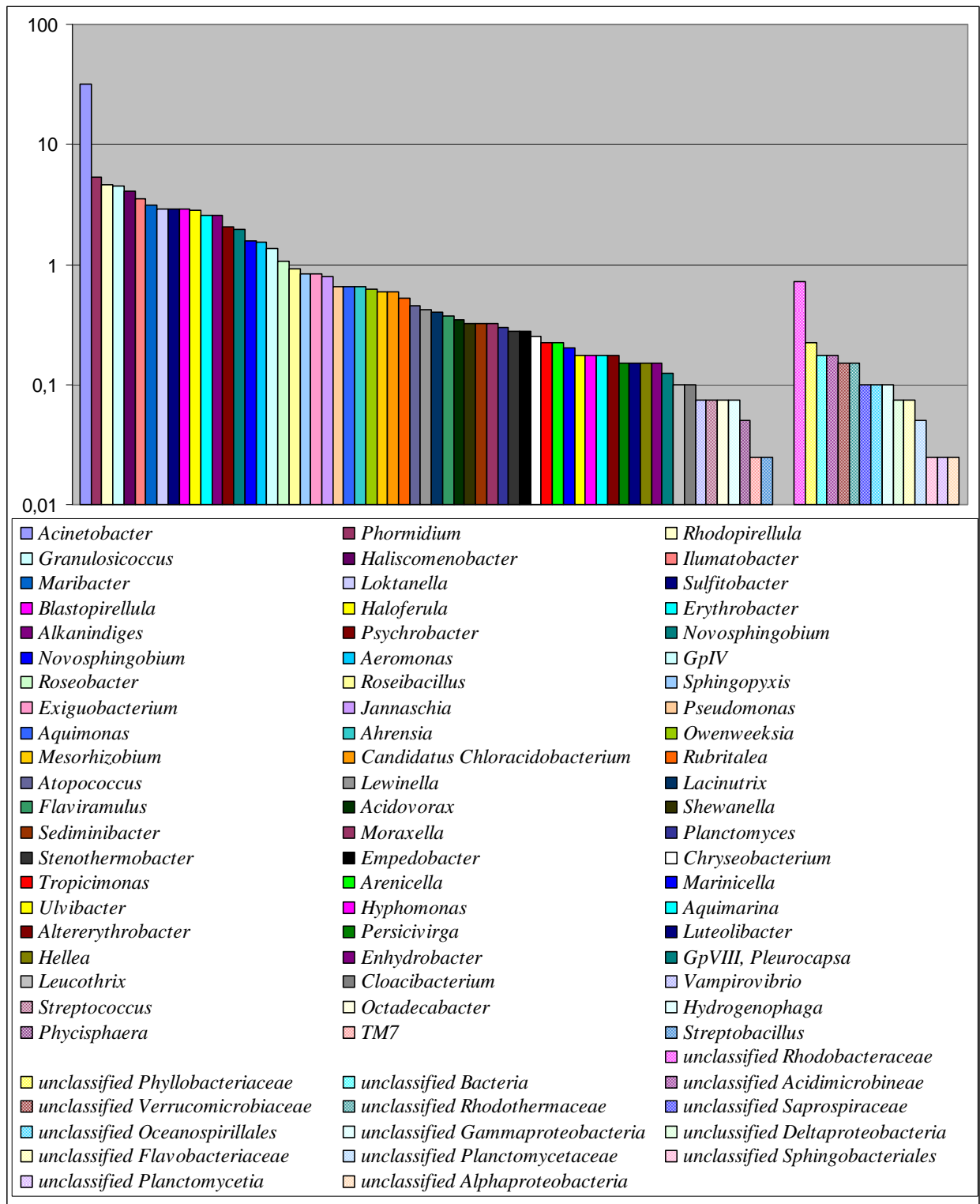


Рисунок 29. Список родов эпифитных бактерий и их доля для водоросли *F. vesiculosus* из акватории Морского порта.

В литературе акинетобактерии ранее были описаны как наиболее часто встречающиеся в загрязненных НУ акваториях (Коронелли, 1996). Кроме того, известно, что представители этого рода способны к утилизации тяжелых фракций нефти и с различной степенью интенсивности способны были разлагать сырую нефть (Hanson et al., 1997; Yu Chen et al., 2014).

Дельта-протеобактерии и бета-протеобактерии в совокупности составляли около половины процента (0,57%).

Количество представителей бактерий типа *Bacteroidetes* среди ЭБ фукусов Мурманского порта было значительно меньше, чем среди ЭБ фукусов из чистой от нефтепродуктов губы Зеленецкая (Рис. 25). Далее по убыванию численности следовали бактерии типов *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, собранных на побережье Кольского залива в районе поселка Абрам-мыс, были обнаружены все те же основные типы ЭБ, что и на фукусах из акватории морского порта. Также как и на последних, в эпифитных бактериальных сообществах фукусов Абрам-мыса доминировали протеобактерии. Однако в отличие от портовой зоны, где преобладали гамма-протеобактерии, на водорослях, обитающих в районе поселка Абрам-мыс, значительная часть сообщества ЭБ была представлена альфа-протеобактериями (34,65%). Доля гамма-протеобактерий составляла 21,35 % (Рис. 30).

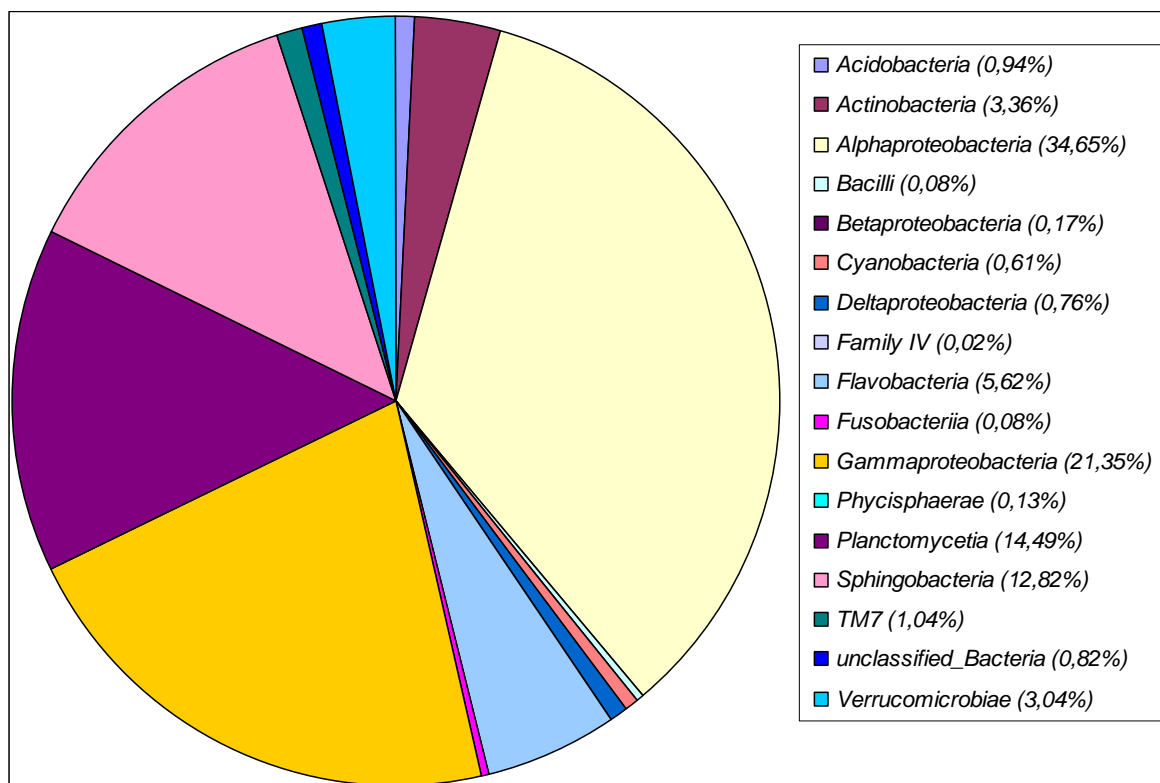


Рисунок 30. Классы эпифитных бактерий водоросли *F. vesiculosus* из акватории вблизи пос. Абрам-мыс.

Среди альфа-протеобактерий отмечены представители родов *Ahrensia* (4,82 %), *Altererythrobacter* (4,46%), *Erythrobacter* (2,07%), *Novosphingobium* (4,02%), *Sulfitobacter* (8,93%), *Sphingopyxis* (4,65%) и др. (Рис. 31, Прил.3).

