



Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии

Влияние углеводородного загрязнения на микобиоту грунтов литорали Белого и Баренцева морей

Выполнил: Фадеев А.Ю.
Научные руководители:
к.б.н. н.с. Бубнова Е.Н.
к.б.н. с.н.с. Георгиева М.Л.

- Темпы освоения Арктики увеличиваются с каждым годом и, как следствие, растет уровень загрязнения
- Данные по влиянию углеводородного загрязнения на микобиоту морей практически отсутствуют
- Способность грибов к разложению углеводородов была показана уже давно, однако это явление крайне мало изучено в морских арктических условиях



Цель работы: оценка влияния углеводородного загрязнения на состав и структуру микобиоты литорали Белого и Баренцева морей

Задачи работы

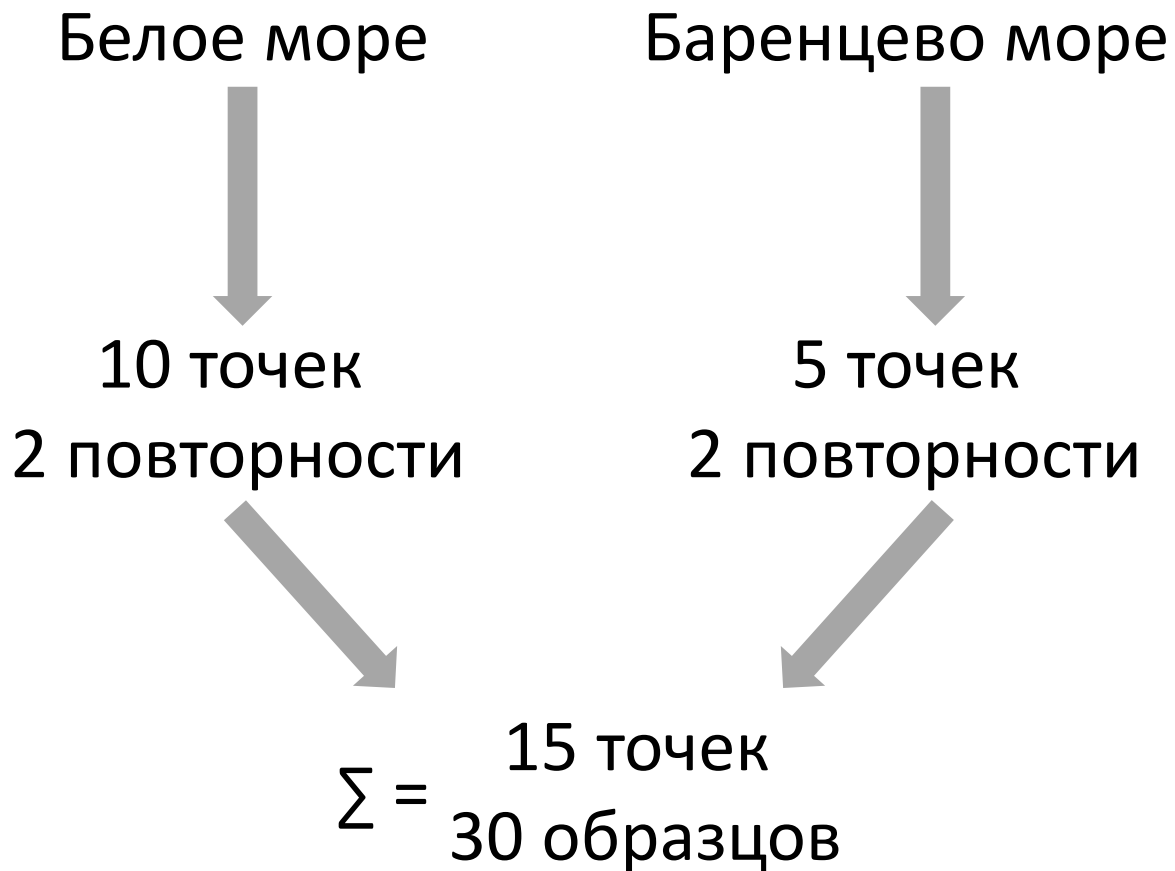
1. Выделить грибы из образцов грунта различных по степени загрязненности углеводородами локаций на стандартные и углеводородсодержащие агаризованные среды
2. Идентифицировать грибы, выделенные на разные типы сред
3. Провести сравнительную характеристику комплексов грибов, выделенных на разные среды из локаций в разной степени загрязнённых углеводородами
4. Оценить углеводородокисляющую способность некоторых изолятов грибов, способных к росту на среде с углеводородами в качестве единственного источника питания

Отбор образцов

- Образцы грунта отбирали в августе 2020
- Места отбора: литорали Белого и Баренцева морей



Кольский залив, Мурманск
(Бубнова Е.Н.)



Районы исследования



Расположение районов отбора образцов:

- 1 – Мурманск (2 точки);
- 2 – Териберка (3 точки);
- 3 – окрестности Канда拉克ши (6 точек);
- 4 – окрестности ББС МГУ (4 точки).



WS-01



BS-04



WS-04



BS-02

Локация	Точка	АУВ, мкг / г	ПАУ, нг / г	Доля УВ от Сорг, %
МУРМАНСК	BS-01	53.87	121500	3.56
	BS-02	73.09	141200	3.45
ТЕРИБЕРКА	BS-03	50.48	3750	2.89
	BS-04	15.89	310	1.82
	BS-05	13.37	480	2.53
КАНДАЛАКША И ОКРЕСТНОСТИ	WS-01	16.62	820	0.87
	WS-02	23.80	0	0.61
	WS-03	27.06	150	2.91
	WS-04	16.72	260	1.38
	WS-05	17.74	110	4.49
	WS-06	27.27	4680	5.86
ББС	WS-07	11.95	360	0.89
	WS-08	30.60	0	0.99
	WS-09	16.75	170	0.57
	WS-10	15.66	0	0.86

Содержание углеводородов в исследованных грунтах

АУВ – алифатические углеводороды;

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды.

Последняя колонка – доля нефтяных углеводородов в общем органическом углероде.

Фоновые значения АУВ – 10 мкг/г;
Доли УВ от Сорг – <1%

Посев

30 образцов

метод почвенных комочков

($m = 0.1\text{г}$)

Сусло-агар (СА) на морской воде
Соленость – 20 ‰

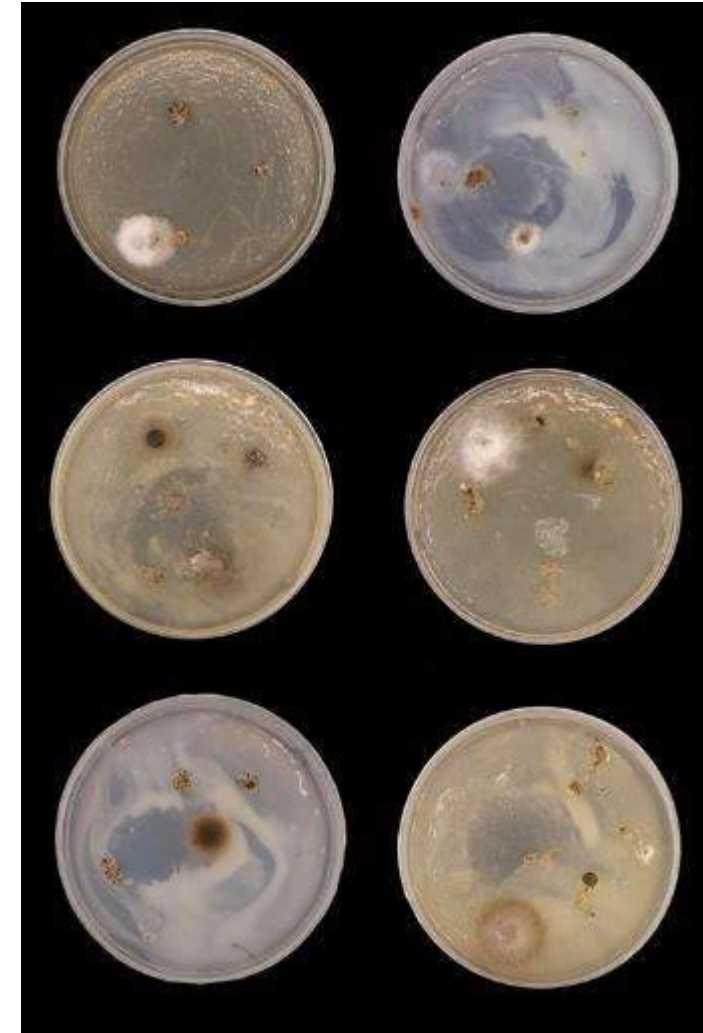
- 5 повторностей ($\Sigma = 150$ чашек)
- $t_{\text{и}} = 1$ месяц
- $t^{\circ} = 8^{\circ}\text{C}$
- Выделение чистых культур

