



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии

**Эколого-физиологическая характеристика
микровицетов из донных грунтов Белого моря**

Выпускная квалификационная работа магистра

Исполнитель:

Комиссаров Никита Сергеевич

Научный руководитель:

д.б.н., профессор Кураков А.В.

Москва, 2019

Из донных грунтов Белого моря и других северных морей, которые остаются одними из наименее изученных экотопов, в последние годы **в исследованиях микобиоты выделяют не менее 70–150 видов**, преимущественно аскомицетов и зигомицетов (Бубнова, 2009; Хуснуллина и др., 2017 и др.).

Для того чтобы понять, какие из этих грибов действительно обитают в грунтах, могут выжить и функционировать в этом местообитании, необходимы знания о физиолого-биохимических свойствах морских изолятов, которые крайне скудны или отсутствуют для подавляющего большинства видов.

Морские донные грунты характеризуются:

- 1) **низкой температурой;**
- 2) **высоким содержанием NaCl;**
- 3) **повышенным давлением;**
- 4) **нередко низкой обеспеченностью питательными субстратами и их специфичностью;**
- 5) **низкой освещённостью;**
- 6) **возможным образованием анаэробных условий.**

Необходимо оценить способность штаммов видов, выделенных из морских экотопах, расти при этих параметрах среды.

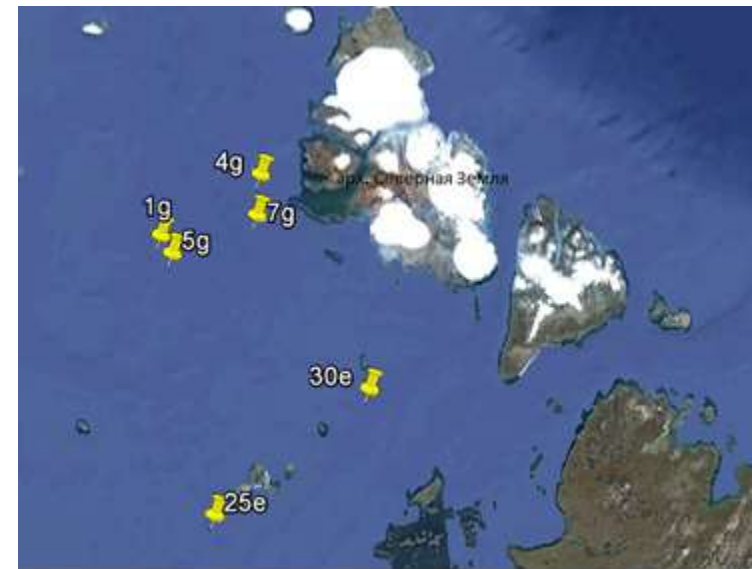
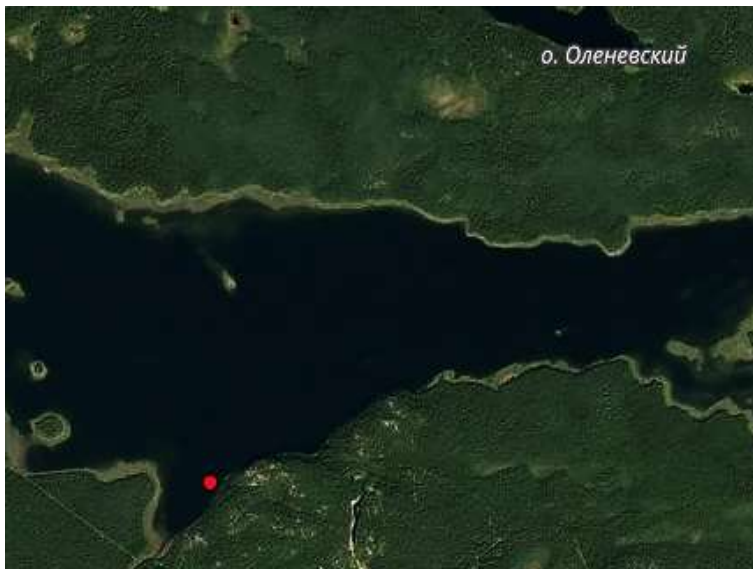
Цель работы – эколого-физиологическая характеристика грибных штаммов различных таксонов из морских экотопов, в первую очередь грунтов Белого моря, и выявление тех видов, которые способны в них развиваться.

Задачи:

- 1) Изучить химический состав донных грунтов Белого и Карского морей;
- 2) Определить видовой состав микобиоты в арктическом льде в районе Северного полюса;
- 3) Определить зависимость линейной скорости роста отобранных штаммов от температуры, солёности среды, различных источников углерода в среде и обеспеченности кислородом;
- 4) Определить жизнеспособность и возможность роста штаммов при инкубации непосредственно в морские донные грунты;
- 5) На основе изученных свойств штаммов, выявить, какие виды способны к обитанию в донных грунтах Белого моря;
- 6) Оценить способность изолятов, выделенных из донных грунтов Белого моря, к разрушению нефти при низкой температуре.

Места выделения штаммов грибов из донных грунтов и арктического льда

- 1) Беломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова (66°34' N, 33°08' E) (литораль и с глубин 10, 20, 30 метров);
- 2) Акватория Чёрной губы Белого моря (66°30'1" N, 33°3'36" E) (глубина 11-12 метров).
- 3) Карское море (восточная акватория, с глубин 51-204 метров);
- 4) Ледник в основании арктической станции Барнео (89°26'72" N, 129°42'35" E) (поверхность и с глубины 25, 50 см).