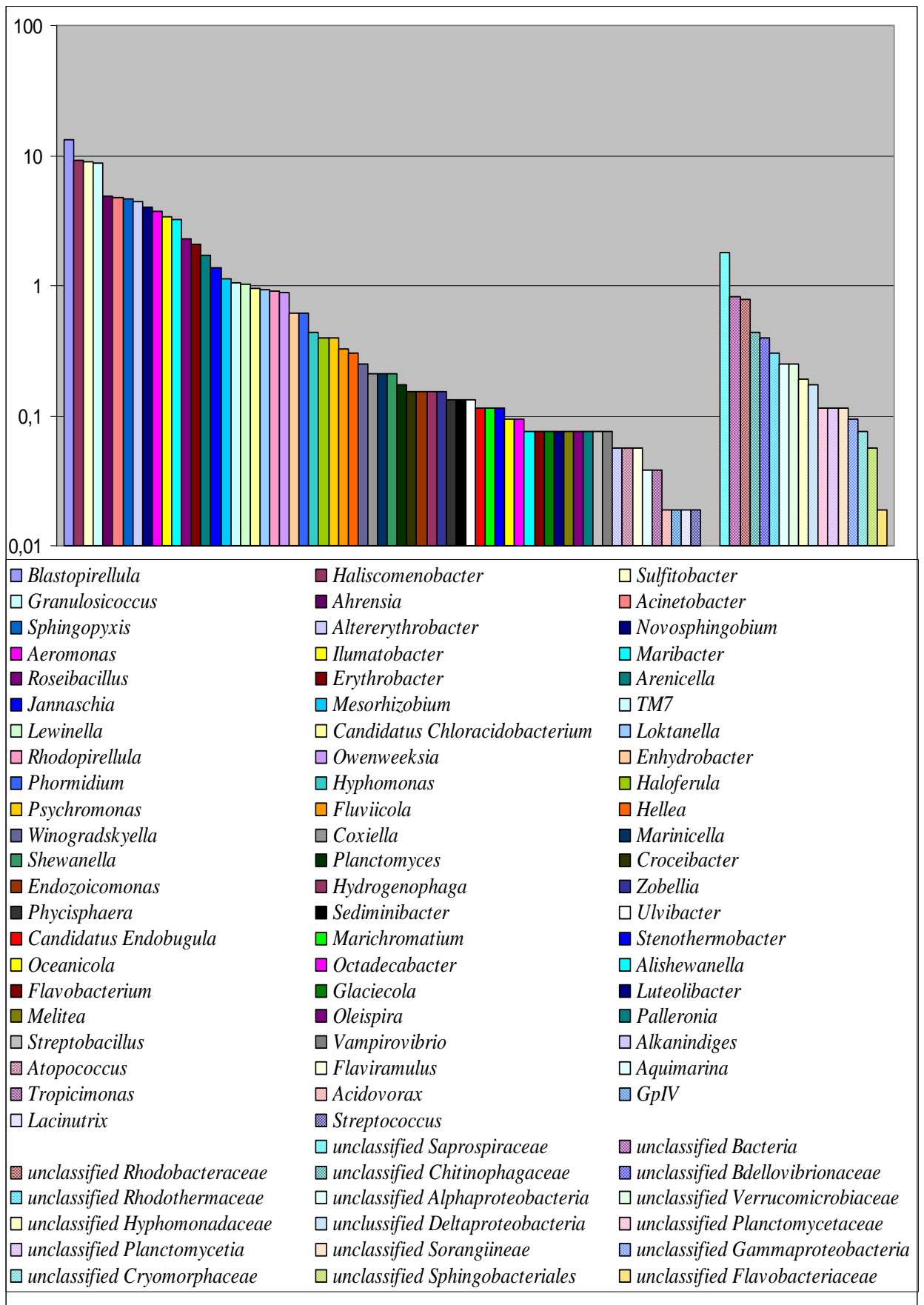


Рисунок 31. Список родов эпифитных бактерий водорослей *F. vesiculosus* из акватории вблизи пос. Абрам-мыс и доля каждого из них.

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

Цианобактерий в составе сообщества ЭБ фукуса было меньше, чем в составе ЭБ фукуса из акватории Морского вокзала.

Известно, что бактерии типов *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* являются обычным компонентом эпифитных бактериальных сообществ некоторых морских макрофитов в незагрязненных районах мирового океана. При этом среди представителей типа *Bacteroidetes* наиболее часто отмечались бактерии родов *Rhodobacteriaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Flavobacteriaceae* и *Sapropiraceae*, относящиеся к классам *Flavobacteria* и *Sphingobacteria*. У ульвариевых водорослей (*Ulva australis*) среди протеобактерий доминировали альфа-протеобактерии (54,4 – 70%), реже встречались гамма-протеобактерии (<1,0% – 8,4%) (Burke et al., 2011; Tujula et al., 2010). Наряду с протеобактериями встречались также и представители цианобактерий (Tujula et al., 2010). Ранее представители данной группы отмечались и на ламинариевых водорослях Баренцева моря (Москвина и др., 1995).

При изучении красных, бурых и зеленых водорослей среди крупных таксонов в литературе как доминанты отмечаются *Proteobacteria* (50%), *Bacteroidetes* (20%), *Firmicutes* (10%) и *Actinobacteria* (9%) (Hollants et al., 2013). На более низком таксономическом уровне (порядок) массовыми были *Flavobacteriales* (14%), *Alteromonadales* (12%), *Vibrionales* (10%), *Pseudomonadales* (9%), *Bacillales* (9%), *Actinomycetales* (8%) и *Rhodobacterales* (7%)

В целом, на уровне крупных таксонов (таких, как тип и класс), полученные нами результаты соответствуют данным, обнаруженным в литературе (см. выше).

Однако спускаясь ниже, до уровня рода, можно заметить и некоторые различия. Так, на ульвовых и фукусовых водорослях наиболее часто

отмечались представители следующих родов: *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* (Bolinches et al., 1988; Chan et al., 1969). При этом, на ульвовых водорослях из Сиднейской гавани были обнаружены ЭБ родов *Sphingopyxis* (11.2%), *Erythrobacter* (0.7%), *Hyphomonas* (1.7%), *Loktanella* (2.2%), *Sulfitobacter* (1.2%), *Maribacter* (1.2%), *Muricauda* (3.8%), *Krokinobacter* (4.7%), *Winogradskyella* (0.8%), *Lewinella* (1.3%) и *Haliscomenobacter* (4.8%), а также большое количество неклассифицированных бактерий семейства *Rhodobacteriaceae* (22.4%) (Burke et al., 2010). Некоторые отмеченные выше рода ЭБ отмечались и нами при работе с *F. vesiculosus* из Баренцева моря.

У ламинарии (*Saccharina latissima*) Баренцева моря были обнаружены ЭБ pp. *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Nocardia*, *Planococcus*, *Rhodococcus* (Кондратьева, Мун, 1995).

В наших исследованиях среди ЭБ фукусов из чистой акватории в основном отмечались представители родов *Ulvibacter*, *Maribacter*, *Cytophaga*, *Aquimarina*, *Flaviramulus*, *Leeuwenhoekella*, *Persicivirga*, *Winogradskyella*, *Arenicella*, *Granulosicoccus*, *Psychrobacter*, *Octadecabacter* и *Hellea*.

Ранее уже отмечалось, что таксономическая структура сообществ ЭБ в большой степени зависит от видовой принадлежности водорослей, на которых они обитают. Существует мнение, что бактериальные сообщества водорослей *Fucus vesiculosus* обладают специфичностью (Lachnit et al., 2013). Кроме того, в ряде работ исследовались только культивируемые представители ЭБ, таксономический состав которых существенно отличается от некультивируемых форм, а их таксономическое разнообразие значительно ниже. Последнее следует также и из результатов наших исследований, посвященных культивируемому ЭБ фукусов из акваторий с различным уровнем загрязнения НУ (раздел 3.6.3. настоящей диссертации).

ЭБ, обитающие на макрофитах в акваториях, загрязненных НУ, изучены не так полно как их свободноживущие формы и микроорганизмы, обитающие в грунтах различных водоемов. Среди свободноживущих

культивируемых УОБ, обитающих в водной среде, в литературе описано от 22 до 28 родов (Коронелли, 1996; Atlas, Bartha, 1992). Наиболее известны представители родов *Acinetobacter*, *Actinomadura*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Pseudonocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и др.

Экспериментальные работы, связанные с исследованием экологии УОБ, показали, что после попадания больших количеств НУ в водную среду, в обитающем в ней бактериальном сообществе происходят серьезные изменения в составе доминирующих групп культивируемых бактерий (Ильинский и др, 1992). Если в начале полевого эксперимента, проведенного в Можайском водохранилище, вскоре после попадания в водоем ДТ, в нем преобладали представители УОБ родов *Acinetobacter* и *Arthrobacter*, то к концу его они сменялись УОБ родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Однако после попадания в водоем сырой нефти в нем наблюдалась уже иная картина. На ранних стадиях эксперимента в среде доминировали УОБ родов *Rhodococcus* и *Arthrobacter*, а к концу эксперимента - *Acinetobacter* и *Arthrobacter*.

Сравнивать результаты экспериментов В.В. Ильинского с сотрудниками и полученные нами данными не совсем корректно, поскольку в первом случае исследовались только свободноживущие и к тому же пресноводные планктонные бактерии, а во втором – обитающие на водорослях ЭБ. Однако важно отметить, что нами в качестве абсолютного доминанта среди ЭБ фукуса из сильно загрязненной НУ акватории были также отмечены бактерии рода *Acinetobacter*, которые постоянно выделялись В.В. Ильинским с сотрудниками из водохранилища после его загрязнения НУ.

В разделе 3.4.3. настоящей работы нами представлена информация по определению таксономической принадлежности культивируемых ЭБ, выделенных из талломов фукусов, обитающих в загрязненных НУ и чистых морских акваториях, а культивируемых свободноживущих бактерий,

изолированных из этих же акваторий. Генетический анализ в данном случае проводился нами уже после выделения чистых культур. Было установлено, что основными культивируемыми бактериями являлись представители родов *Ochrobactrum*, *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Это в большей степени соответствует информации, полученной из тех источников литературы, в которых были описаны результаты исследований, проведенных сходными методами. В частности, в ходе наших исследований, проведенных в губе Зеленецкой, среди эпифитных ЭБ фукусов, также как и в морской воде после ее загрязнения НУ, были обнаружены культивируемые бактерии родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, которые также практически постоянно выделялись В.В. Ильинским с сотрудниками из загрязненного НУ поесноводного водоема. Это может свидетельствовать о том, что представители данных родов гетеротрофных бактерий, которые принимают активное участие в разрушении НУ, являются космополитами, обитающими как в полярных морских акваториях, так и в пресных водоемах умеренных широт.

Исследование некультивируемых бактерий фукуса нами проводилось с использованием метода «Total DNA» (см раздел «Материалы и методы»). При этом в смыв с поверхности водорослей попадала вся бактериальная ДНК, находившаяся на поверхности макрофитов. Использование данной методики позволило избежать стадии выделения чистых культур, поскольку дальнейшие работы проводились непосредственно с этим генетическим материалом.