Дизель-агар (ДА) на морской воде
Соленость – 20 ‰

- 3 повторности ($\Sigma = 90$ чашек)
- $t_{\text{и}} = 1$ месяц
- $t^{\circ} = 8^{\circ}\text{C}$ (30 чашек) и 25°C (60)
- Выделение чистых культур

Оценка видового разнообразия

- Идентификация проводилась с использованием морфолого-культуральных методов
- К ряду изолятов применялись молекулярные методы идентификации по региону ITS
- Для оценки численности рассчитывали число КОЕ, относительно обилие
- Для статистической обработки применяли nMDS, ANOSIM, SIMPER, рассчитывали индексы Съеренсена и Шенона



Посевы на среде ДА

Оценка углеводородокисляющей способности

Инкубация чистых культур на орбитальном шейкере при 8°C в течение 5 недель в жидкой среде с добавлением дизельного топлива

Оценка убыли остаточных УВ методом гравиметрии

Отобранные изоляты:

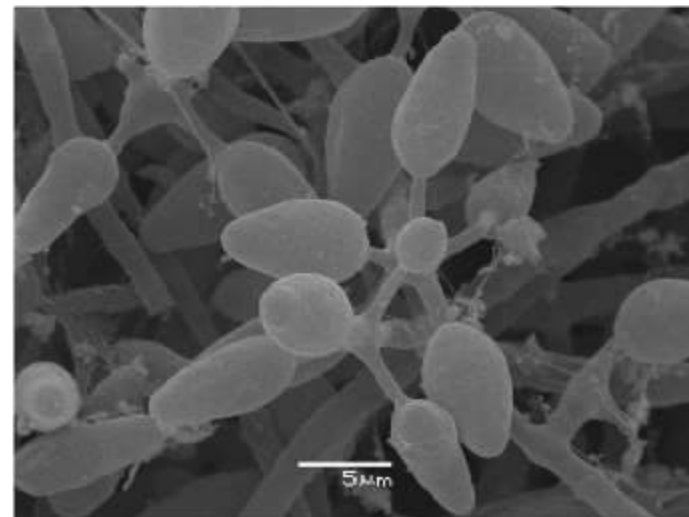
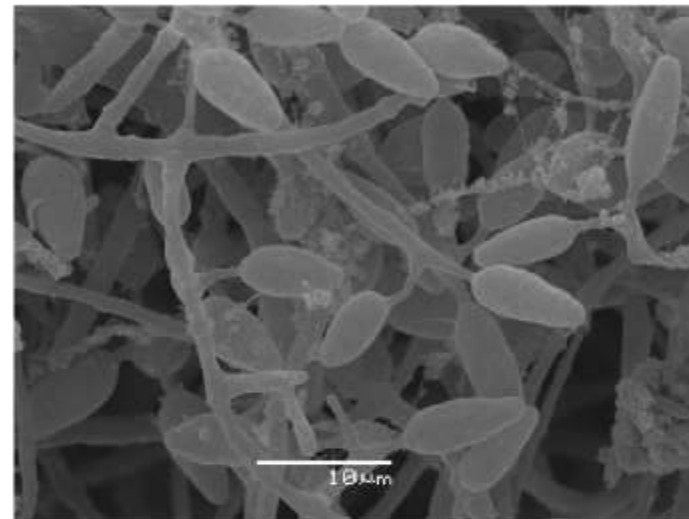
- *Acremonium fuci*
- *Acrostalagmus luteoalbus*
- *Asteromyces cruciatus*
- *Cadophora fastigiata*
- *C. malorum*
- *Paradendryphiella arenariae*
- *Penicillium brevicompactum*
- *P. chrysogenum*
- *P. glabrum*
- *Tolypocladium inflatum*
- *T. tundrense*

Согласно стандартам Российской Федерации, дизельное топливо зимнее, использованное в данной работе, представляет собой депарафинированное (то есть с уменьшенным содержанием алканов длиной $C > 18$) топливо, в котором ароматические УВ составляют не более 11% (ГОСТ Р 55475-2013).

Новые находки

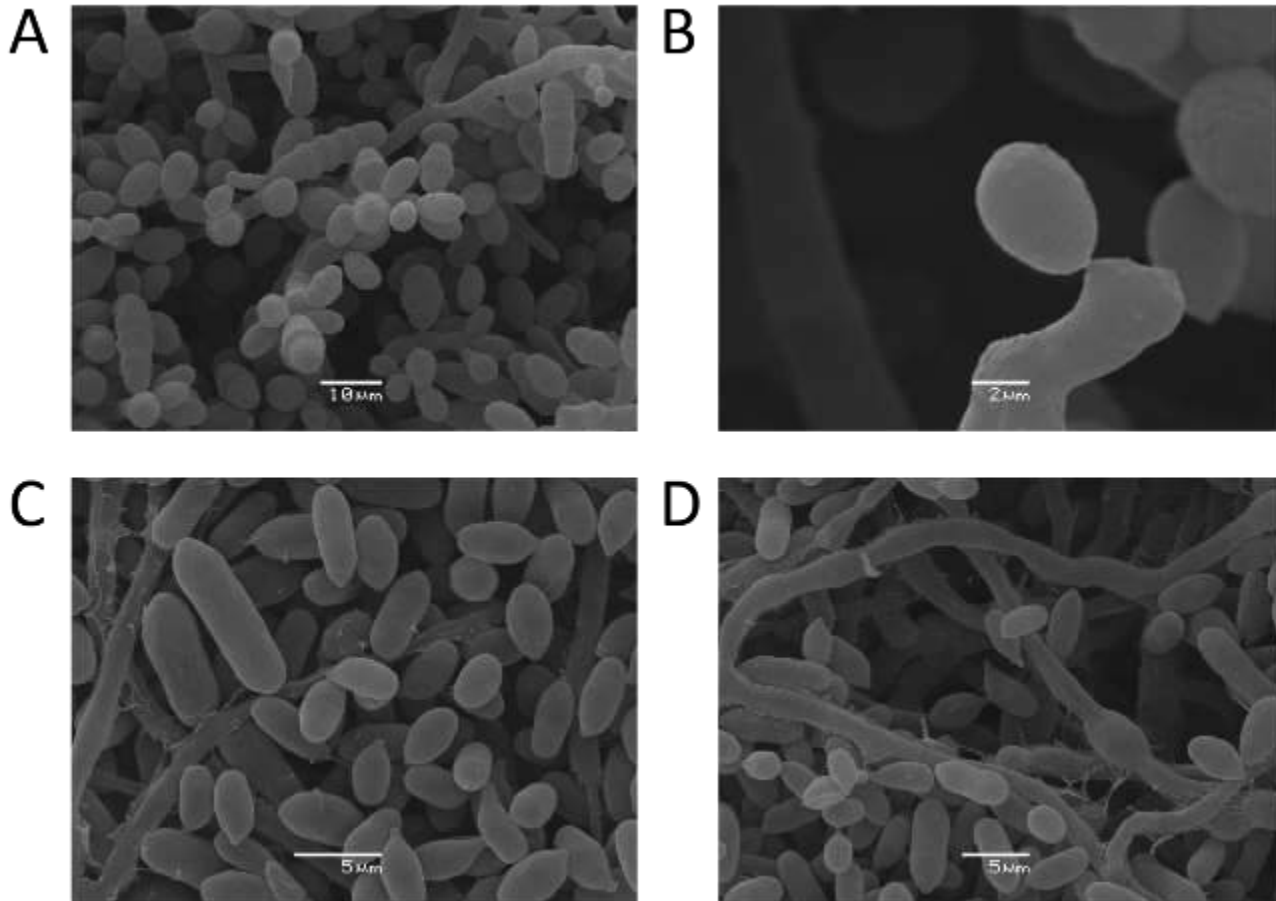
12 видов впервые обнаружены для морей Арктики:

- *Acremonium massei*
- *Acremonium sclerotigenum*
- *Alternaria chlamydospora*
- *Alternaria phragmospora*
- *Asteromyces cruciatus*
- *Microdochium lycopodium*
- *Neonectria candida*
- *Neonectria lugdunensis*
- *Paraphoma fimeti*
- *Papulaspora immersa*
- *Phialophora verrucosa*
- *Thelonectria olida*



Asteromyces cruciatus (СЭМ)