Химический анализ донных грунтов

Определяли содержание:

- Органического углерода (колориметрически по методу Тюрина в модификации ЦИНАО, ГОСТ 26213-91);
- Общего азота (по методу дистилляции Кьельдаля с использованием системы для программируемой дистилляции «VaroDest 30» (ФРГ));
- Подвижных форм фосфора (колориметрически по методу Кирсанова в модификации ЦИНАО, ГОСТ 26207-91);
- рН водной вытяжки (потенциометрически на иономере «inoLab» (ФРГ), ГОСТ 26483-85).

Изучение состава грибов в арктическом льде в районе Северного полюса и выделение штаммов для коллекции

- Выделение культур грибов из проб льда проводили **методом прямого посева** 0,2 мл образца льда на питательную среду в пятикратной повторности.
- Использовали сусло-агар, среду Сабуро, без и с добавкой 30‰ NaCl, с антибиотиком (цефтриаксон, из расчета 0,5 мг/1 мл среды). Инкубацию осуществляли при температуре +10°C и +25°C в течение 14 суток.
- Видовую принадлежность определяли по культурально-морфологическим признакам и на основе анализа нуклеотидных последовательностей D1/D2 доменов 26S (LSU) рДНК.

Виды/штаммы

Отобраны штаммы разных видов, преимущественно тех, которые часто обнаруживаются в грунтах Белого моря на глубинах (10–30 м), и также - на литорали и морском арктическом льде:

- 1) *Acremonium tubakii* (34а-лит-1мл-1-25°C);
- 2) *Cladosporium cladosporioides* (420, Ан-20-3-САМВ-к23);
- 3) *C. halotolerans* (216);
- 4) *C. salinae* (483, 65ст9-1мл-1-50°C*);
- 5) *Cystofilobasidium infirmominiatum* (Бор25-2СА-10)**;
- 6) *Eupenicillium limosum* (54Ст24-з-к2-25°C)*;
- 7) *Fusarium culmorum* (Ан-лтр-песк-2-рк43);
- 8) *Lecanicillium muscarium* (43ан-20м-1кап-1);
- 9) *Leucosporidium scottii* (Бор25-3СА-25)**;
- 10) *Memnoniella dichroa* (17а-лит-1кап-1);
- 11) *Mucor hiemalis* (90а-30-1мл-2-5°C);
- 12) *Paradendryphiella salina* (21а-30-СА-5°C);
- 13) *Penicillium roqueforti* (17а-лит-0,5мл-2-25°C);
- 14) *P. solitum* (73ан-пом-1к);
- 15) *Pseudeurotium hygrophilum* (7а-20м-1кап-2)*;
- 16) *Purpureocillium lilacinum* (55ст-24-з-к2-25°C);
- 17) *Simplicillium lamellicola* (9V20 крах);
- 18) *Talaromyces diversus* (74а-10-4к-25°C);
- 19) *T. rugulosus* (76а-20-1к-25°C);
- 20) *T. variabilis* (84а-20-з-1-25°C);
- 21) *Tolypocladium cylindrosporum* (60ан-10м-2кап-1);
- 22) *T. inflatum* (65ан-20м-4к);
- 23) *Umbelopsis longicollis* (44ан-20м-1кап-1).

* - штамм, выделенный из донных грунтов Охотского моря (240 м); ** - из арктического льда.

Оценивали способность грибов расти при пониженной температуре, лимитированном обеспечении кислородом, при высоком содержании хлорида натрия, на субстратах, поступающих в донные грунты и при непосредственной инокуляции в грунты.

Определяли:

- температурный диапазон и оптимум роста (от $+5^{\circ}\text{C}$, $+10^{\circ}\text{C}$, $+15^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$, $+25^{\circ}\text{C}$, $+30^{\circ}\text{C}$, $+35^{\circ}\text{C}$) штаммов на сусло-агаре;
- скорость и оптимум радиальной скорости роста штаммов на сусло-агаре при разном содержании NaCl (0‰, 25‰, 30‰, 35‰, 40‰ и 50‰).
- скорость роста штаммов на крахмале, целлюлозе, хитине, кератине и фрагментах таллома ламинарии в качестве источника углерода в среде Чапека-Докса;
- возможность роста штаммов в анаэробных условиях при $+5^{\circ}\text{C}$ на сусло-агаре (в анаэробных боксах «GENbox Anaer, контроль резазурином);
- способность штаммов сохранять жизнеспособность и повышать плотность популяции при инокуляции и инкубации в донных грунтах.

Определение жизнеспособности и динамики численности КОЕ штаммов грибов при инкубации в донных грунтах

Стерильные (автоклавированные) грунты Белого моря в эппендорфах инокулировали суспензией мицелия и спор штаммов, ранее показавших способность развиваться на средах с NaCl при +5°C.

Над грунтом была налита стерильная дистиллированная вода с содержанием 30‰ NaCl. Инкубацию проводили при +5°C и на 1, 7, 14, 30, 60 и 90 сутки из эппендорфов отбирали грунт, насыщенный водой пипеткой (0,2 мл) высевали на сусло-агар с солью в 3-кратной повторности для определения числа КОЕ штамма. Инкубацию грибов в анаэробных условиях осуществляли по той же схеме, но в анаэробных боксах в течение 21 суток.