В результате, на фукусах из загрязненной НУ прибрежной акватории Баренцева моря нами в общей сложности было обнаружено 63 рода ЭБ, а также 15 родов, которые не удалось классифицировать. Помимо уже неоднократно упоминавшихся акинетобактерий, нами было отмечено присутствие среди ЭБ фукусов большого количества бактерий - представителей родов *Rhodopirellula*, *Granulosicoccus*, *Haliscomenobacter*, *Plumatobacter*, цианобактерии рода *Phormidium* и некоторых других.

Мы не можем утверждать, что все идентифицированные нами бактерии являются углеводородокисляющими. В литературе имеются данные, что существует большая группа микроорганизмов, не усваивающих углеводороды, но способных существовать и развиваться даже при их высоких концентрациях в среде. Эти микроорганизмы, в частности, могут давать рост на агаризованных питательных средах с добавлением углеводов в качестве источника углерода и энергии, потребляя вещества, входящие в состав агара. Эти микроорганизмы были названы углеводородустойчивыми, было показано, что при посевах проб морской воды на агаризованные среды с НУ углеводородустойчивые бактерии могут составлять до 50% всех бактерий, которые дали рост на этих средах. (Ильинский, 1979). Вероятно, сходная картина имеет место и в природных условиях. Это подтверждают и работы зарубежных исследователей (Colwell, 1978; Mills et al; 1978), которые показали, что культивируемые углеводородустойчивые микроорганизмы широко распространены в бактериальных сообществах водных экосистем. Учитывая незначительный процент культивируемых бактерий в бактериоценозах воды и почвы, можно предположить, что численность некультивируемых углеводородустойчивых бактерий в этих местообитаниях тоже может быть высокой. Что касается непосредственно некультивируемых ЭБ фукуса, то среди них доля углеводородустойчивых бактерий может быть также высокой, поскольку фукусковые водоросли, как и другие макрофиты, способны продуцировать значительное количество лабильных ОВ, которые могут служить источником углерода и энергии для данной группы микроорганизмов (также как и другие лабильные ОВ, обычно присутствующие в морской воде, особенно загрязненной).

Нами уже отмечалось выше (п. 3.1.), что характерной особенностью прибрежных акваторий с хроническим нефтяным загрязнением является большая доля в них цианобактерий, которая достигает 6,8 % всего бактериального сообщества (Рис. 10, 11, 25). В результате молекулярно

генетического анализа были идентифицированы представители группы IV (Gr IV), относящейся к семейству IV (Gr VIII) и группы VIII (Gr VIII), относящейся к семейству VIII (Family VIII). Первые являются цианобактериями LPP типа (рода *Lyngbya*, *Plectonema*, *Phormidium*) и представляют собой нитчатые структуры, не образующие гетероцист (*Anagnostidis*. Komárek, 1988, *Komárek, Anagnostidis*, 2005; Komárek et al., 2014). Вторые представлены цианобактериями рода *Pleurocapsa* и родственными ему родами (Komárek *Anagnostidis*, 1986 , *Komárek, Anagnostidis*, 1998; Komárek et al., 2014). Они могут быть одноклеточными или колониальными формами, для которых характерно формирование бaeоцитов (мелких репродуктивных клеток) путем множественных делений материнских клеток. Организмы обеих групп не являются азотфиксирующими.

В литературе есть сведения о возможности адаптации цианобактерий к загрязнению среды нефтепродуктами (Гапочка, 1981; Raghukumar et al., 2001) и о способности многих из них переходить к фотогетеротрофному образу жизни (Кабиров, Минибаев, 1982) и даже к полностью гетеротрофному от чисто автотрофного. По данным литературы, присутствие цианобактерий в ассоциациях с углеводородокисляющими микроорганизмами может приводить к увеличению численности последних в эпифитных бактериоценозах (Линькова, 1979; Гусев и др., 1981; Гусев и др., 1982).

Также обращает на себя внимание низкое таксономическое разнообразие ЭБ фукусов из незагрязненного местообитания (ДЗ) по сравнению с фукусами из двух других акваторий –МП и АМ. Очевидно, что НУ, постоянно присутствующие в этих двух акваториях, представляют собой важный дополнительный пищевой ресурс для микроорганизмов, способствующий привлечению и размножению значительно большего количества таксономически разнообразных эпифитных бактерий по сравнению с акваторией губы Зеленецкой, где этот пищевой ресурс отсутствует. В загрязненных нефтью прибрежных акваториях Морского

порта и Абрам-мыса могут присутствовать и другие, привлекательные для бактерий, вообще, и ЭБ в частности, пищевые субстраты, поскольку уровень антропогенной нагрузки на эти акватории очень велик. В 2012 году среднегодовое значение БПК₅ для проб воды, взятых в районе порта, превысило ПДК почти в два раза (Доклад о состоянии..., 2012, 2013). Однако даже несмотря на высокие концентрации легкоокисляемой органики, таксономическая структура эпифитного бактериоценоза фукусов из района Морского порта оказалась характерной именно для нефтезагрязненных районов. Абсолютное доминирование среди ЭБ представителей рода *Acinetobacter* может указывать на ключевую роль в формировании данного бактериального сообщества хронического загрязнения среды нефтепродуктами.

Обнаруженную нами своеобразную таксономическую структуру эпифитного бактериального сообщества фукусов, обитающих на литорали в районе поселка Абрам-мыс можно объяснить тем, что этот район занимает промежуточное между акваториями ДЗ и МП положение по степени загрязнения вод НУ. В районе АМ, помимо постоянного присутствия НУ, наблюдаются также и повышенные концентрации биогенных элементов, которые являются важным фактором, определяющим трофность водоема, и способны оказывать значительное влияние в том числе и на формирование находящихся здесь бактериоценозов. Сотрудниками кафедры биохимии Мурманского государственного технического университета под руководством С.И. Овчинниковой было показано, что в районе АМ отмечалось превышение ПДУ для водоемов рыбохозяйственного назначения по содержанию аммонийного азота и железа (Овчинникова и др., 2012).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Проведенные нами исследования позволили получить оригинальные данные о количественном и качественном составе некультивируемых и культивируемых эпифитных бактериоценозов фукусовых водорослей из чистых и загрязненных НУ прибрежных акваторий Баренцева моря, а также о численности и таксономическом составе культивируемых представителей морских углеводородокисляющих планктонных бактерий, обитающих в этих акваториях. Этому способствовал сравнительный анализ собственных данных и сведений из литературы, который выявил отсутствие единой методики учета численности ЭБ, в частности – отсутствие надежного метода для их удаления с поверхности фукусовых водорослей. Проведенный критический анализ различных методов наряду с их апробацией в лабораторных и полевых условиях позволил впервые показать, что наиболее репрезентативным является способ удаления ЭБ с талломов фукусов с помощью ватных аппликаторов. Этот метод также позволил сохранить жизнеспособность большинства клеток культивируемых форм бактерий, что было важно для их дальнейшего исследования.

Известно, что среди культивируемых УОБ самыми изученными являются бактерии родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus* (Коронелли и др, 1994; Ильинский, 2001; Kenzo Kubota et al, 2008). В настоящем исследовании нами были выделены и идентифицированы с помощью анализа 16S рРНК доминирующие представители культивируемых УОБ, которые были отнесены к родам *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*), *Rhodococcus* (*Actinobacteria*), *Bacillus* (*Firmicutes*), *Ochrobactrum* (*Alphaproteobacteria*). Результаты молекулярно – генетического анализа значительно дополнили данные, полученные с использованием «классических» методов микробиологии. В частности, впервые было показано существенные различия таксономического состава бактериальных сообществ, обитающих на водорослях *F.vesiculosus* из районов, отличающихся по степени нефтяного загрязнения.

Использование комплекса современных методов исследования, включая электронную микроскопию, позволило выполнить количественный и качественный анализы бактерий, обитающих на трех основных частях таллома фукуса. Максимальное количество ЭБ было обнаружено на нижних, наиболее старых участках таллома, а минимальное – на его вершечной (апикальной) части. Объясняется это тем, что именно на вершечном участке макрофиты в период роста выделяют бактериостатические или бактерицидные вещества, изменяют рН, и в результате создают неблагоприятные условия для прикрепления к их талломам эпифитных организмов. Несомненное влияние на подобную локализацию ЭБ оказывает также и структура поверхности таллома: гладкая в апикальной зоне и шероховатая и складчатая в нижней части таллома, что было показано нами с использованием трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.

Результаты проведенных нами 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 бактериально – водорослевой ассоциации играют также и фукусовые растения: нами было установлено, что в присутствии фукусовых водорослей разрушение НУ происходит быстрее, чем в присутствии только ЭБ без фукусов.

До сих пор эпифитные бактериальные сообщества морских макрофитов изучены не так полно, как планктонные бактерии. Несмотря на то, что 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 нефтяного загрязнения.

Для решения этой задачи с талломов фукусовых водорослей, отобранных в загрязненных НУ морских водах Баренцева моря и в незагрязненных НУ акваториях нами были выделены и идентифицированы чистые культуры доминирующих там культивируемых эпифитных УОБ, которые принадлежали к родам *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*), *Rhodococcus* (*Actinobacteria*), *Bacillus* (*Firmicutes*), *Ochrobactrum* (*Alphaproteobacteria*). Если представители трех первых родов, способные к окислению НУ, были хорошо известны из литературы и ранее, то УОБ, принадлежащих к роду *Ochrobactrum* ранее из вод Баренцева моря не выделяли.