Морские грибы

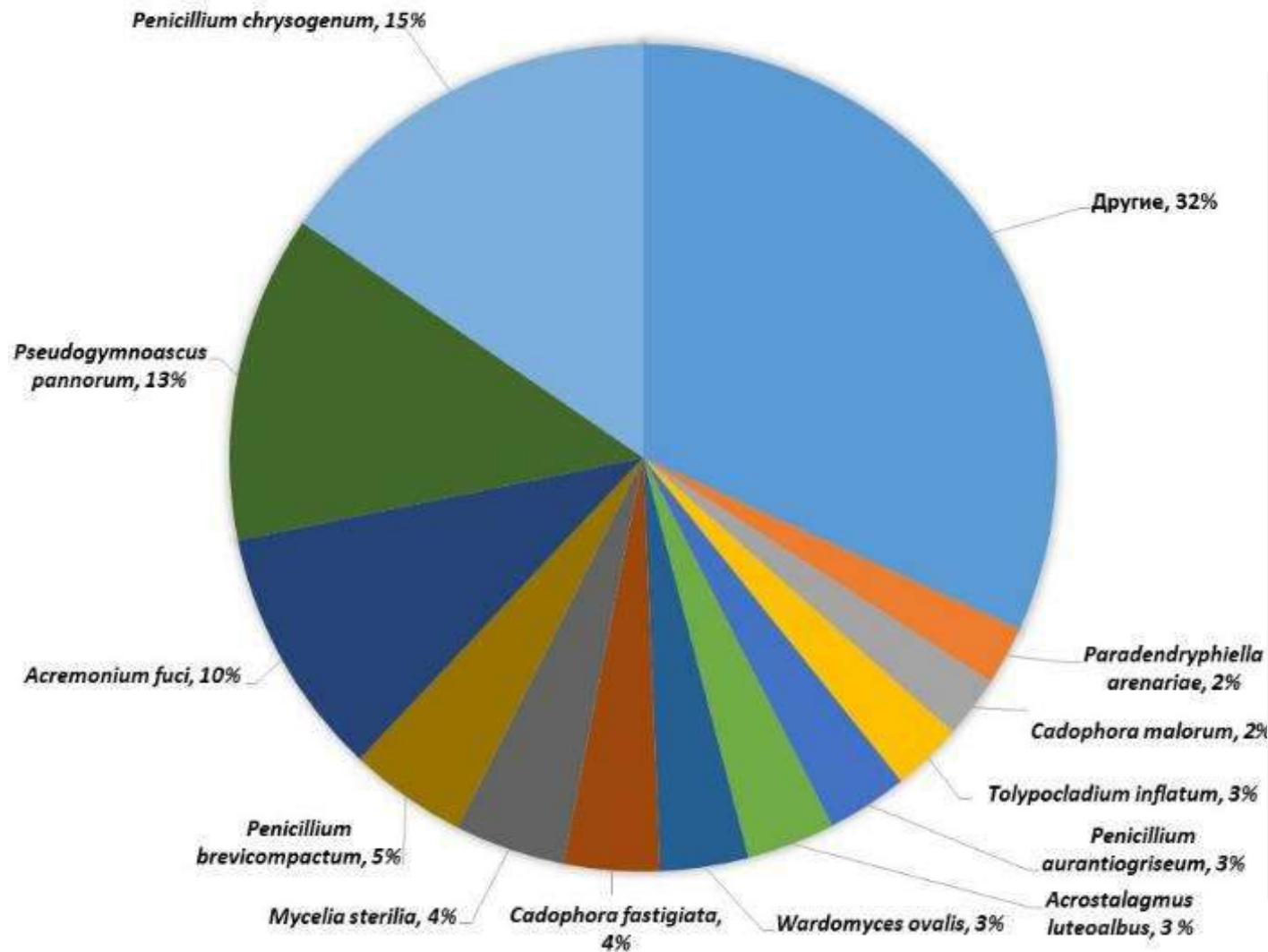


A, B - *Paradendryphiella arenariae*
C, D - *Acremonium fuci*

5 облигатных морских грибов:

- *Acremonium fuci*
- *Asteromyces cruciatus*
- *Emericellopsis maritima*
- *Paradendryphiella arenariae*
- *Paradendryphiella salina*

Общее обилие микобиоты



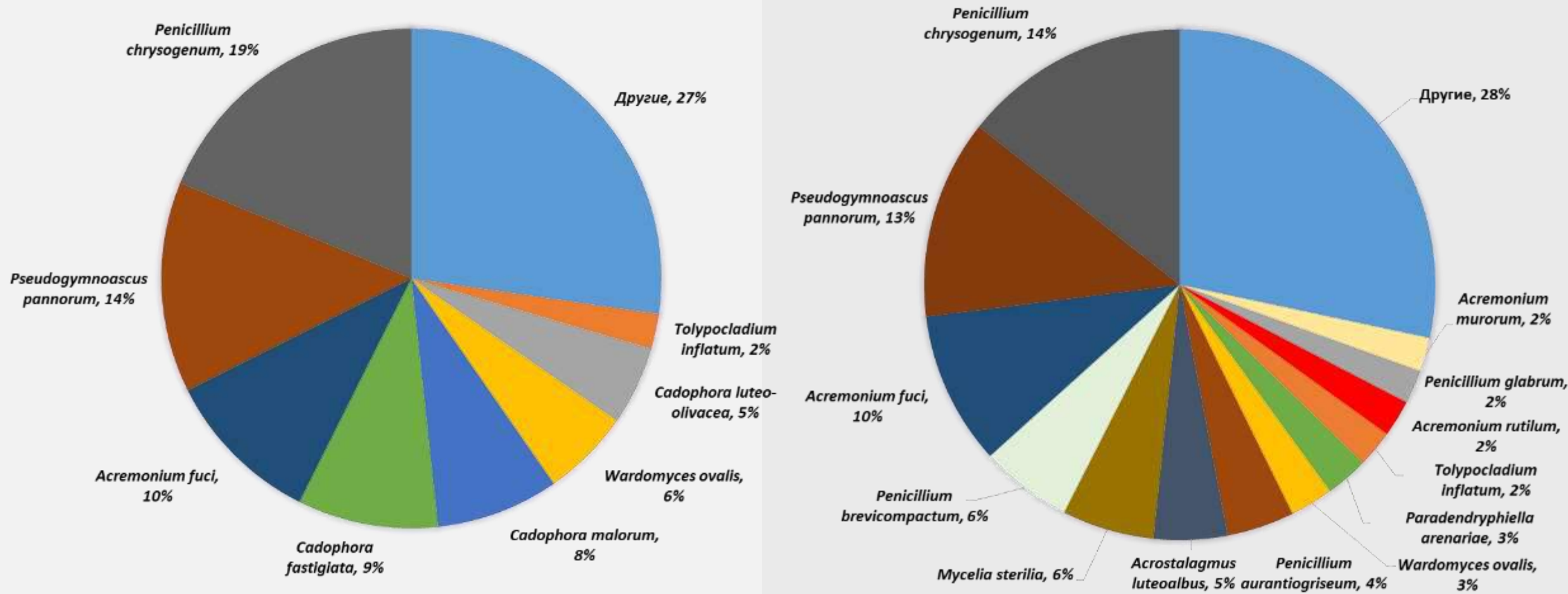
- Выделено 692 изолята, которые относятся к 64 видам из 40 родов, 22 семейств, 15 порядков, 7 классов и 2 отделов
- Подавляющее большинство – Ascomycota (61 вид)
- Наиболее разнообразны *Penicillium* (8 видов) и *Acremonium* (7 видов)

Общее соотношение обилий видов грибов в микобиоте
Белого и Баренцева морей

Соотношение обилий видов грибов

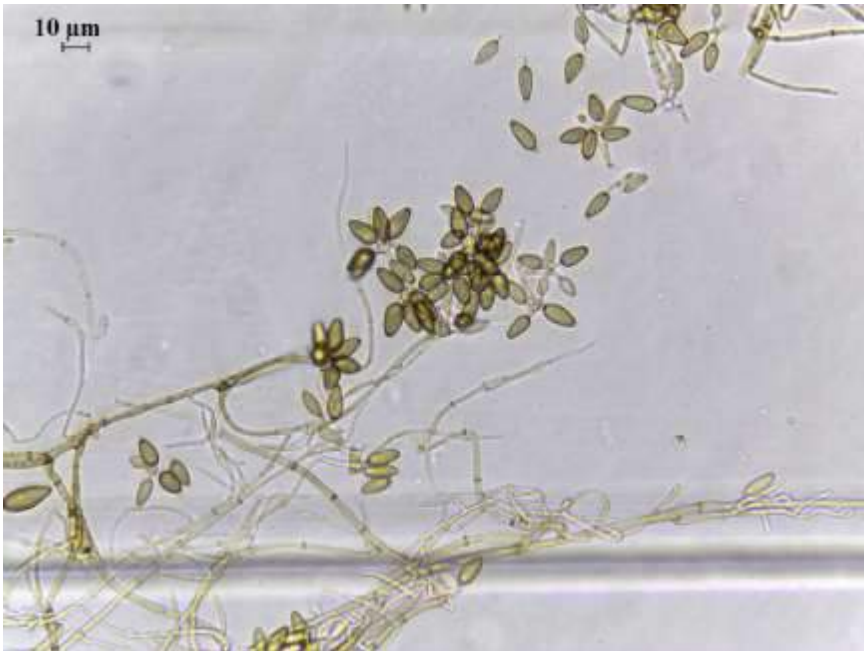
Баренцево море

Белое море



Изоляты Баренцева моря

- Всего было идентифицировано **26 видов**, 5 с помощью молекулярной идентификации
- На СА выделено 147 изолятов (**24 вида**), 7-47 КОЕ на 1г грунта
- На ДА выделено 29 изолятов (**12 видов**), 0-22,5 КОЕ на 1г грунта
- *Asteromyces cruciatus* и *Emericellopsis maritima* отмечены только на ДА