Схема опыта

- 1 г донного грунта; 3-х кратная повторность;
- 9 мл дистиллированной воды с 30‰ NaCl;
- Варианты – грунт без добавок субстратов и грунт с внесением фрагментов ламинарии, крахмала, хитина или глюкозы (1% по массе);
- Внесение по 0,2 мл суспензии с 5×10^4 - 10^5 КОЕ/мл штамма в 1 г грунта с 9 мл соленой воды.



Химический состав донных грунтов

Таблица 1. Содержание органического углерода, общего азота, подвижного фосфора в образцах донного грунта, соотношение углерода к азоту и значения рН водных вытяжек.

Образец грунта	Море	Глубина отбора, м	Орг. С (%)	Общий N (%)	Подвижные формы P (%)	C/N	рН
Бел-1	Белое	12	1,92	0,013	0,17	148,63	5,6
Бел-2	Белое	11	1,78	0,013	0,16	141,58	5,7
1g	Карское	179	1,2	0,020	0,3	60,83	н/д
4g	Карское	204	0,98	0,012	0,16	81,47	н/д
5g	Карское	116	0,81	н/д	0,11	н/д	н/д
25e	Карское	51	0,75	0,010	0,11	77,41	н/д
30e	Карское	90	0,95	0,013	0,18	71,25	н/д

Содержание органического углерода, азота и фосфора типично для донных грунтов прибрежной шельфовой зоны, более богаты по этим элементам, чем подзолистые почвы, т.е. вполне могут поддерживать жизнедеятельность грибов.

Табл. 2. Численность и видовой состав грибов в арктическом льде

Глубина взятия пробы, см	КОЕ, тыс./г льда	Виды
0	6,3	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Leucosporidium scottii</i> , <i>L. yakuticum</i> , <i>Vishniacozyma victoriae</i>
25	3,5	<i>C. infirmominiatum</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>L. scottii</i> , <i>L. yakuticum</i> , <i>V. victoriae</i>
50	0,2	<i>D. hansenii</i>

Мицелиальные грибы – 3 вида - *Cladosporium* sp. и *Penicillium* sp. обнаружены только на поверхности и их число не превышало 86 КОЕ в 1 г льда.