Проведенный молекулярно – генетический анализ биологического материала, удаленного с талломов фукусовых водорослей, позволил получить новые данные о составе некультивируемых ЭБ фукуса, которые оставались "за кадром" при использовании только "классических" микробиологических методов, связанных с необходимостью выделения для таксономического исследования чистых культур микроорганизмов. В результате впервые были показаны существенные различия таксономического состава сообществ ЭБ, обитающих на водорослях *F. vesiculosus* в районах, существенно отличающихся по степени загрязнения НУ. На макрофитах из сильно загрязненной нефтепродуктами акватории МП преобладали бактерии из группы *Gammaproteobacteria*, принадлежащей к типу *Proteobacteria*. Основными их представителями были микроорганизмы рода *Acinetobacter*, хорошо известные как активные участники процессов естественного очищения морских и пресных вод от НУ. На фукусах из незагрязненной НУ акватории наряду с бактериями из типа *Proteobacteria* доминировали бактерии, принадлежащие к типу *Bacteroidetes*. Из литературы данный тип микроорганизмов известен как один из

доминирующих компонентов морских бактериоценозов незагрязненных акваторий (Bernardet, 2006; Abell, Bowman, 2005).

На фукусовых водорослях, обитающих в районе АМ с меньшим по сравнению с МП уровнем загрязнения НУ, помимо бактерий из группы *Bacteroidetes* были широко распространены представители группы *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria*). Исходя из данных проведенного таксономического анализа можно утверждать, что акватория АМ загрязнена не только НУ, но и другими ОБ антропогенного происхождения. На это указывает обнаружение в водах данной акватории разнообразных представителей альфапротеобактерий (*Erythrobacter*, *Sulfitobacter*, *Altererythrobacter* и др.), характерных для вод, богатых легкоокисляемым ОБ.

Кроме того, в загрязненных акваториях, находящихся в Кольском заливе (МП и АМ), среди ЭБ фукусовых обнаружена высокая доля цианобактерий. На фукусах из незагрязненной губы Зеленецкой представителей данной группы микроорганизмов обнаружено не было. Присутствие в акватории Кольского залива значительного количества цианобактерий можно объяснить поступлением в него мощного пресного стока рек Тулома и Кола. Кроме того, обнаруженные нами цианобактерии часто встречаются в почвенных и водных бактериоценозах загрязненных нефтью районов, где они образуют ассоциации с УОБ, активность которых в процессах биодegradации НУ при этом возрастает по сравнению с таковой УОБ, не ассоциированных с цианобактериями.

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

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 эпифитных бактерий и таксономическом анализе их бактериоценозов.
2. Количества бактерий на поверхности талломов фукусов из загрязненной нефтепродуктами акватории значительно превышали таковые 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. 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 фукусов из обоих местообитаний 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 Баренцева моря с разным уровнем нефтяного загрязнения, определенными на основании анализа 16S рРНК, были *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas guinea*, *Ochrobactrum anthropi*, *Rhodococcus fascians*.

7. В составе некультивируемых 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 TM7.

8. Наименьшее разнообразие некультивируемых представителей эпифитного бактериального сообщества обнаружено 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 Морского порта с самым высоким уровнем нефтяного загрязнения преобладали бактерии, принадлежащие к типу *Proteobacteria* (>63%) с доминированием представителей рода *Acinetobacter* (32% от состава всего бактериоценоза). На фукусах из умеренно загрязненной нефтепродуктами морской акватории вблизи поселка Абрам-мыс было обнаружено максимальное количество родов бактерий (66), доминировали также представители типа *Proteobacteria*, среди которых большинство (35 %) составляли альфапротеобактерии.

9. Эпифитные бактериоценозы фукусовых водорослей способны к утилизации нефтяных углеводов, успешно выдерживают их высокие

концентрации в водной среде и потому способны вносить значимый вклад в процессы деструкции нефтяных загрязнений в прибрежных морских акваториях полярных и умеренных широт.

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 нашими работами, связанными с молекулярно-генетическим анализом бактериальных сообществ эпифитных бактерий. Отдельно автор благодарит сотрудников лаборатории альгологии ММБИ КНЦ РАН д.б.н. Макарова М.В. и к.б.н. Рыжик И.В. за поддержку, рекомендации и консультации по вопросам альгологического характера.

Список литературы.

Байтаз О.Н., Байтаз В.А. Некоторые данные о пространственном распределении бактериопланктона Баренцева моря // Комплексные океанологические исследования Баренцева и Белого морей. – Апатиты: Изд. КНЦ АН СССР, 1987. – С. 84-89.

Бардан С.М., Дружков К.В., Бобров Ю.А., Байтаз В.А. Комплексный экологический мониторинг в губе Дальнезеленецкая (Баренцево море): зимне-весенний период 1987-1988 г.: препр. – Апатиты: Изд. КНЦ АН СССР, 1989. – 41 с.

Бардан С.И., Дружков Н.В., Байтаз В.А., Челейкин С.А., Крымский А.В. Комплексный экологический мониторинг в губе Дальнезеленецкая (Баренцево море): летнее-осенний период 1989 г. Структурные характеристики: препринт. – Апатиты: Изд. КНЦ АН СССР. 1990. – 36 с.

Бардан С.И., Широколов В.Н. Гидролого-гидрохимические исследования. Контроль экологической ситуации в районе опытно-промышленной плантации водорослей в губе Дальнезеленецкой (Оперативно-информационный материал). Препринт. – Апатиты: Изд. КНЦ АН СССР, 1988. – С.7-23.

Баренцево море // Гидрометеорология и гидрохимия морей СССР Гидрометеоздат. – 1990. – Т. 1. – Вып.1. – 278с.

Белая Т.И., Потапова Н.А. О связи продукционных показателей фито- и бактериопланктона Белого моря с концентрацией биогенных элементов // Вестник МГУ, сер. биол. – 1976. – № 1. – С. 85-90.

Богданова О.Ю. Пространственно-временная изменчивость гетеротрофных бактериальных сообществ воды литорали Кольского залива : дисс...канд. биол. наук. – М., 2003. – 147 с.

Богоров В. Г. Биологическая трансформация и обмен энергии и веществ в океане // Океанология. – 1967. – Т. 7, № 5. – С. 104-123.

Богоров В. Г. Планктон мирового океана. – М.: Наука, 1974. – 320 с.

Бокова, Е.Н. Количественное распределение бактерий в Баренцевом и Карском морях // Тр. ВНИРО. – 1937. – Т. 4, № 1. – С. 373-377.

Буткевич В.С. Бактериальное население Арктических море и его распределение в воде и грунтах. По материалам экспедиций научного и океанографического институтов на судне «Персей» (1928-1933 гг.) // Избранные тр. – 1958. – Т. 2. – С. 77-134.

Буткевич В.С. О бактериальном населении морских вод в высокоширотных арктических районах // ДАН СССР. – 1938. – Т. 19, № 8. – С. 651-652.

Буткевич В.С. Образование железо-марганцевых конкреций в море и микроорганизмы, участвующие в этом процессе // Тр. Морского научн. ин-та. – 1928. – Т. 3, № 3. – С. 113-128.

Буткевич, В.С. Метод бактериального исследования и некоторые данные о распределении бактерий в воде и осадках Баренцева моря // Тр. Океанографического ин-та. – 1932. – Т. 2, № 2. – С. 5-37.

Воскобойников Г.М. К вопросу об адаптации и регуляции роста морских макрофитов северных широт // Морская флора и фауна северных широт (механизмы адаптации и регуляции роста организмов). Мат. 2-ой Всерос. Школы по морской биологии. – Апатиты: Изд. КНЦ РАН, 2004. – С. 15-30.

Воскобойников Г. М. Механизмы адаптации, регуляции роста и перспективы использования макрофитов Баренцева моря: автореферат дисс. докт. биол. наук. – Мурманск: ММБИ, 2006. – 46с.

Воскобойников Г.М., Камнев А.Н. Морфофункциональные изменения хлоропластов в онтогенезе водорослей. – Л.: Наука, 1991. – 96 с.

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.

Воскобойников Г.М., Титлянов Э.А. Изучение анатомии и ультраструктуры красной водоросли *Grateloupia turuturu* из различных по освещенности мест обитания // Экологические аспекты фотосинтеза морских макроводорослей. – Владивосток: изд. ДВНЦ АН СССР, 1978. – С. 83-87.

Гапочка Л.Д. Об адаптации водорослей. М.: Изд-во МГУ, 1981. – 80с.

Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2005 году. – М.: Министерство природных ресурсов Российской Федерации, АНО «Центр международных проектов», 2006. – 500 с.

Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2006 году. – М.: Министерство природных ресурсов Российской Федерации, АНО «Центр международных проектов», 2007. – 500 с.

Гусев М. В., Коронелли Т. В., Сенцова О. Ю. и др. Нефтеокисляющая микрофлора арктических морей СССР // Микробиология. – 1978. – № 4. – С. 762-764.

Гусев М.В., Коронелли Т.В., Линькова М.А., Ильинский В.В. Изучение ассоциации цианобактерий и нефтеокисляющих бактерий в условиях нефтяного загрязнения методом полного факторного эксперимента // Микробиология. – 1981. – Т. 50, Вып. 6. – С. 1097-1103.

Гусев М.В., Линькова М.А., Коронелли Т.В. Влияние нефтяных углеводов на жизнеспособность цианобактерий в ассоциации с нефтеокисляющими бактериями // Микробиология. – 1982. – Т. 51, Вып. 6. – С. 932-936.

Дмитриева Б.Ю., Дмитриев С.М. Симбиотическая микрофлора бурых водорослей рода *Laminaria* как биоиндикатор экологического состояния прибрежных ламинариевых биоценозов // Биология моря. – 1996. – Т. 22, №5. – С. 300-305.

Дударенко, О.Н. Численность бактериопланктона восточной части Баренцева моря летом 1978 г. // Планктон прибрежных вод Восточного Мурмана. – Апатиты: изд-во Кольского филиала АН СССР, 1982. – С. 40-46.

Доклад о состоянии и об охране окружающей среды Мурманской области в 2012 году. – Мурманск: Индивидуальный предприниматель Щербаков Максим Леонидович, 2013. – 152 с.

Доклад о состоянии и об охране окружающей среды Мурманской области в 2013 году. – Нижний Новгород: Индивидуальный предприниматель Кузнецов Никита Владимирович, 2014. – 152 с.