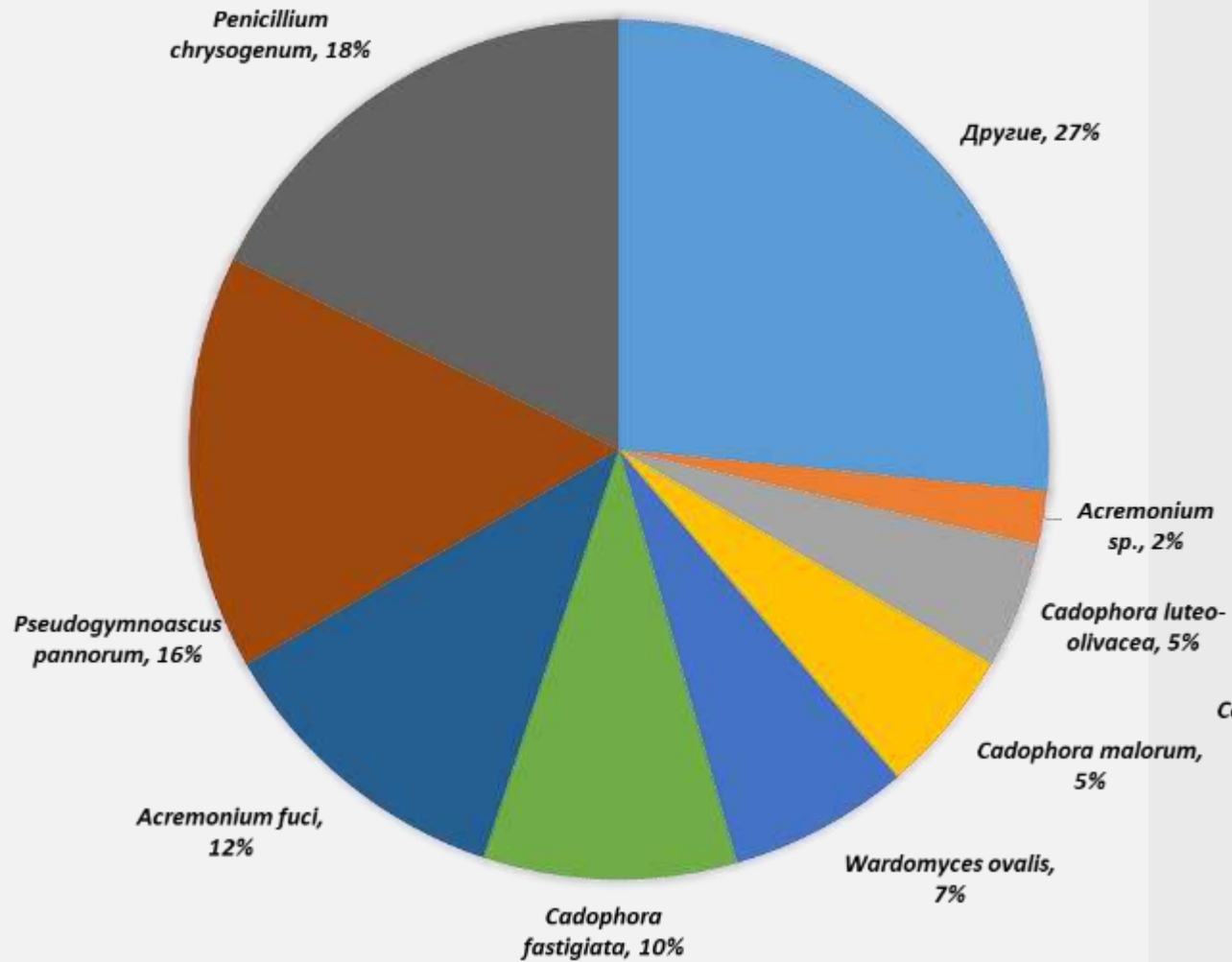


Asteromyces cruciatus,
световая микроскопия

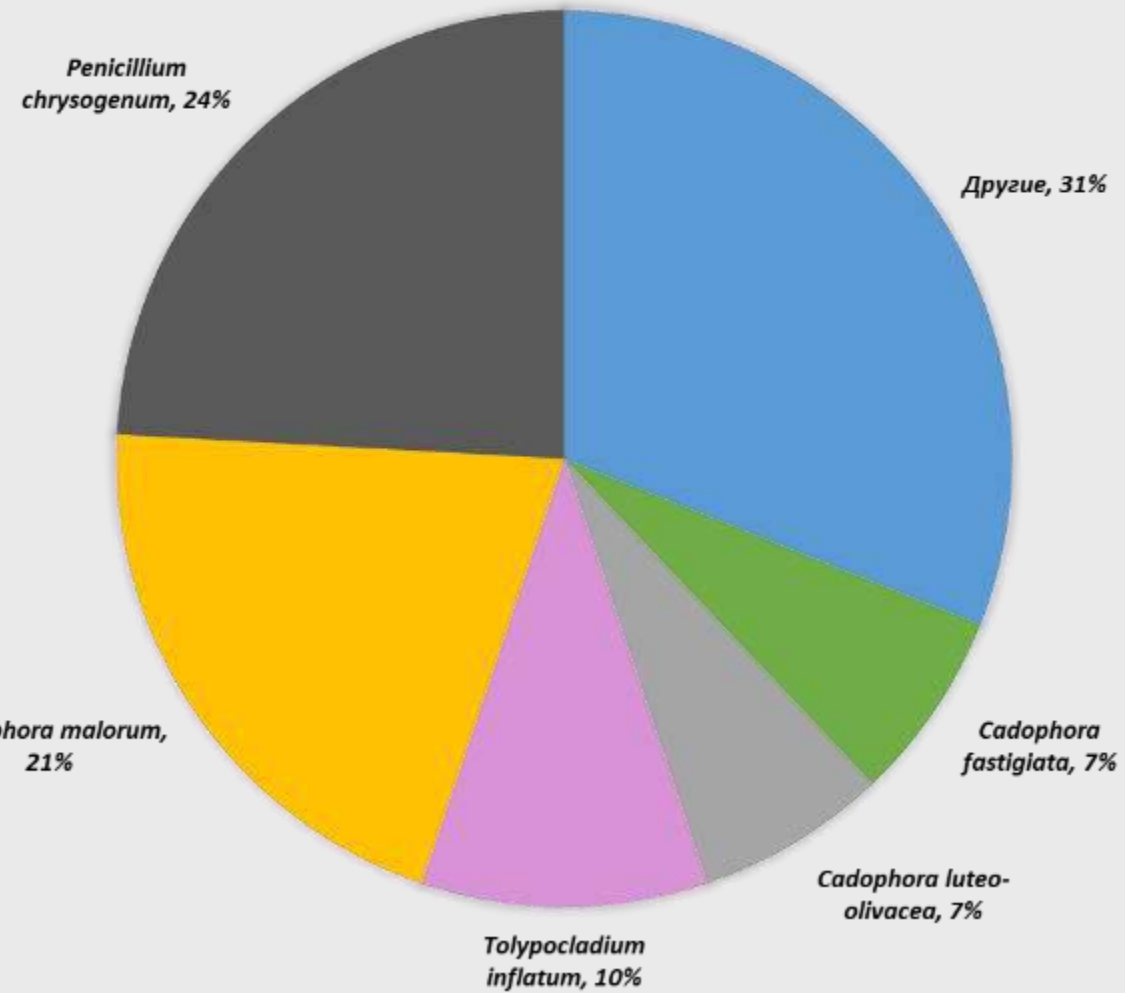


Соотношение обилий видов грибов в микобиоте Баренцева моря

Сусло-агар (СА)



Дизель-агар (ДА)



Изоляты Белого моря

- Всего было идентифицировано **60 видов**, 14 с помощью молекулярной идентификации
- На СА выделено 416 изолятов (**47 видов**), 12-77 КОЕ на 1г грунта
- На ДА выделено 100 изолятов (**29 видов**), 0-27,5 КОЕ на 1г грунта
- **13 видов** отмечены только на ДА