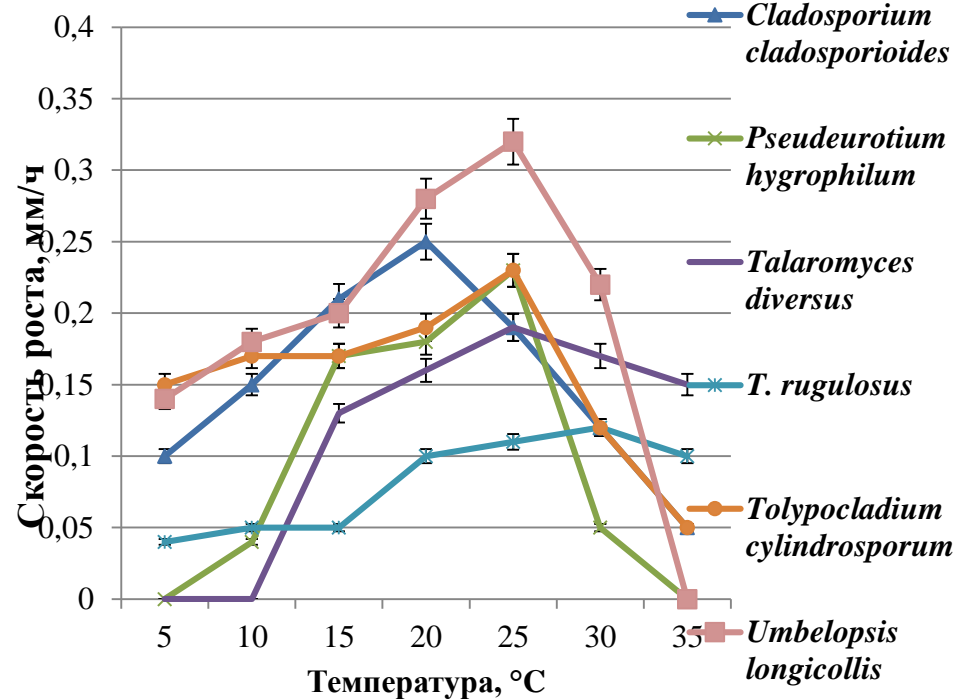
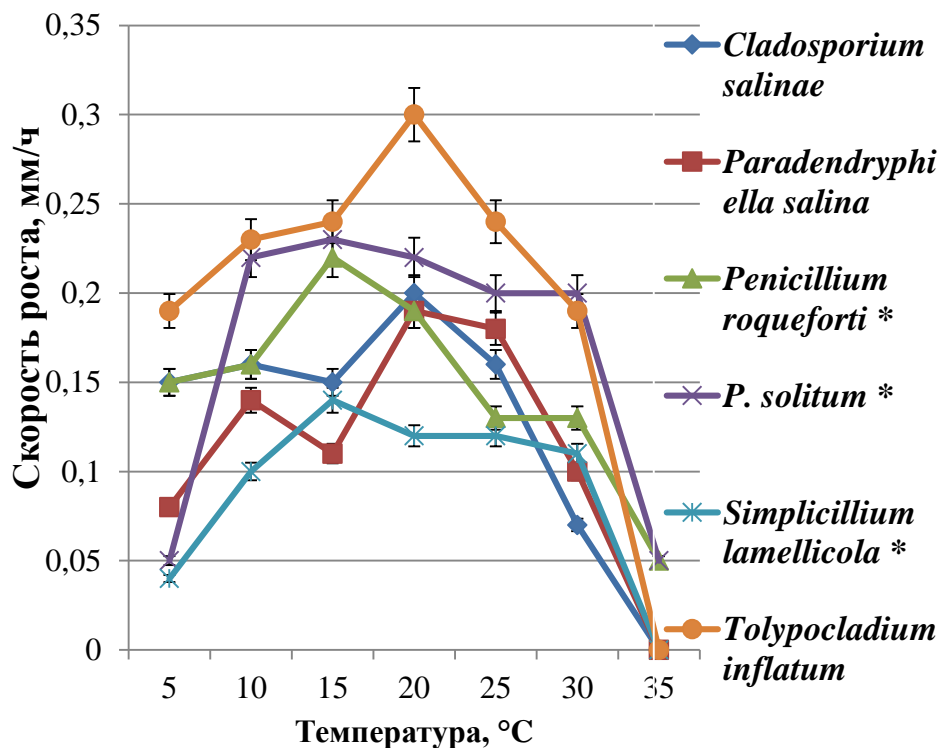
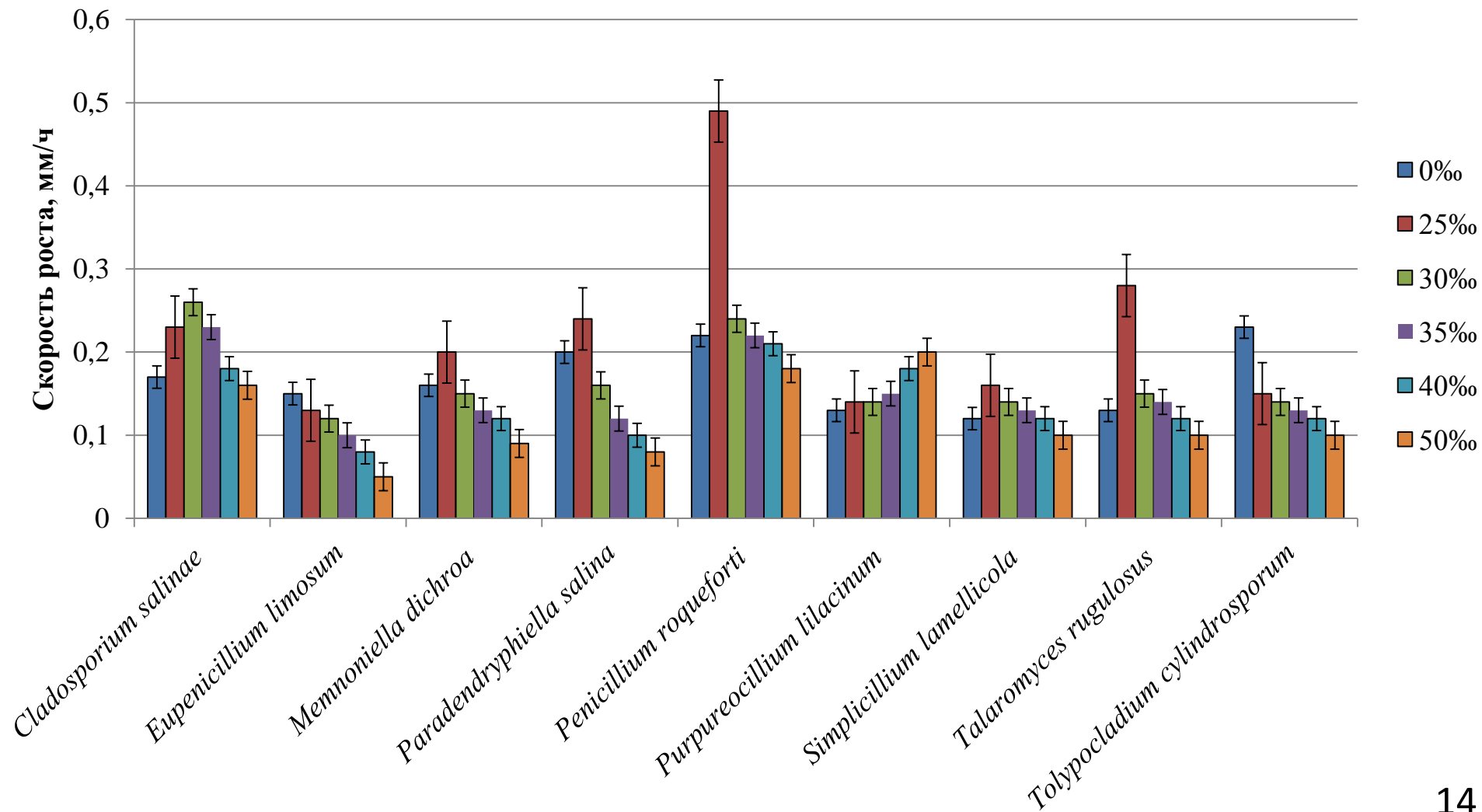


Рис. 6-7. Радиальная скорость роста штаммов микромицетов при разных температурах +5 – +35°C.