Елиин Ю. А. Приток речных вод в Баренцево и Белое моря и его колебания внутри года и в многолетнем разрезе. Водные ресурсы. – 1979. – Т. 2. – С. 20-32.

Звягинцев Д.Г. Оценка количества микроорганизмов в почвах разных типов // Микроорганизмы в сельском хозяйстве. – 1970. – С.227 – 229.

Звягинцев Д.Г., Галкина Г.М. Обработка ультразвуком как способ подготовки почвы к микробиологическому анализу // Микробиология, – 1968. – Т. 36, № 6. – С. 1087 – 1095.

Ильинский В.В., Поршинева О. В., Комарова Т.И. и др. Угледородокисляющие бактериоценозы незагрязненных пресных вод и их изменения под влиянием нефтяных углеводородов // Микробиология. – 1998. – Т. 67, № 2. – С. 267-273.

Ильинский В.В. Экология угледородокисляющих морских бактерий: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М.: МГУ, 1979. – 25 с.

Ильинский В.В. Гетеротрофный бактериопланктон // Практическая гидробиология: Учеб. для ун-тов. Под ред. В.Д. Федорова и В.И. Капкова. М.: ПИМ, 2006. – 367 с.

Ильинский, В.В. Бактериопланктон поверхностных вод Центральной Арктики в период календарной весны // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 5. – С. 696-704.

Исаченко Б.Л. Исследования над бактериями Северного Ледовитого океана // Тр. Мурманской научно-промысловой экспедиции 1906 г. – Петроград, 1914. 297 с.

Исаченко Б.Л. Микробиологическая характеристика грунтов и воды Карского моря // Тр. Аркт. Ин-та. – 1937 – Т. 82. – С. 1-30.

Исаченко, Б.Л. Микробиологические исследования морей Советского союза (1917 – 1937 гг.) // Микробиология. – 1937. – Т. 6, № 8. – С. 964-982.

Камнев А.Н. Структура и функции бурых водорослей // – М.: Изд-во Московского университета, 1989. – 200 с.

Камнев А.Н., Золотухина Е.Ю., Воскобойников Г.М., Бурдин К.С. Особенности возрастных морфофункциональных изменений филлоидов бурой водоросли *Sargassum pallidum* // Биология моря. – 1989. – № 2. – С. 48-55.

Кабиров Р.Р., Минибаев Р.Г. Влияние нефти на почвенные водоросли // Почвоведение. – 1982. – № 1. – С.86-91.

Кольский залив: освоение и рациональное природопользование / отв. ред. Г.Г. Матишов; Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН. – М.: Наука. 2009. – 381 с.

Кондратьева Л.М., Тен Хак Мун. Микробное население штормовых выбросов макрофитов // Морская микробиология / Ред. И.Е. Мишустина. – Владивосток: Изд-во Дальневосточного ун-та, 1995. – С. 88–96.

Кондрик Е.К., Огаркова О.А. Сезонная динамика фито- и бактериопланктона Белого моря. – М.: 1976. (Рукопись деп. в ВИНТИ. 01.11.76 № 3838-76 Деп.).

Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде (обзор). Прикладная биохимия и микробиол. – 1996, – № 6. – С. 579-585.

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, – 1994. – Т. 63, Вып. 5. – С. 917-923.

Коронелли Т.В., Ильинский В.В. Об учете численности углеводородокисляющих бактерий в морской воде методом предельных разведений // Вестн. МГУ, сер. 16, Биология. – 1984. – № 3. – С. 54-56.

Крисс, А.Е. Микробиологическая океанография. – М.: Наука, 1976. – 269 с.

Крисс, А.Е. Морская микробиология (глубоководная). – М.: Наука, 1959. – 455 с.

Кроткевич П.Г. Роль растений в охране водоемов // Новое в жизни, науке и технике. – М.: Знание, 1982, – № 3. – 64 с.

Лимберг Е.Л. Численность бактерий и бактериальные процессы в прибрежном районе Баренцева моря // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 1941. – Т. 7, № 2. – С. 221-239.

Линькова М.А. Влияние нефтяного загрязнения на фототрофные организмы в присутствии нефтеокисляющих бактерий. В сб.: Микробиологические методы борьбы с загрязнением окружающей среды. Тез. докл. 2-й Всес. конф. Пущино, 1979, с. 20-21.

Лурье Ю.Ю. Унифицированные методы анализа вод. 2-е изд. – М.: Химия, 1973. – 376 с.

Макаревич Е.В. Бактериобентос литорали среднего и южного колен Кольского залива: автореферат дис. ...кандидата биол. наук. – Мурманск: 2004. 25 с.

Максимова О.В. Некоторые сезонные особенности развития и определения возраста беломорских фукоидов // *Донная флора и продукция краевых морей СССР*. – М.: Наука, 1980. – С. 73-78.

Мамонтова Л. М., Дутова Н. В. Нефтеокисляющие бактерии р. Ангары. В кн.: *Биологические исследования водоемов в Восточной Сибири*. – Иркутск, 1977. – С.41-44.

Мишустина И.Е., Батурина М.В. Ультрамикрорганизмы и органическое вещество океана. – М.: Наука, 1984. – С. 110.

Мишустина И.Е., Мицкевич И.Н. Распространение гетеротрофных микроорганизмов в Гренландском море // *Изв. АН СССР, сер. биол.* – 1963. – № 6. – С. 914-921.

Мишустина, И.Е. Гетеротрофные микроорганизмы в биоценозах открытых районов океана, литорали и суши : автореферат дис. ... доктора биол. наук. – М.: МГУ, 1981.

Мишустина, И.Е. Сравнительная характеристика микрофлоры прибрежных почв, донных осадков литорали и воды Баренцева моря. Экологические исследования песчаной литорали. – Апатиты: изд-во Кольского филиала АН СССР, 1976. – С.80-94.

Морозов Н.В. Экологическая биотехнология: очистка природных и сточных вод макрофитами. – Казань. Изд-во КГПУ, 2001. – 396с.

Морозов, Н.В. Эколого-биотехнологические пути формирования и управления качеством поверхностных вод: автореферат дис. ... доктора биол. наук. – М.: МГУ, 2003. – 51 с.

Москвина М.И. Азотфиксация в Баренцевом море : автореферат дис. ...кандидата биол. наук. – М.: Институт микробиологии АН СССР, 1991. – 24 с.

Москвина М.И., Бирюзова В.П., Кострикина Н.А. Цианобактерии кластера *Synechococcus* на талломе бурой водоросли *Laminaria saccharina* в

Баренцевом море // Морская микробиология. Под ред. И.Е. Мишустинной. – Владивосток: Изд-во Дальневосточного ун-та, 1995. – С. 78–83.

Никитина Н.С. Сезонные изменения бактериального состава грунтов литорали Восточного Мурмана // Микробиология. – 1955. – Т. 24, Вып. 5. – С. 580-588. а.

Никитина Н.С. Влияние животного и растительного населения литорали на бактериальный состав грунтов // ДАН СССР. – 1955. – Т. 102, №5. – С. 1031-1034. б.

Овчинникова С.И., Широкая Т.А., Пашкина О.И. Основные тенденции изменения гидрохимических показателей водной экосистемы Кольского залива (2000-2011 годы) // Вестник МГТУ. – 2012. – Т. 15, №3. – С. 544-550

Палибин И.В. Исторический обзор исследований микроорганизмов Баренцева моря и прилегающих к нему морей. – СПб.: Изд. СПб. Ботан. сада, 1904. – Т. 4. – С. 71-79.

Патин С.А. Нефтяные разливы и их воздействие на морскую среду и биоресурсы. – М.: Изд-во ВНИРО, 2008. – 508 с.

Перетрухина А.Т. Микробиологический мониторинг водных экосистем Кольского Заполярья: автореферат дис. ...докт. биол. наук. – Мурманск, 2002. – 60 с.

Перетрухина И.В. Гетеротрофный бактериопланктон литорали Кольского залива и его роль в процессах естественного очищения вод от нефтяных углеводородов. Автореф. на соис. ... канд. биол. наук. – М., 2006. – 18 с.

Перетрухина И.В., Ильинский В.В., Литвинова М.Ю. Определение скоростей биodeградации нефтяных углеводородов в воде литорали Кольского залива, Труды Мурманского государственного технического университета "Вестник МГТУ" - Мурманск: МГТУ, 2006. – Т. 9, № 5. – С. 830-835.

Петров Ю.Е. Обзорный ключ порядков *Laminariales* и *Fucales* морей СССР // Новости систем. низш. раст. – 1974. – Т. 11. – С. 152-169.

Пилипас Н.Г. Гетеротрофные микроорганизмы Белого и Баренцева морей и их биохимическая активность // Вопросы загрязнения и самоочищения Белого и Баренцева морей. Апатиты: Изд-во КФ АН СССР. – 1977. – С. 29-39.

Практикум по микробиологии/под ред. Егорова Н.С. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 307с.

Разумов А.С. Микробиальный планктон воды // Тр. Всесоюз. гидробиол. об-ва АН СССР. – 1962. т. 12. С. 60-199.

Разумов, А.С. Прямой метод учета бактерий в воде. Сравнение его с методом Коха // Микробиология. – 1932. – Т. 1. – С. 131-146.

Раилкин А.И. Самосборка сообществ морского микрообрастания // Докл. АН (Россия). – 1994. – Т. 337, № 1. – С. 140-143.

Раилкин А.И. Колонизация твердых тел бентосными организмами. – СПб.: Изд-во С.-Пб. Ун-та, 2008. – 427 с.

Родина А.Г. Методы водной микробиологии. – М.: Наука, 1965. – 300 с.

Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов (лабораторное руководство). – Л.: Наука, 1974. – 265 с.

Россова, Э.Я. Некоторые данные о численности, продукции бактериопланктона в юго-западной части Баренцева // Океанология. – 1977. – Т. 17, № 5. – С. 878-882.