Paradendryphiella arenariae,
световая микроскопия

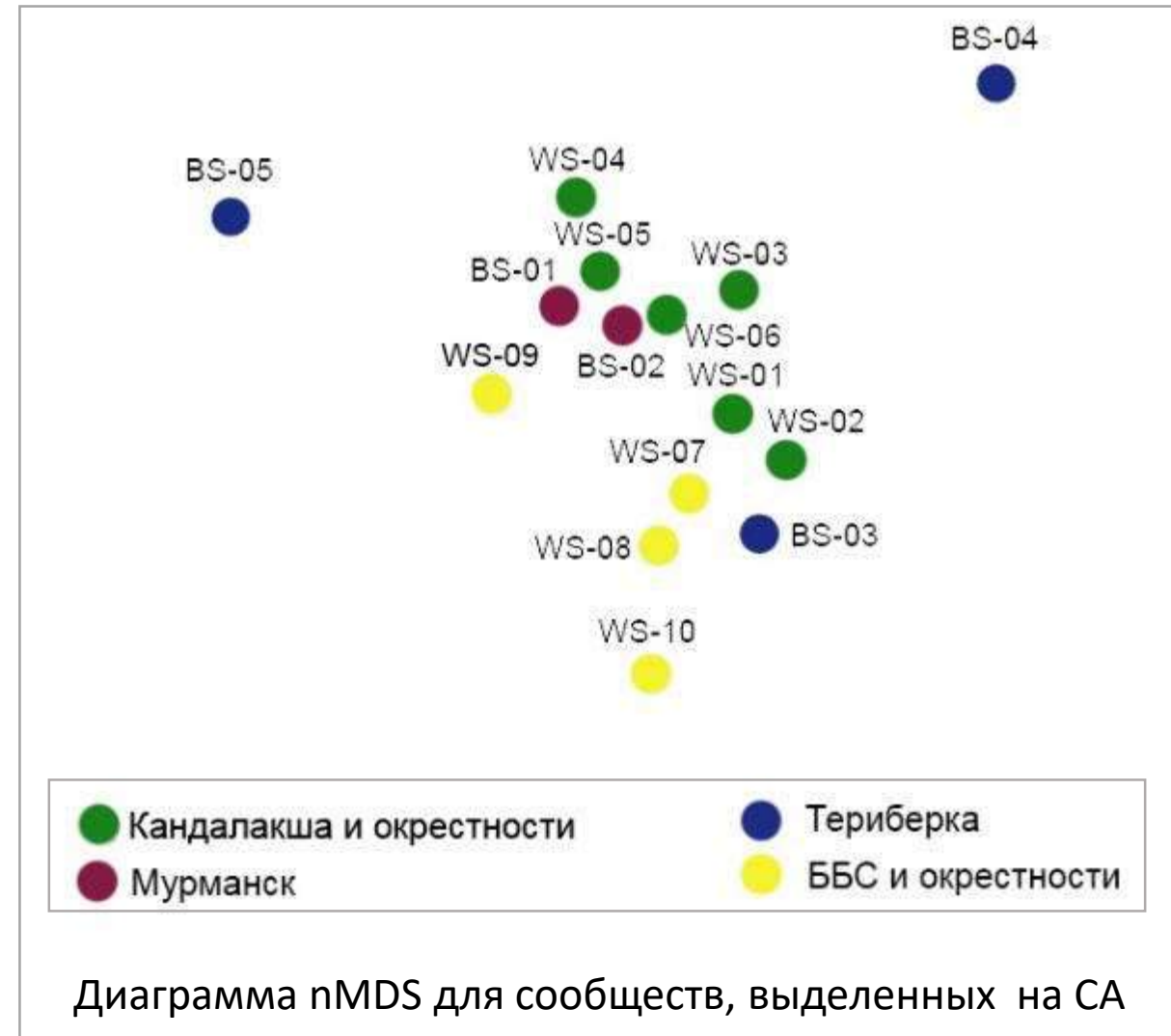


Сравнение сообществ грибов на сусло-агаре

Сравнение значимости факторов группирования по ANOSIM

Фактор среды	Уровень значимости по ANOSIM
Тип грунта	6,6%
АУВ, мкг/г	87,3%
$C_{орг}$, %	32,1%
Соленость, промилле	16%
Доля УВ от $C_{орг}$, %	34,9%
ПАУ, нг/г	56,4%
Район отбора	2,5%

Группировка не случайна при <5%

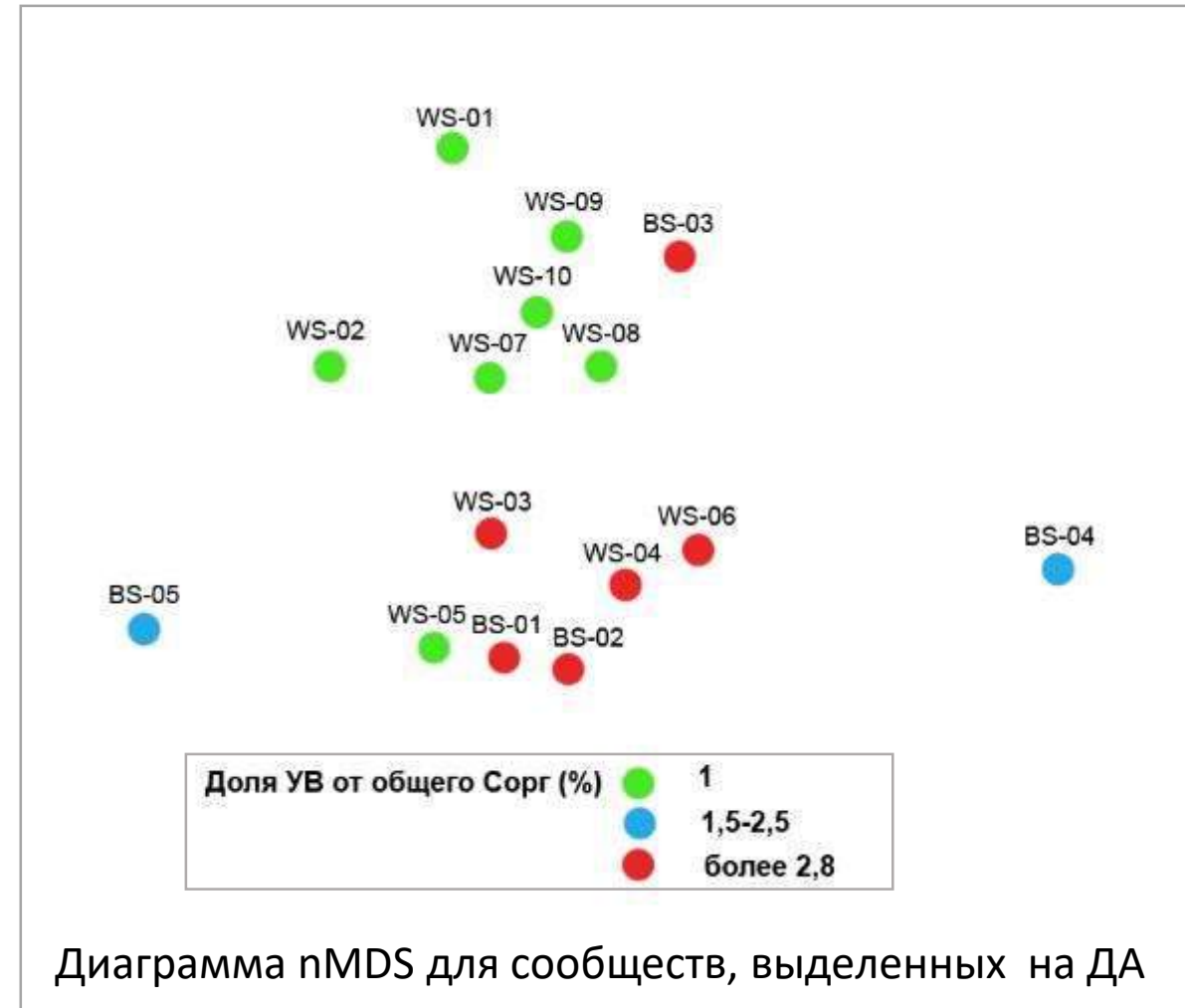


Сравнение сообществ грибов на дизель-агаре

Сравнение значимости факторов группирования по ANOSIM

Фактор среды	Уровень значимости по ANOSIM
Тип грунта	12,5%
АУВ, мкг/г	33,8%
$C_{орг}$, %	39,2%
Соленость, промилле	91,5%
Доля УВ от $C_{орг}$, %	0,3%
ПАУ, нг/г	46,5%
Район отбора	34%

Группировка не случайна при <5%



Сравнение объединенных сообществ грибов

Сравнение значимости факторов группирования по ANOSIM

Фактор среды	Уровень значимости по ANOSIM
Грунт	5,2%
АУВ, мкг/г	65,1%
$C_{орг}$, %	38%
Соленость, промилле	14,6%
Доля УВ от $C_{орг}$, %	0,5%
ПАУ, нг/г	54,4%
Район отбора	0,5%