Температурный диапазон и оптимум роста штаммов микроскопических грибов из морских донных отложений

- Большинство (17 из 23) изученных штаммов – мезофилы, из которых 9 развиваются при $+5^{\circ}\text{C}$, с оптимумами преимущественно при $+20^{\circ}\text{C}$.
- К психротолерантам и психрофилам (оптимумы роста $+15^{\circ}\text{C}$ и $+10^{\circ}\text{C}$, соответственно) относились 5 штаммов – *Penicillium roqueforti*, *P. solitum* и *Simplicillium lamellicola*, и *Cystofilobasidium infirmominiatum* и *Leucosporidium scottii*.
- Штамм *Talaromyces diversus* имел нижнюю границу роста при $+15^{\circ}\text{C}$ и оптимум при $+25^{\circ}\text{C}$, хотя выделен из грунта с глубины 10 м.

Скорость роста штаммов микромицетов при различных концентрациях NaCl в среде



Рост штаммов микромицетов при разных концентрациях NaCl

- Все изученные штаммы относились к галотолерантам, 13 из 23 штаммов имели максимальную скорость роста при концентрации хлорида натрия 25‰ и 30‰ в среде, т.е. такой же, как в Белом море. 6 – имели оптимум при 0‰, *Purpureocillium lilacinum* – при 50‰ (по лит. данным – галотолерант).
- Впервые показана галотолерантность для *Memnoniella dichroa*, *Simplicillium lamellicola*, *Umbelopsis longicollis*. Для видов рода *Talaromyces* были установлены оптимумы роста на агаризованных средах с хлоридом натрия.

Рост штаммов грибов в анаэробных условиях

При +5°C сусло-агаре (на дистиллированной и солёной воде с 30‰ NaCl) росли штаммы *Cladosporium cladosporioides*, *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Fusarium culmorum*, *Leucosporidium scottii*, *Mucor hiemalis*, *Tolyocladium cylindrosporum* и *T. inflatum*.



Рис. 10. Мицелий и споры *F. culmorum*, сформированные в анаэробных условиях

Количество штаммов, растущих на различных субстратах и их предпочтение

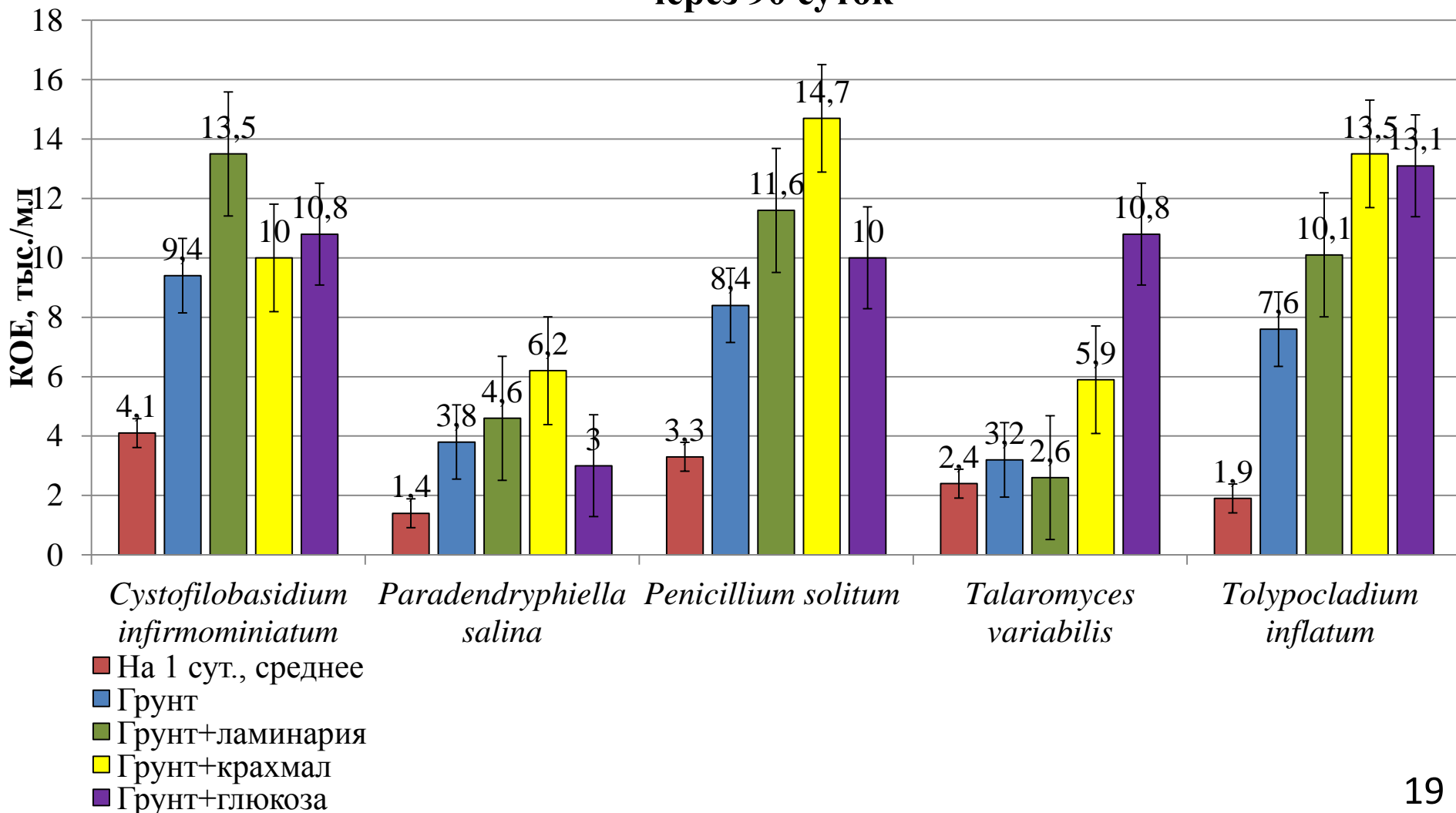


- - Развивались
- - Среда с субстратом, на которой штаммы росли с наибольшей радиальной скоростью