Руководство по методам биологического анализа морской воды и донных отложений / Под ред. Цыбань А.В. – Л.: Гидрометеиздат, 1980. – 191с.

Рыжик И.В. Морфо-функциональные особенности промысловых водорослей из разных биотопов Баренцева моря: Автореферат дис. ...канд. биол. наук. – Мурманск, 2005. – 24с.

Рыжик И.В. Оценка метаболической активности клеток фукусовых водорослей тетразолиевым методом // Альгология. – 2013. – Т. 23, № 1. – С. 10-18.

Садчиков А.П. Продуцирование и трансформация органического вещества размерными группами фито- и бактериопланктона (на приморье водоемов Подмосковья). Автореферат. дисс. ... докт. биол.наук. – М.: МГУ, 1997. – 53 с.

Садчиков А.П., Кудряшов М.А. Гидробиотика: прибрежно-водная растительность. – М.: Академия, 2005. – 240 с.

Семенова Е.В., Шлыкова Д.С, Семенов А.М., Иванов М.Н, Шеляков О.В., Нетрусов А.И. Бактерии-эпифиты бурых водорослей в утилизации нефти в экосистемах северных морей // Вестн. Моск. Ун-таСер. – 2009. – Т. 16. №3. – С.18-22.

Семенов А.М., Федоренко В.Н., Семенова Е.В. Микроорганизмы на поверхности морских макрофитов в северных морях России и их возможное практическое использование // Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера». – 2014. – Т. 6, № 1. – С. 60-76.

Степаньян О.В., Воскобойников Г.М. Влияние нефти и нефтепродуктов на морфофункциональные особенности морских макроводорослей // Биология моря. – 2006. – Т. 32, № 4. – С. 241-248.

Таусон В. О. Основные положения растительной биоэнергетики. – М. : 1950. 550 с.

Теплинская, Н.Г. Процессы бактериальной продукции и деструкции органического вещества в северных морях. Апатиты: Изд-во КФ АН СССР, 1990. – 106 с.

Трунова, О.Н. Биологические факторы самоочищения водоемов и сточных. – Л.: Наука, 1979. – 110 с.

Трунова, О.Н. Ферментативная активность микробов-антагонистов, выделенных из Белого и Баренцева морей // Биология северных морей европейской части СССР. – Апатиты: Изд-во КФ АН СССР, 1977. – С. 91-97.

Тумайкина Ю.А., Туровская О.В., Игнатов В.В. Деструкция углеводов и их производных растительно-микробной ассоциацией на основе Элодеи канадской // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44, № 4. – С. 422-429.

Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. – М.: Мир. 1975. – 324 с.

Хайлов К. М. Экологический метаболизм в море. – Киев: Наука думка, 1971. – 252 с.

Широколобов В.Н. Мониторинг губ Ярнышной и Дальнезеленецкой в 2002-2004 гг.

Широколобова Т.И. Бактериальные сообщества эстуарных зон и прибрежных экосистем Баренцева моря: Автореферат дисс. ...канд. биол. Наук. – Мурманск: ММБИ, 2009. – 28 с.

Шлегель Г. Микробиология. – М.: Мир, 1972. – 476 с.

Шлегель Г. Общая микробиология.: Пер с нем. – М.: Мир, 1987. – 567 с.

Штукова З.А. Бактериопланктон Куршского залива и прибрежной зоны юго-восточной части Балтийского моря: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Вильнюс, 1996. – 40 с.

Abell G.C.J., Bowman J.P. Colonization and community dynamics of class Flavobacteria on diatom detritus in experimental mesocosms based on Southern Ocean seawater // FEMS Microbiol. Ecol. 2005. – V. 53, №3. – P. 379-391.

Albertsen, M., Hugenholtz, P., Skarshewski, A., Nielsen, K.L., Tyson, G.W., and Nielsen, P.H. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes // Nat. Biotechnol. 2013. – V. 31, – P. 533-538.

Anagnostidis K., Komárek J. Modern approach to the classification system of cyanophytes 3. Oscillatoriales // *Algolog. Stud.* 1988. – № 50 – 53. – P. 327 – 472.

Angel R., Conrad R. Elucidating the microbial resuscitation cascade in biological soil crusts following a simulated rain event // *Environmental Microbiology*, 2013. – Vol. 15 (10). – P. 2799–2815.

Atlas R.M. Microorganisms and petroleum pollutants // *BioScience*. 1978. – V. 28. – P. 387-390.

Atlas R.M., Bartha R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation (ed. By K.C. Marshall) // *Adv. Microb. Ecol.* 1992, – Vol. 12. – P. 287-338.

Atlas R.M., Bartha R. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications, 4th edn. – Addison Wesley Longman. The Benjamin / Cumming Publishing Company, Inc., 1997. – 694p.

Beleneva, I.A., Zhukova N.V. Experimental Articles. Bacterial communities of some brown and red algae from Peter the Great Bay, the Sea of Japan // *Mikrobiologiya*, 2006. – Vol. 75, No. 3. – P. 410-419.

Bengtsson M.M., Sjotun K. & Ovreas L. Seasonal dynamics of bacterial biofilms on the kelp *Laminaria hyperborea*. *Aquatic Microbial Ecology*. 2010. – V. **60.** – P. 71-83.

Bernardet, J.-F., Nakagawa Y. An introduction to the family Flavobacteriaceae // *The Prokaryotes* edited by M. Dworkin et al. – New York: Springer-Verlag, 2006. – Vol. 7, – P. 455-480.

Boehm P.D., Quinn J.G. Solubilization of hydrocarbons by the dissolved organic matter in sea water // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1973. – Vol. 37. – P. 2459.

Bolinches J., Manuel L. Lemos Population Dynamics of Heterotrophic Bacterial Communities Associated with *Fucus vesiculosus* and *Ulva rigida* in an Estuary // *Microbial Ecology*. 1988. – Vol. 15. – P. 345-357.

Burke C., Thomas T., Lewis M. et al. Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis* // The ISME J. 2011. – Vol. 5, № 4. – P. 590–600.

Chan E.C.S., McManus E.A. Distribution, characterization and nutrition of marine microorganisms from the algae *Ascophyllum nodosum* and *Polifonia lanosa*// Can. J. Microbiol. 1969. – Vol. 15. – P. 409-420.

Characklis W. Biofilm development: a process analysis // Microbial adhesion and aggregation. Dahlem Konferenzen. – Berlin et al.: Springer-Verlag. 1984. – P. 137-157.

Chen Y., Li C., Zhou Z., Wen J., You X., Mao Y., Lu C., Huo G., [Jia X.](#) Enhanced Biodegradation of Alkane Hydrocarbons and Crude Oil by Mixed Strains and Bacterial Community Analysis // Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, – Vol. 172, Is. 7, P. 3433-3447.

Colwell R.R. Enumeration of specific populations by the most-probable-number (MPN) method // In Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology edited by Costerton J.W., Colwell R.R. – Philadelphia, ASTM-STP, American Society for Testing and Materials. 1978. – 695p.

Dahlback B., Hermansson L.A.H., Kjelleberg S. Microbial investigations of surface microlayers, water column, ice and sediments in the Arctic ocean // J. Marine Ecology, Progress series, 1982. – Vol. 9. – P. 73-124.

Davis J.M., Baird I.E., Massie L.C., Hay S.J., Ward A.P. Some effects of oil-derived hydrocarbons on a pelagic food web from observations in an enclosed ecosystem and a consideration of their implications for monitoring // Rapp. et proc.-verb. réun. Cons. int. explor. mer., 1980. – Vol. 179. – P. 201-211.

Fries L. Some observations on the morphology of *Enteromorpha linza* (L.) J. Ag. and *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. in axenic culture // Bot. Mar. 1975. – Vol. 18. – P. 251–253.

Fuhs G.W. Der microbielle Abbau von Kohlenwasserstoffe // Arch. Microbiol. 1961. – Vol. 39. – P. 674.

Goecke F., Labes A., Wiese J., Imhoff J.F. Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria // Mar.Ecol. Prog. Ser. 2010. – Vol. 409. – P. 267–299.

Goecke F., Labes A., Wiese J., Imhoff J.F. Phylogenetic analysis and antibiotic activity of bacteria isolated from the surface of two cooccurring macroalgae from the Baltic Sea // Eur. J. Phycol. 2013, – Vol. 48, №1. – P. 47–60.

Haglund A.L. Attached Bacterial Communities in Lakes – Habital Specific Differences: PhD. – Acta Universitatis Upsaliensis. 2004. – 35 p.

Haines J.R., Alexander M. Microbial degradation of high-molecular weight alkanes // Appl. Microbiol. 1974. – Vol. 28. – P. 413-422.

Heitkamp M.A., Cerniglia C.E. Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems // Environ. Toxicol. And Chem. 1987. – Vol. 6, №7. – P. 535-546.

Hofmann K. Microbielle Transformation von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen // Wiss. Z. E. M. Arndt Univ. Greifswald. 1986. – Vol. 35, № 4. – P. 23-26.

Hollants J, Leliaert F, De Clerck O, Willems A. What to learn from sushi: a review on seaweed-bacterial associations // FEMS Microbiol Ecol. 2013. – Vol. 83. –P. 1–16.

Hanson K.G., Anuranjini Nigam, Madhavi Kapadia, Anjana J. Desai News & Notes: Bioremediation of Crude Oil Contamination with *Acinetobacter* sp. A3 // Current microbiology. 1997. – Vol. 35, Is. 3, – P. 191-193.

Iman S.H., Bard R.F., Tosteson T.R. Specificity of marine microbial surface interactions // Appl Environ Microbiol. 1984. – Vol. 48. – P. 833-839.

Jensen P.R., Kauffman C.A., Fenical W. High recovery culturable bacteria from algae // Marine Biology. 1996. – Vol. 126, № 1. – P. 1-7.