Группировка не случайна при <5%

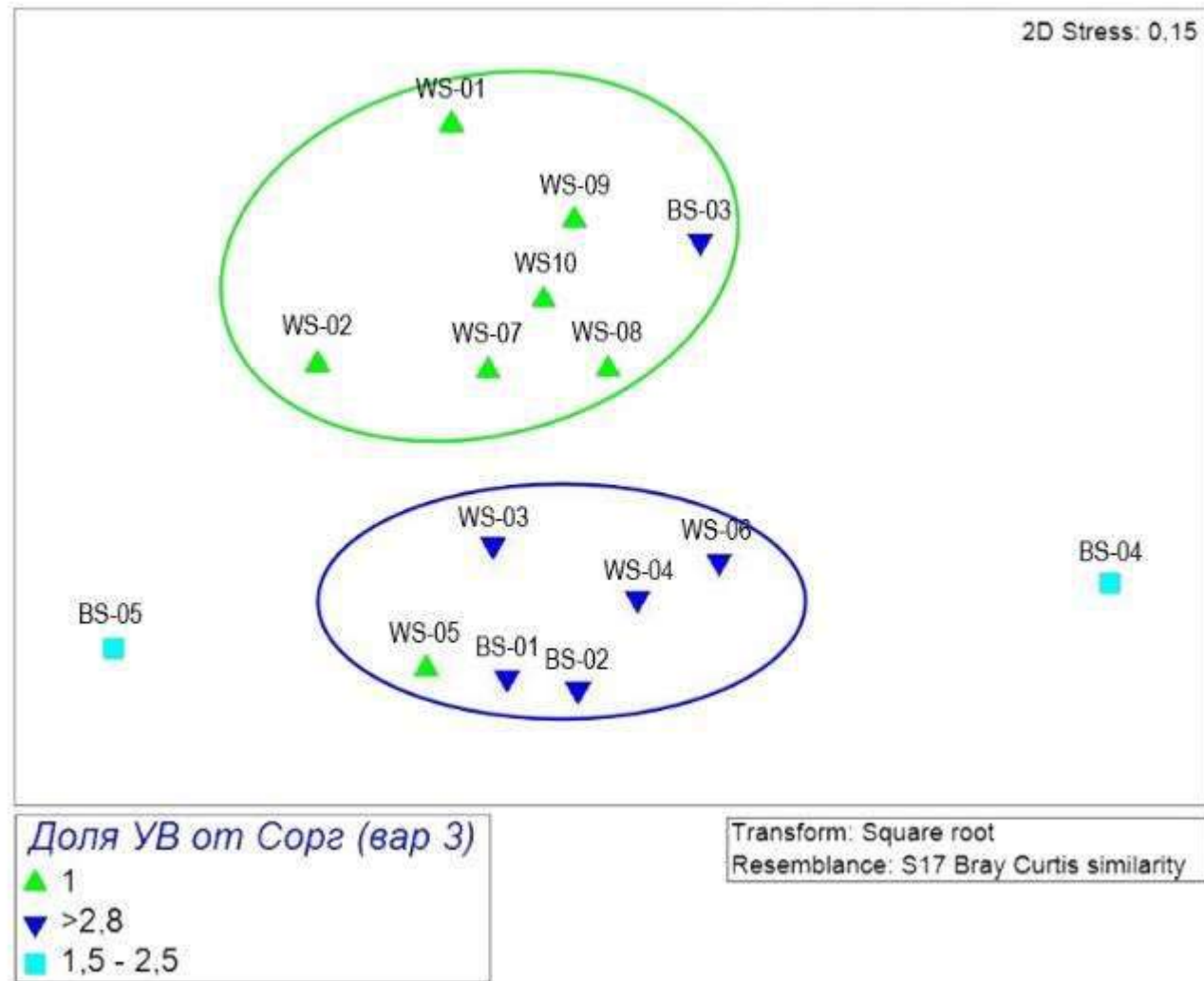


Диаграмма nMDS для объединенных сообществ

Сравнение объединенных сообществ грибов

Портовые зоны

Acremonium fuci

Cadophora fastigiata

Cadophora malorum

Nectria ramularia

*Paradendryphiella
arenariae*

Penicillium chrysogenum

*Pseudogymnoascus
pannorum*

Удаленные зоны

Acremonium fuci

Acremonium rutilum

Acrostalagmus luteoalbus

Penicillium aurantiogriseum

Penicillium brevicompactum