Рост штаммов на различных субстратах

- Все штаммы росли на средах на основе соленой воды, таких как – сусло-агар, крахмал, отвар из измельчённого таллома ламинарии), кроме *U. longicollis*, который рос только на сусло-агаре.
- Максимальная линейная скорость роста у 5 штаммов видов *Acremonium tubakii*, *Cladosporium cladosporioides*, *Paradendryphiella salina*, *Pseudeurotium hygrophilum* и *Purpureocillium lilacinum* была на среде с крахмалом.
- У 4-х штаммов – *Paradendryphiella salina*, *Simplicillium lamellicola*, *Tolypocladium cylindrosporum* и *T. inflatum* – наибольшая скорость на среде с ламинарией.
- На хитине развивались 8 из 23 штаммов. Рост *Cladosporium salinae*, *Eurpenicillium limosum* на хитине был показан впервые.
- На целлюлозе – 4 штамма *Fusarium culmorum*, *Mucor hiemalis*, *Paradendryphiella salina* и *Tolypocladium cylindrosporum*.
- На кератине – 4 штамма *Acremonium tubakii*, *P. salina*, *Penicillium solitum*, *Purpureocillium lilacinum*. Из них два последних могли разлагать как хитин, так и кератин, что для *P. solitum* ранее не было известно.

Количество КОЕ грибов, тыс./г после аэробной инкубации в донных грунтах с разными субстратами (1% от массы грунта) через 90 суток



Жизнеспособность и изменение числа КОЕ штаммов грибов при инкубации в донных грунтах

- Все изученные 11 штаммов сохраняли свою жизнеспособность после 3х-месячной **аэробной** инкубации в морских отложениях при температуре +5°C.
- У 9 штаммов видов *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Leucosporidium scottii*, *Paradendryphiella salina*, *Penicillium roqueforti*, *P. solitum*, *Simplicillium lamellicola*, *Talaromyces variabilis*, *Tolypocladium cylindrosporum* и *T. inflatum* было обнаружено 3–4х-кратное увеличение числа КОЕ/г в грунте с оптимальным субстратом. У первых двух и видов *P. roqueforti* и *P. solitum* – 2х-кратное увеличение на среде без добавок.
- В случае *P. salina*, *P. solitum*, *T. inflatum*, наблюдали даже обильный рост мицелия в грунте и на его поверхности в морской воде.
- Для 6 из 11 штаммов наиболее предпочтительным для развития в грунте была добавка крахмала, для 2-х (*S. lamellicola*, *T. variabilis*) глюкоза, для 3-х штаммов (*C. infirmominiatum*, *F. culmorum*, *T. cylindrosporum*) – фрагментов таллома ламинарии.