Komárek J., Anagnostidis K. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2: Chroococcales – Archiv für Hydrobiologie // Algological Studies. 1986. – Vol. 43. – P. 157–226.

Komárek J., Anagnostidis K. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales // Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1. Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 1998. – 548 p.

Komárek J., Anagnostidis K. Cyanoprokaryota 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales // Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2. Elsevier/Spektrum, Heidelberg. 2005. – 759 p.

Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. Preslia. 2014. – Vol. 86. – P. 295–335.

Lalke-Porczyk E., Donderski W. Distribution of Epiphytic Bacteria on the Surface of Selected Species of Helophytes and Nimpheides from the Littoral Zone of the Southern Part of Jeziorak Lake in Poland // Polish Journal of Environmental Studies, 2003. – Vol. 12, № 1. – P. 83-93.

Lachnit T., Blumel M., Imhoff J.F., Wahl M. Specific epibacterial communities on macroalgae: phylogeny matters more than habitat // Aquat. Biol. 2009. – Vol. 5. – P. 181–186.

Lachnit T., Fischer M., Kunzel S., Baines J.F., Harder T. Compounds associated with algal surfaces mediate epiphytic colonization of the marine macroalga *Fucus vesiculosus* // FEMS Microbiol. Ecol. 2013. – Vol. 84. – P. 411–420.

Marshall K.C., Stout R., Mitchell R. Selective sorption of bacteria from seawater // Can. J. Microbiol. 1971. – Vol. 17, № 11. – P. 1413-1416.

Marshall K., Joint I., Callow M.E., Callow J.A. Effect of marine bacterial isolates on the growth and morphology of axenic plantlets of the green alga *Ulva linza* // Microbial. Ecology. 2006. – Vol. 52. – P. 302-310.

Malinowski E. Anatomia roślin // PWN. – Warszawa, 1983. – s. 634.

Margulies M.L., Egholm M., Altman W. E., Attiya S. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors // *Nature*. 2005. – Vol. 437. – P. 376 – 380.

Meyer-Reil L.-A. Bacterial growth rates and biomass production // *Microbial Ecology of a brackish Water Environment*. Rheinheimer G ed. Springer-Verlag. – Berlin. 1977. – P. 223-235.

Mikulski J.S. *Biologia wód śródlądowych* // PWN. – Warszawa, 1982. – 491 p.

Mills A.I., Breul C., Colwell R.R. Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probably number method // *Can. J. Microbiol.* 1978. – Vol. 24. – P. 552.

Nakanishi K., Nishijima M., Nishimura M., Kuwano K., Saga N. Bacteria that induce morphogenesis in *Ulva pertusa* (Chlorophyta) grown under axenic conditions // *Journal of Phycology*. 1996. – Vol. 32. – P. 479-482.

Niewolak S. Distribution of microorganisms in the waters of the Kortowskie Lake // *Pol. Arch. Hydrobiol.* 1974. – Vol. 21, P. 315.

Oberbeckman S., Gerdts G., Wichels A., Laatsch H., Schumann G. Diversity of epiphytic marine bacteria associated with fronds of the brown algae *Laminaria*, Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology, 1-4 April, Osnabrück, 2007 Germany.

Olah J. Number, biomass and production of planctonic bacteria in the shallow Lake Balaton // *Arch. Hydrobiol.* 1974. Vol. 2. – P. 193.

Pirnik M.P. Microbial oxidation of methyl branched alkanes // *Crit. Rev. Microbiol.* 1977. – Vol. 5, № 4. - P. 413-422.

Poirier O.A., Thiel G.A. Deposition of free oil by sediment settling in sea water // *Bull. Amer. Assoc. Pet. Geol.* 1941. – Vol. 25. – P. 2170.

Provasoli L., Pintner I.J. Bacteria induced polymorphism in an axenic laboratory 591 strain of *Ulva lactuca*(Chlorophyceae) // *J. Phycol.* 1980. – Vol. 16. – P. 196-200.

Railkin A. I. The pattern of recovery of distributed microbial communities inhabiting hard substrates // *Hydrobiologia*. 1998. – Vol. 385. – P. 47-57.

Raghukumar C., Vipparthy V., David J.D. Chandramohan. Degradation of crude oil by marine cyanobacteria // *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001. – Vol. 57, Is. 3. – P. 433-436.

Ramasamy S., Mathiyalagan P., Chandran P. Characterization and optimization of EPS-producing and diesel oil-degrading *Ochrobactrum anthropi* MP3 isolated from refinery wastewater // *Petroleum Science*. 2014. – Vol. 11, Is. 3. – P. 439-445.

Ramanan R., B.H. Kim, D.H. Cho, H.M. Oh. H.S. Kim Algae –bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications // *Biotechnology Advances*. 2016. – Vol. 34, Is. 1. – P. 14–29

Ramsay A.J., Fry J.C. Response of epiphytic bacteria to the treatment of two aquatic macrophytes with the herbicide paraquat // *Water Res.*, 1976. – Vol. 10. – P. 453.

Rheinheimer G. Aquatic microbiology, 4th edition. John Wiley & Sons Ltd, UK., 1992. – 363 p.

Shiba T., Taga N. Heterotrophic bacteria attached to seaweeds // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1980. – Vol. 47. – P. 251-258.

Sieburth J. Mc. The influence of algae antibiosis on the ecology of marine microorganisms // In *Advances in Microbiology of the Sea* edited by Droop, M.R., Ferguson Wood E.J. – London, New York: Academic Press. 1968, – P. 63-94.

Singh R. P., Reddy C.R.K. Seaweed–microbial interactions: key functions of seaweed-associated bacteria // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2014. – Vol. 88. – P. 213–230.

Staufenberger T, Thiel V, Wiese J, Imhoff J.F. Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina*. *FEMS Microbiology Ecology*. 2008. – Vol. 64. – P. 65-77.

Tatewaki M., Provasoli L., Pintner I.J. Morphogenesis of *Monostroma oxyspermum* (Kütz.) Doty (Chlorophyceae) in axenic culture, especially in bialgal culture. *Journal of Phycology*. 1983. – Vol. 19. – P. 409-416.

Tornblom E., Sondergaard M. Seasonal dynamics of bacterial biomass and production on eegress *Zostera marina* leaves // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1999. – Vol. 179. – P.231-240.

Tujula N.A. Analysis of the epiphytic bacterial community associated with the green alga *Ulva australis*: – PhD, University of New South Wales, 2006. P.178.

Tujula N.A., Crocetti G.R., Burke C., Thomas T., Holmstrom C. & Kjelleberg S. Variability and abundance of the epiphytic bacterial community associated with a green marine Ulvacean alga // *ISME Journal*. 2010. – Vol. 4. – P. 301-311.

Vairappan C. S., Suzuki M., Motomura T., Ichimura T. Pathogenic bacteria associated with lesions and thallus bleaching symptoms in the Japanese kelp *Laminaria religiosa* Miyabe (Laminariales, Phaeophyceae) // *Hydrobiologia*, 2001. –Vol. 445. – P. 183–191.

Vairappan C.S., Chung C., Hurtado A., Soya F., Lhonneur G., Critchley A. Distribution and symptoms of epiphyte infection in major carrageenophyte-producing farms // *Journal of Applied Phycology*. 2008. Vol. **20**. – P. 477-483.

Wahl M. Marine epibiosis. Fouling and antifouling: some basic aspects // *Marine Ecol. Prog. Ser.* 1989. – Vol. 58, № 1–2. – P. 175-189.

Wahl M. Living attached: Aufwuchs, fouling, epibiosis // In *Fouling organisms in the Indian Ocean: Biology and Control Technology* edited by Nagabhushanam R., Thompson M.F. – New Delhi: Oxford and IBH Publ. Co. 1997. – P. 31-83.

Wang G., Shuai L., Li Y., Lin W., Zhao X., Duan D. Phylogenetic analysis of epiphytic marine bacteria on Hole-Rotten diseased sporophytes of *Laminaria japonica* // *J.Appl.Phycol.* 2008. – V. 20. – P.403-409.

Wiese J., Stanfenberger T., Thiel V., Nagel K., Imhoff J.F. Diversity of Antibiotic-Active Bacteria Associated with the Brown Alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea // *Mar. Biotechnol.*, 2009. Vol. 11. – P.287-300.

William S., Helene Feil, Copeland A. Bacterial genomic DNA isolation, using CTAB // Standart operation procedure/protocol, Doe joint genome institute, 2012.

Winsley T.J., Snape I., McKinlay J., Stark J., van Dorst J.M., Ji M., Ferrari B.C., Siciliano S.D. The ecological controls on the prevalence of candidate division TM7 in polar regions // *Front. Microbiol.* 2014. – Vol. 5. – 345 p.

Wrabel M.L., Peckol Paulette Effects of bioremediation on toxicity and chemical composition of No. 2 Fuel Oil: Growth responses of the brown alga *Fucus vesiculosus* // *Mar. Pollut. Bull.* 2000. –Vol. 40, № 2. – P. 135-139.

Zifeng W., Tian X., Shaojun P., Min L., Haidong Y. Isolation and identification of bacteria associated with the surfaces of several algal species // *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009. Vol. 27 No. 3, P. 487-492.

ZoBell C.E. Marine microbiology // Waltham (Mass.). Chron. Bot. Press. 1946. – 240 p.

Приложение 1.

Процентное соотношение родов эпифитных бактерий водорослей *F. vesiculosus* из акватории губы Зеленецкой.