Penicillium chrysogenum

Penicillium lanosum

*Pseudogymnoascus
pannorum*

Tolypocladium inflatum

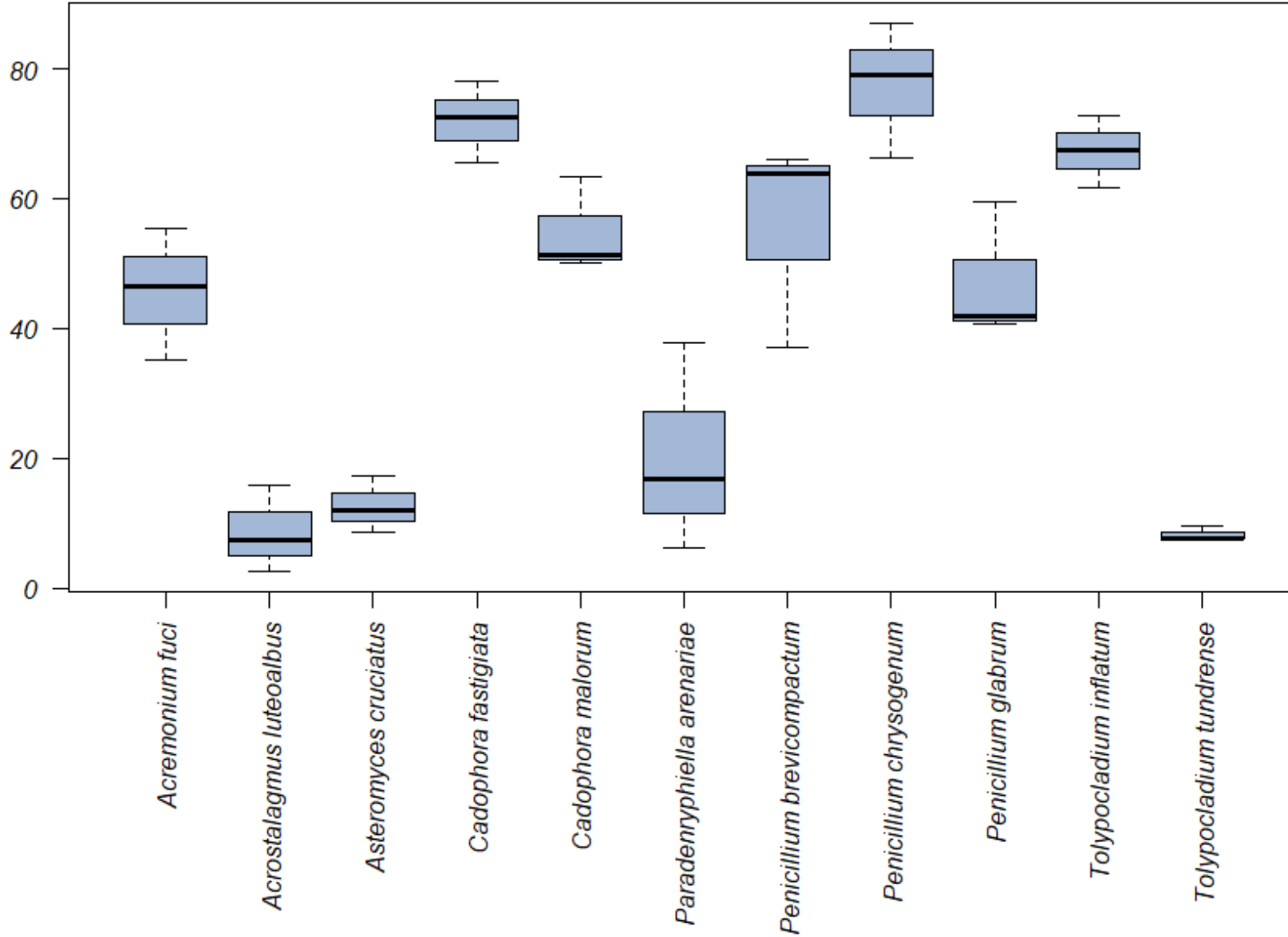
Wardomyces ovalis

Для обоих кластеров общим является – **3 вида**

Индекс Съеренсена – **28.24**

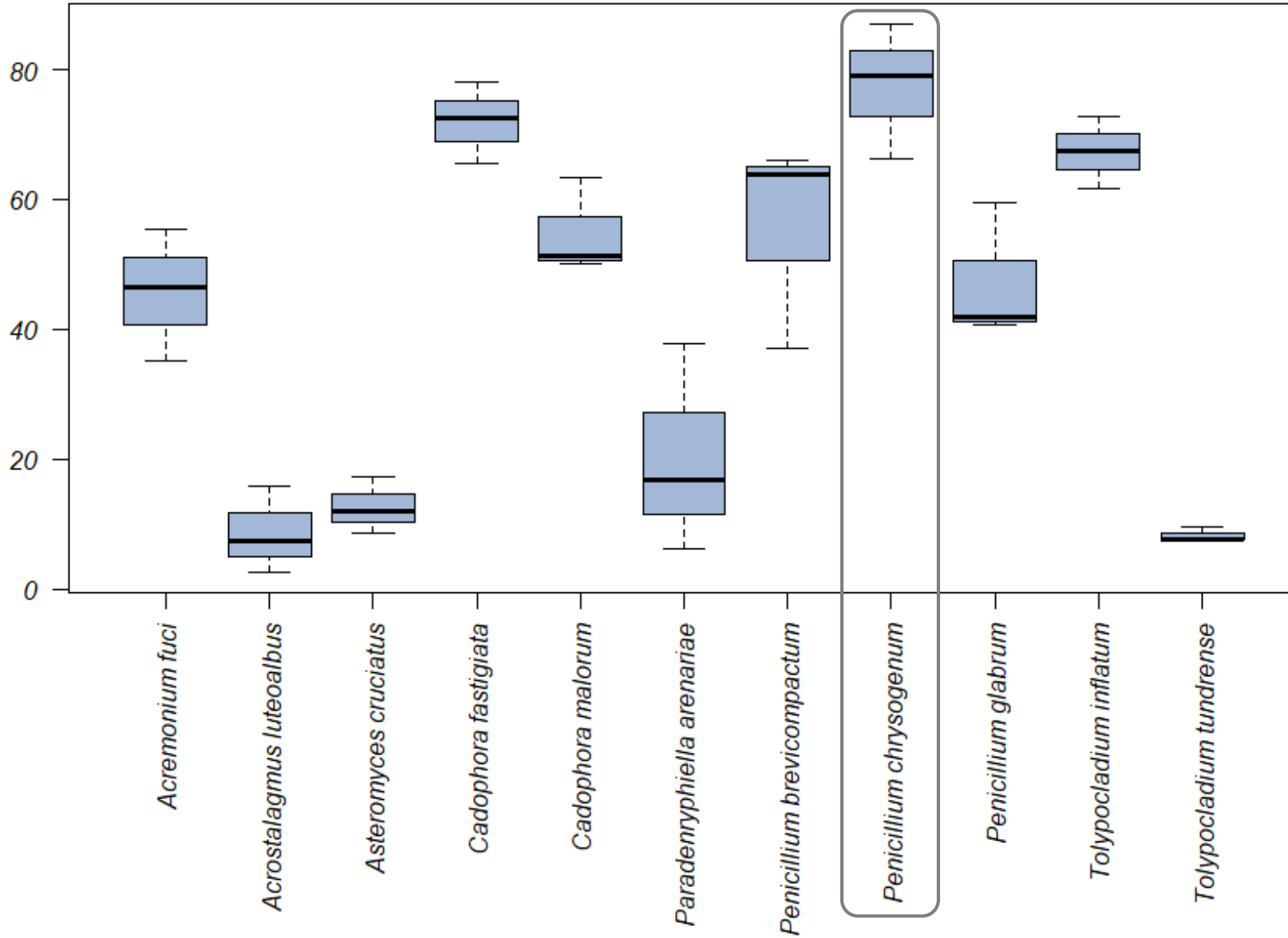
Угледородокислительная способность

Убыль остаточных углеводов (%)



Угледородокислительная способность

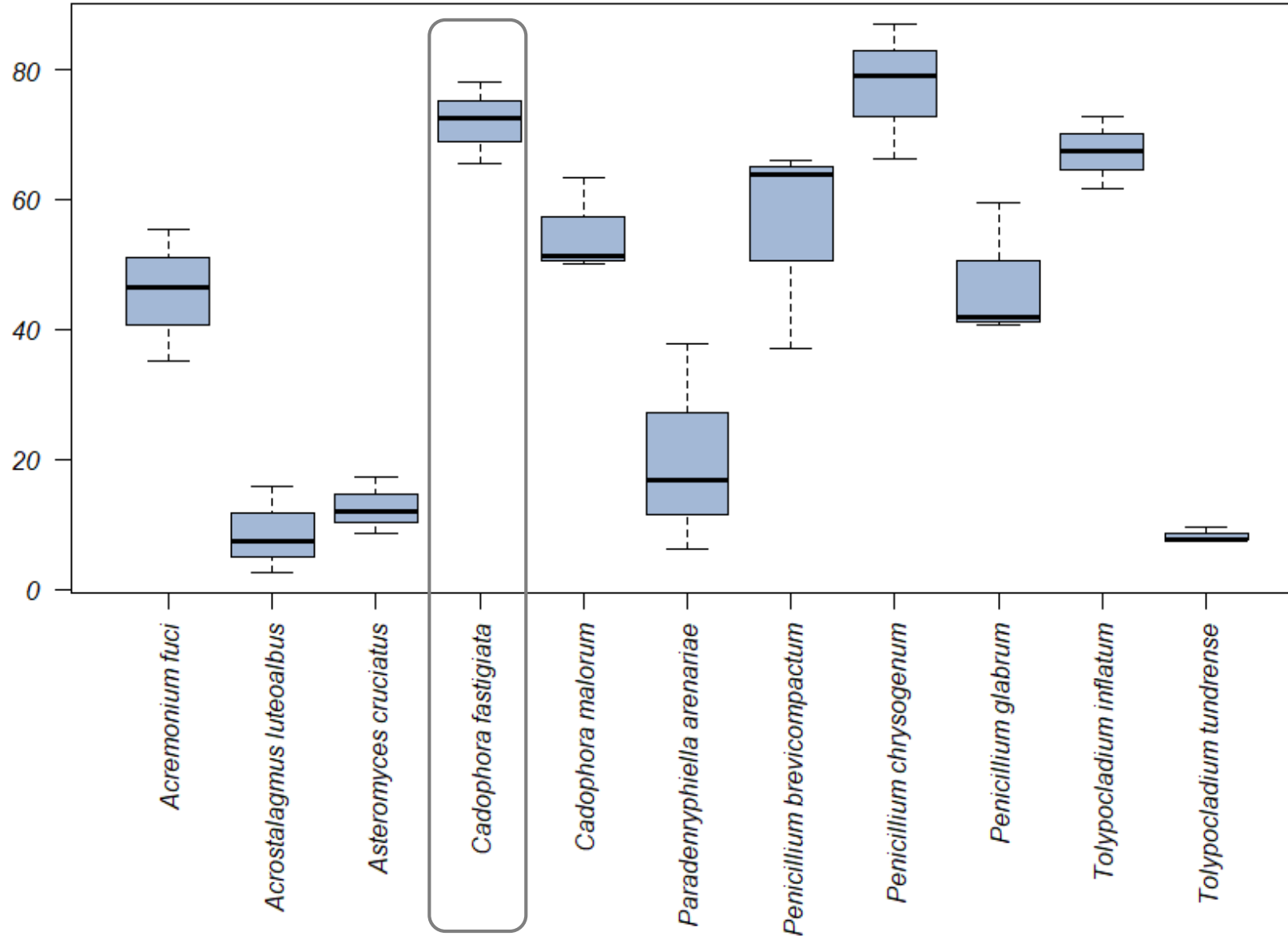
Убыль остаточных углеводов (%)