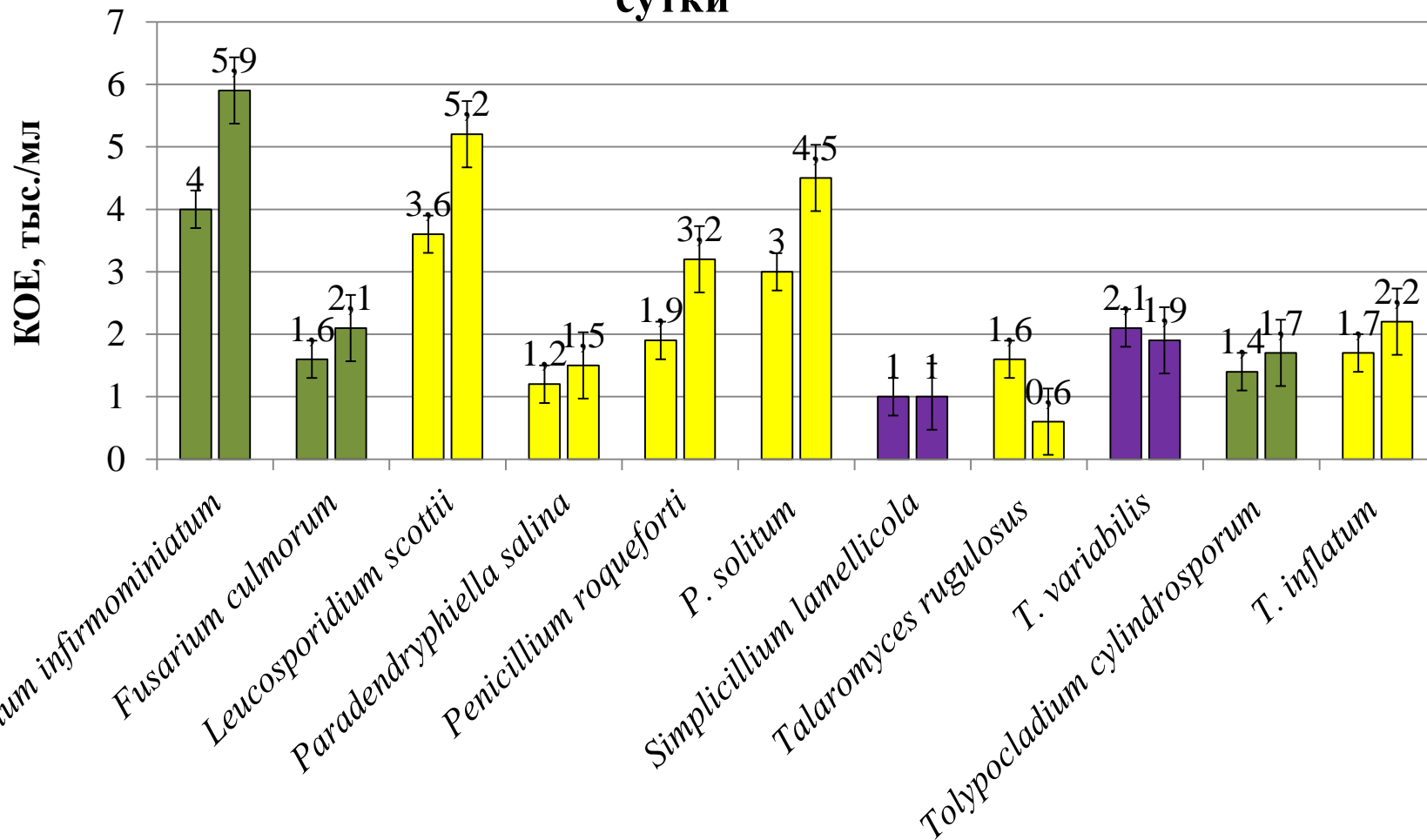


Мицелий *P. solitum* на поверхности грунта в морской воде



Мицелий *P. salina* в воде над грунтом

Количество КОЕ, тыс./г после анаэробной инкубации в донных
грунтах с оптимальным субстратом (1% по массе) на 1 и 21
сутки



- Число КОЕ большинства (8 из 11) изученных штаммов достоверно не изменилось в грунте после анаэробной инкубации в течение 21 суток, в грунте наблюдали мицелий.
- Для штаммов *Talaromyces rugulosus* и *T. variabilis* отмечено падение числа КОЕ в грунте после анаэробной инкубации (для второго – почти трёхкратное).
- Штаммы дрожжевых грибов *Cystofilobasidium infirmominiatum* и *Leucosporidium scottii*, как и в опыте с инкубацией на чашках Петри, продемонстрировали достоверный рост числа КОЕ в анаэробных условиях.



Рис. 16. Гифы *Fusarium culmorum* в анаэробных условиях в донном грунте с добавлением крахмала (1%) (увеличение x1000).

Оценили способность 11 штаммов микромицетов разрушать нефть при низких температурах в условиях в морской по содержанию NaCl (25‰) воде. Суспензию спор и фрагментов мицелия вносили в воду, загрязненную нефтью в концентрации 1% и инкубировали при +5°C в течение 30 суток.



Ни один из 11 морских штаммов различных видов (*C. cladosporioides*, *C. salinae*, *F. culmorum*, *M. hiemalis*, *P. salina*, *P. roqueforti*, *P. solitum*, *S. lamellicola*, *T. cylindrosporum*, *T. inflatum*, *U. longicollis*), выделенных из донных грунтов, не продемонстрировал способности к разложению нефти в таких жестких условиях, нефтяная пленка на воде никак не изменилась. Это указывает на опасность нефтяных разливов в Арктике и необходимость поиска эффективных приемов их биоремедиации.

Физиологические характеристики морских штаммов разных видов

Вид/штамм	Глубина отбора образцов, м	Условия роста			
		Темп. диапазон и оптимум, °С	Концентрации NaCl и оптимум, ‰	Аэробные (А) или аэробные и анаэробные (АН)	Питательные субстраты (наиболее оптимальный из них)*
<i>Acremonium tubakii</i> 34а-лит-1мл-1-25°С	Литораль	10–35 (25)	0–50 (0)	А	С, К, Л, КРТ (К)
<i>Cladosporium cladosporioides</i> Ан-20-3-САМВ-к23	20	5–35 (20)	0–50 (0)	А/АН	С, К, Л, Х, (К)
<i>C. halotolerans</i> 216	10	5–30 (20)	н/д (до 20%)	А	С, К, Л
<i>C. salinae</i> 65ст9-1мл-1-50°С	87,5	5–30 (20)	0–50 (30)	А/АН	С, Л, К, Х (С, К)
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> Бор25-2СА-10	0,25	5–25(10)	н/д (до 10%)	А/АН	С, Л, К, Гл (Л)
<i>Eupenicillium limosum</i> 54Ст24-з-к2-25°С	240	10–35 (30)	0–50 (0)	А	С, Л, К, Х, Ц (С)
<i>Fusarium culmorum</i> Ан-лтр-песк-2-рк43	20	5–35 (20)	0–50 (25)	А/АН	С, Л, К (С, Л)
<i>Lecanicillium muscarium</i> 43ан-20м-1кап-1	20	10–30 (25)	0–50 (25)	А/АН	С, Л, К (С)
<i>Leucosporidium scottii</i> Бор25-3СА-25	0,25	-1—+25 (5)	н/д	А/АН	С, Л, К, Гл (К)
<i>Memnoniella dichroa</i> 17а-лит-1кап-1	Литораль	10–35 (20)	0–50 (25)	А	С, Л, К, Х (С)
<i>Mucor hiemalis</i> 90а-30-1мл-2-5°С	30	5–25 (25)	0–50 (25)	А/АН	С, Л, К, Ц (С)

На основе данных о физиологических свойствах и динамике их численности изученных штаммов в грунтах были определены виды грибов, которые могут обитать в морских грунтах Белого моря.