Род	Общее число обнаруженных нуклеотидных последовательностей	Доля от общего числа последователь- ностей, в %
<i>Arenicella</i>	223	14,16
<i>Ulvibacter</i>	180	11,43
<i>Maribacter</i>	166	10,54
<i>Cytophaga</i>	161	10,22
<i>Hellea</i>	159	10,10
<i>Granulosicoccus</i>	143	9,08
<i>Octadecabacter</i>	117	7,43
<i>Psychrobacter</i>	82	5,21
<i>Ilumatobacter</i>	65	4,13
<i>Roseibacillus</i>	59	3,75
<i>Lewinella</i>	42	2,67
<i>Blastopirellula</i>	32	2,03
<i>Persicivirga</i>	23	1,46
<i>Acinetobacter</i>	21	1,33
<i>Zobellia</i>	20	1,27
<i>Sulfitobacter</i>	8	0,51
<i>Winogradskyella</i>	6	0,38
<i>Haliscomenobacter</i>	5	0,32
<i>Leeuwenhoekiiella</i>	4	0,25
<i>Loktanella</i>	4	0,25
<i>Marichromatium</i>	4	0,25
<i>Robiginitomaculum</i>	4	0,25
<i>Aquimarina</i>	3	0,19

<i>Erythrobacter</i>	2	0,13
<i>Haloferula</i>	2	0,13
<i>Mesorhizobium</i>	2	0,13
<i>Rubritalea</i>	2	0,13
<i>Flaviramulus</i>	1	0,06
unclassified Saprospiraceae	13	0,83
unclassified Flavobacteriaceae	5	0,32
unclassified Acidimicrobineae	4	0,25
unclassified Rhodobacteraceae	4	0,25
unclassified Verrucomicrobiaceae	4	0,25
unclassified Bdellovibrionaceae	2	0,13
unclassified Chitinophagaceae	2	0,13
unclassified Sphingobacteriales	1	0,06
Bcero	1575	14,16

Приложение 2.

Процентное соотношение родов эпифитных бактерий водорослей *F. vesiculosus* из акватории Мурманского порта (Мурманский морской вокзал).

Род	Общее число обнаруженных нуклеотидных последовательностей	Доля от общего числа последователь- ностей, в %
<i>Acinetobacter</i>	1285	32,04
<i>Phormidium</i>	214	5,34
<i>Rhodopirellula</i>	185	4,61
<i>Granulosicoccus</i>	180	4,49
<i>Haliscomenobacter</i>	163	4,06
<i>Ilumatobacter</i>	142	3,54
<i>Maribacter</i>	126	3,14
<i>Loktanella</i>	117	2,92
<i>Blastopirellula</i>	116	2,89
<i>Sulfitobacter</i>	116	2,89
<i>Haloferula</i>	113	2,82
<i>Erythrobacter</i>	103	2,57
<i>Alkanindiges</i>	102	2,54
<i>Psychrobacter</i>	83	2,07
<i>Novosphingobium</i>	79	1,97
<i>Novosphingobium</i>	63	1,57
<i>Aeromonas</i>	62	1,55
<i>GpIV</i>	54	1,35
<i>Roseobacter</i>	43	1,07
<i>Roseibacillus</i>	37	0,92
<i>Exiguobacterium</i>	33	0,82
<i>Sphingopyxis</i>	33	0,82
<i>Jannaschia</i>	32	0,80

<i>Ahrensia</i>	26	0,65
<i>Aquimonas</i>	26	0,65
<i>Pseudomonas</i>	26	0,65
<i>Owenweeksia</i>	25	0,62
<i>Candidatus Chloracidobacterium</i>	24	0,60
<i>Mesorhizobium</i>	24	0,60
<i>Rubritalea</i>	21	0,52
<i>Atopococcus</i>	18	0,45
<i>Lewinella</i>	17	0,42
<i>Lacinutrix</i>	16	0,40
<i>Flaviramulus</i>	15	0,37
<i>Acidovorax</i>	14	0,35
<i>Moraxella</i>	13	0,32
<i>Sediminibacter</i>	13	0,32
<i>Shewanella</i>	13	0,32
<i>Planctomyces</i>	12	0,30
<i>Empedobacter</i>	11	0,27
<i>Stenothermobacter</i>	11	0,27
<i>Chryseobacterium</i>	10	0,25
<i>Arenicella</i>	9	0,22
<i>Tropicimonas</i>	9	0,22
<i>Marinicella</i>	8	0,20
<i>Altererythrobacter</i>	7	0,17
<i>Aquimarina</i>	7	0,17
<i>Hyphomonas</i>	7	0,17
<i>Ulvibacter</i>	7	0,17
<i>Enhydrobacter</i>	6	0,15
<i>Hellea</i>	6	0,15
<i>Luteolibacter</i>	6	0,15
<i>Persicivirga</i>	6	0,15

<i>GpVIII, Pleurocapsa</i>	5	0,12
<i>Cloacibacterium</i>	4	0,10
<i>Leucothrix</i>	4	0,10
<i>Hydrogenophaga</i>	3	0,07
<i>Octadecabacter</i>	3	0,07
<i>Streptococcus</i>	3	0,07
<i>Vampirovibrio</i>	3	0,07
<i>Phycisphaera</i>	2	0,05
<i>Streptobacillus</i>	1	0,02
<i>TM7</i>	1	0,02
unclassified Rhodobacteraceae	29	0,72
unclassified Phyllobacteriaceae	9	0,22
unclassified Acidimicrobineae	7	0,17
unclassified Bacteria	7	0,17
unclassified Rhodothermaceae	6	0,15
unclassified Verrucomicrobiaceae	6	0,15
unclassified Gammaproteobacteria	4	0,10
unclassified Oceanospirillales	4	0,10
unclassified Saprospiraceae	4	0,10
unclassified Flavobacteriaceae	3	0,07
unclassified Deltaproteobacteria	3	0,07
unclassified Planctomycetaceae	2	0,05
unclassified Alphaproteobacteria	1	0,02
unclassified Planctomycetia	1	0,02
unclassified Sphingobacteriales	1	0,02
Bcero	4010	

Приложение 3.

Процентное соотношение родов эпифитных бактерий водорослей *F. vesiculosus* из акватории вблизи поселка Абрам-мыс.

Род	Общее число обнаруженных нуклеотидных последовательностей	Доля от общего числа последовательностей, в %
<i>Blastopirellula</i>	694	13,18
<i>Haliscomenobacter</i>	484	9,19
<i>Sulfitobacter</i>	470	8,93
<i>Granulosicoccus</i>	458	8,70
<i>Ahrensia</i>	254	4,83
<i>Acinetobacter</i>	251	4,77
<i>Sphingopyxis</i>	245	4,65
<i>Altererythrobacter</i>	235	4,46
<i>Novosphingobium</i>	212	4,03
<i>Aeromonas</i>	196	3,72
<i>Ilumatobacter</i>	177	3,36
<i>Maribacter</i>	168	3,19
<i>Roseibacillus</i>	122	2,32
<i>Erythrobacter</i>	109	2,07
<i>Arenicella</i>	89	1,69
<i>Jannaschia</i>	72	1,37
<i>Mesorhizobium</i>	59	1,12
TM7	55	1,04
<i>Lewinella</i>	54	1,03
<i>Candidatus Chloracidobacterium</i>	50	0,95
<i>Loktanella</i>	49	0,93
<i>Rhodopirellula</i>	48	0,91
<i>Owenweeksia</i>	47	0,89

<i>Enhydrobacter</i>	32	0,61
<i>Phormidium</i>	32	0,61
<i>Hyphomonas</i>	23	0,44
<i>Haloferula</i>	21	0,40
<i>Psychromonas</i>	21	0,40
<i>Fluviicola</i>	17	0,32
<i>Hellea</i>	16	0,30
<i>Winogradskyella</i>	13	0,25
<i>Coxiella</i>	11	0,21
<i>Marinicella</i>	11	0,21
<i>Shewanella</i>	11	0,21
<i>Planctomyces</i>	9	0,17
<i>Croceibacter</i>	8	0,15
<i>Endozoicomonas</i>	8	0,15
<i>Hydrogenophaga</i>	8	0,15
<i>Zobellia</i>	8	0,15
<i>Phycisphaera</i>	7	0,13
<i>Sediminibacter</i>	7	0,13
<i>Ulvibacter</i>	7	0,13
<i>Candidatus Endobugula</i>	6	0,11
<i>Marichromatium</i>	6	0,11
<i>Stenothermobacter</i>	6	0,11
<i>Oceanicola</i>	5	0,09
<i>Octadecabacter</i>	5	0,09
<i>Alishewanella</i>	4	0,08
<i>Flavobacterium</i>	4	0,08
<i>Glaciacola</i>	4	0,08
<i>Luteolibacter</i>	4	0,08
<i>Melitea</i>	4	0,08
<i>Oleispira</i>	4	0,08

<i>Palleronia</i>	4	0,08
<i>Streptobacillus</i>	4	0,08
<i>Vamprovibrio</i>	4	0,08
<i>Alkanindiges</i>	3	0,06
<i>Atopococcus</i>	3	0,06
<i>Flaviramulus</i>	3	0,06
<i>Aquimarina</i>	2	0,04
<i>Tropicimonas</i>	2	0,04
<i>Acidovorax</i>	1	0,02
<i>GpIV</i>	1	0,02
<i>Lacinutrix</i>	1	0,02
<i>Streptococcus</i>	1	0,02
unclassified Saprospiraceae	95	1,80
unclassified Bacteria	43	0,82
unclassified Rhodobacteraceae	41	0,78
unclassified Chitinophagaceae	23	0,44
unclassified Bdellovibrionaceae	21	0,40
unclassified Rhodothermaceae	16	0,30
unclassified Alphaproteobacteria	13	0,25
unclassified Verrucomicrobiaceae	13	0,25
unclassified Hyphomonadaceae	10	0,19
unclassified Deltaproteobacteria	9	0,17
unclassified Planctomycetaceae	6	0,11
unclassified Planctomycetia	6	0,11
unclassified Sorangiineae	6	0,11
unclassified Gammaproteobacteria	5	0,09
unclassified Cryomorphaceae	4	0,08
unclassified Sphingobacteriales	3	0,06
unclassified Flavobacteriaceae	1	0,02
Bcero	5264	