Penicillium chrysogenum –
77.4%

Угледородокислительная способность

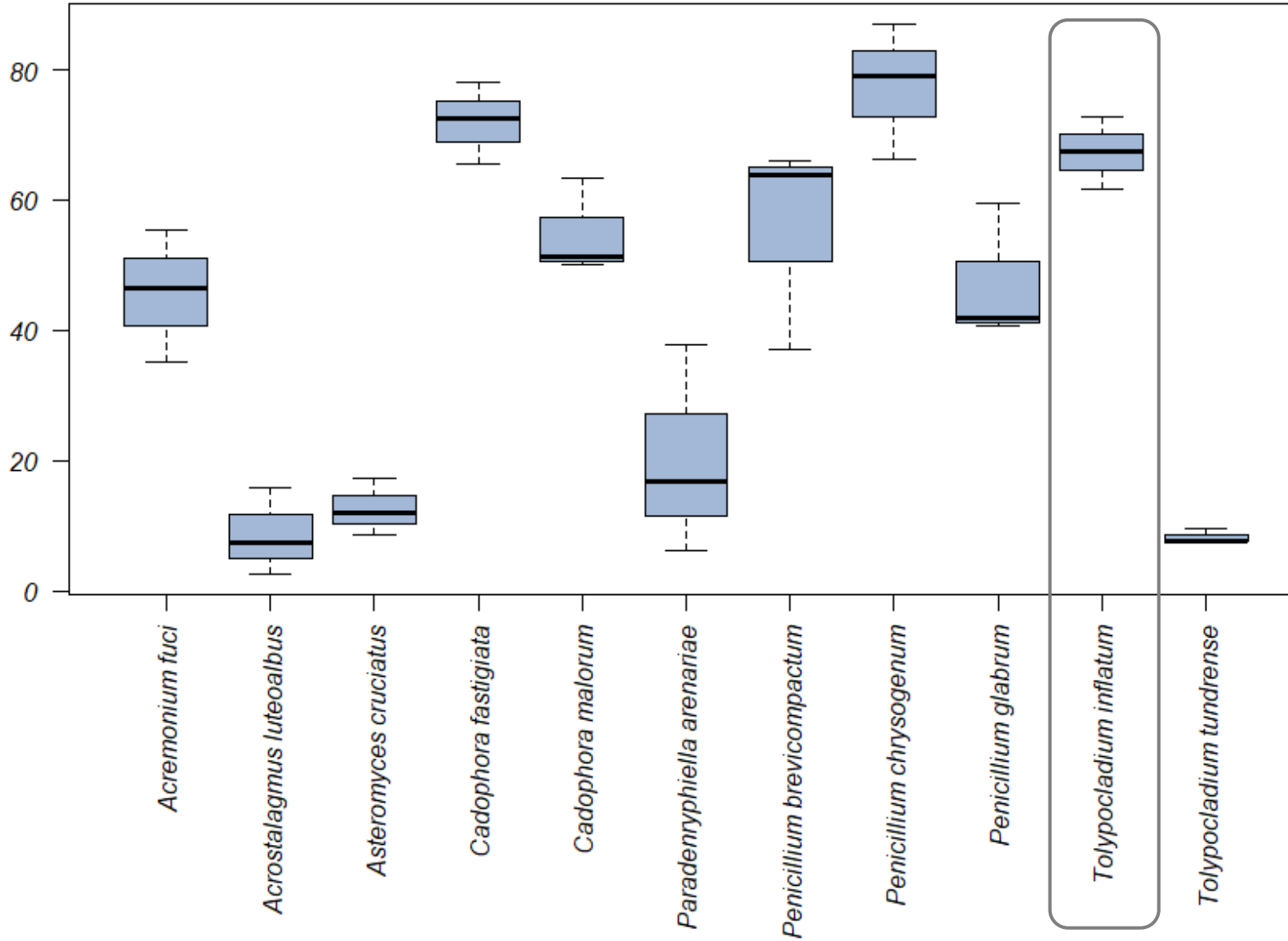
Убыль остаточных углеводов (%)



Cadophora fastigiata –
72%

Угледородокислительная способность

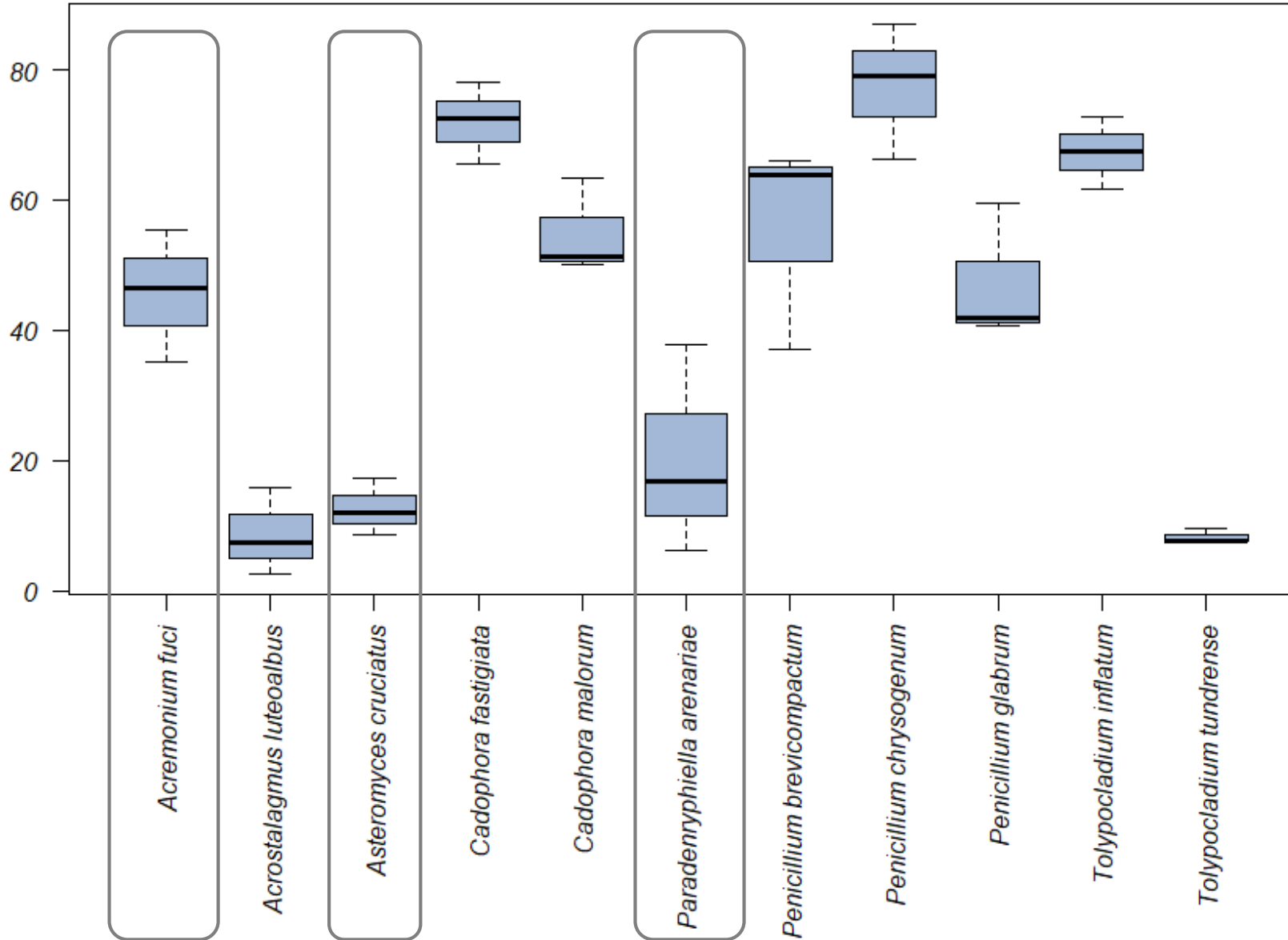
Убыль остаточных углеводов (%)



Tolypocladium inflatum –
67.2%

Угледородокислительная способность

Убыль остаточных углеводов (%)



Acremonium fuci – **45.7%**

Asteromyces cruciatus – **20.2%**

Paradendryphiella arenariae – **12.6%**

Выводы

- В исследованных грунтах литорали Белого и Баренцева морей большая часть выделенных изолятов грибов относится к Ascomycota (61 вид), в небольшом количестве представлены Mucoromycota (3 вида).
- Наиболее обильными видами грибов в микобиоте грунтов являются *Penicillium chrysogenum* (15% общего обилия), *Pseudogymnoascus pannorum* (13%) и *Acremonium fuci* (10%). 32% микобиоты исследованных грунтов представлено минорными видами, имеющими относительное обилие <2%.
- На таксономический состав и структуру микобиоты грунтов помимо физико-географических характеристик конкретной локации, значительное влияние оказывает доля углеводов в общем органическом углероде, что особенно четко выражено при анализе селективной среды на основе дизельного топлива.
- Наибольшую способность к окислению углеводов показали изоляты *Penicillium chrysogenum* (разложив в среднем 77.4% остаточных углеводов), *Cadophora fastigiata* (72%) и *Tolyposcladium inflatum* (67.2%).

Спасибо за внимание!

Благодарности

- Выражаю благодарность своим научным руководителям кандидату биологических наук, научному сотруднику ББС МГУ им. Н.А. Перцова Бубновой Екатерине Николаевне и кандидату биологических наук, старшему научному сотруднику кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ Георгиевой Марине Леонидовне за мудрое руководство в работе, неоценимую помощь и бесконечное терпение.
- Кандидату биологических наук, старшему научному сотруднику лаборатории экологии прибрежных донных сообществ Института океанологии РАН Симаковой Ульяне Вадимовне за предоставленную возможность и помощь в проведении молекулярно-генетических исследований и разьяснении тонкостей данного процесса.
- Кандидату биологических наук, научному сотруднику ББС МГУ им. Н.А. Перцова Грум-Гржимайло Ольге Алексеевне за предоставленные советы касательно обработки молекулярно-генетических данных по отношению к морским грибам.
- Научному сотруднику лаборатории физиологии и биохимии микробов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ Шестакову Андрею Иннокентьевичу за предоставленную возможность выполнения оценки углеводородокислительной способности и помощь на всех ее этапах.
- Кандидату биологических наук старшему научному сотруднику кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ Благовещенской Екатерине Юрьевне за мудрые советы.
- А также Хлыбовой Александре, Сучалко Олегу и Соловьеву Евгению за помощь и поддержку.