Физиологические характеристики морских штаммов разных видов

<i>Paradendryphiella salina</i> №21а-30-СА-5°С	30	5–30 (20)	0–50 (25)	А/АН	С, Л, К, Х, КРТ, Ц (Л, К)
<i>Penicillium roqueforti</i> 17а- ЛИТ-0,5мл-2-25°С	Литораль	5–35 (15)	0–50 (25)	А/АН	С, К (С, К)
<i>P. solitum</i> 73аН-ПОМ-1к	Литораль	5–35 (15)	0–50 (25)	А/АН	С, Л, К, Х, КРТ (К)
<i>Pseudeurotium hygrophilum</i> 7а-20м-1кап-2	240	10–30 (25)	0–50 (0)	А	С, Л, К (К)
<i>Purpureocillium lilacinum</i> 55СТ-24-3-к2-25°С	20	10–35 (25)	0–50 (50)	А/АН	С, Л, К, Х, КРТ (К)
<i>Simplicillium lamellicola</i> 9V20 крах	20	10–30 (15)	0–50 (25)	А/АН	С, Л, К, Гл (Л, Гл)
<i>Talaromyces diversus</i> 74а-10- 4к-25°С	10	15–35 (25)	0–50 (0)	А	С, К (С)
<i>T. rugulosus</i> 76а-20-1к-25°С	20	5–35 (30)	0–50 (25)	А/АН	С, К (С, К)
<i>T. variabilis</i> 84а-20-3-1-25°С	20	5–35 (30)	0–50 (25)	А/АН	С, К, Гл (С, Гл)
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> 60аН-10м-2кап-1	10	5–35 (25)	0–50 (0)	А/АН	С, Л, К, Ц (Л, Гл)
<i>T. inflatum</i> 65аН-20м-4к	20	5–30 (25)	0–50 (25)	А/АН	С, Л, К, Х (Л, К, Гл)
<i>Umbelopsis longicollis</i> 44аН- 20м-1кап-1	20	5–30 (25)	0–50 (25)	А/АН	С (С)

Выводы

- Показатели содержания органического углерода, общего азота и фосфора, отношения C/N и слабокислого значения pH в изученных нами пробах донных грунтах характерны для шельфовой зоны Белого и Карского морей. Такая обеспеченность грунтов основными питательными элементами аналогична их уровню в подзолистых почвах, т.е. невысокая, но может поддерживать функционирование грибов.
- Микобиота арктического льда океана в районе Северного полюса представлена почти исключительно осмо-, ксеро-, психротолерантными и психрофильными видами базидиомицетных дрожжей – *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Leucosporidium scottii*, *L. yakuticum*, *Vishniacozyma victoriae* и аскомицетами *Debaryomyces hansenii*. Их численность лежала в диапазоне 3–10 тыс. КОЕ/мл льда. Изоляты мицелиальных грибов (родов *Cladosporium*, *Penicillium*) обнаружены только на поверхности ледового покрова и были единичными.
- Из 215 штаммов 73 видов микроскопических мицелиальных и дрожжевых грибов (коллекция кафедры микологии и альгологии МГУ) было отобрано 23 штамма разных видов, у которых была изучена их жизнеспособность и линейная скорость роста на средах в условиях, сходных с таковыми в морских донных отложениях и после инкубации штаммов непосредственно в грунтах.

- Все штаммы 23 видов были галотолерантными, многие с оптимумами роста на среде с содержанием хлорида натрия как в воде Белого моря, половина из них психротолерантны, и среди них есть группа факультативно-анаэробных видов. Для ряда видов эти физиологические свойства были установлены впервые.
- Половина из них (*Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Leucosporidium scottii*, *Paradendryphiella salina*, *Simplicillium lamellicola*, виды родов *Cladosporium*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Tolypocladium*) показали рост числа КОЕ при 3-х месячной инкубации в грунтах в аэробных условиях, а снижения их плотности популяции при инкубации в анаэробных условиях в течение 3-х недель не было.
- Виды *Eupenicillium limosum*, *Talaromyces diversus*, *Memnoniella dichroa*, не растущие при низких температурах, могут развиваться только в зоне литорали на органических остатках в короткий летний тёплый период. Штамм вида *Umbellopsis longicollis*, не рос ни на одном из изученных субстратов, может развиваться в донных грунтах на небольших глубинах и на литорали, предположительно потребляя специфичный субстрат.
- Виды *Acremonium tubakii*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. halotolerans*, *C. salinae*, *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Fusarium culmorum*, *Leucosporidium scottii*, *Mucor hiemalis*, *Paradendryphiella salina*, *Penicillium roqueforti*, *P. solitum*, *Talaromyces rugulosus*, *T. variabilis*, *Tolypocladium cylindrosporum* и *T. inflatum* по комплексу характеристик можно отнести к наиболее приспособленным к обитанию в донных грунтах на разных глубинах.

A scenic landscape featuring a rocky shoreline in the foreground, a calm body of water in the middle ground, and a dense forest of evergreen trees in the background. The sky is filled with dramatic, dark clouds, suggesting an overcast or stormy day. The text "Спасибо за внимание!" is overlaid in the center of the image.

Спасибо за внимание!