

УДК 574.24 + 579.26

## ВЛИЯНИЕ УГЛЕВОДОРОДНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА СООБЩЕСТВА ГРИБОВ ЛИТОРАЛЬНЫХ ГРУНТОВ БЕЛОГО И БАРЕНЦЕВА МОРЕЙ

© 2024 г. А. Ю. Фадеев<sup>a</sup>, Л. А. Гавирова<sup>a</sup>, М. Л. Георгиева<sup>a, b</sup>, В. В. Козловский<sup>c</sup>,  
У. В. Симакова<sup>d</sup>, А. И. Шестаков<sup>a</sup>, Е. Н. Бубнова<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Биологический факультет Московского государственного университета  
им. М. В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

<sup>b</sup>Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, 119021, Россия

<sup>c</sup>Центр морских исследований Московского государственного университета  
им. М. В. Ломоносова, Москва, 119992, Россия

<sup>d</sup>Институт океанологии им. П. П. Ширшова РАН, Москва, 117997, Россия

\*e-mail: [katya.bubnova@wsbs-msu.ru](mailto:katya.bubnova@wsbs-msu.ru)

Поступила в редакцию 15.07.2023 г.

После доработки 20.09.2023 г.

Принята к публикации 21.10.2023 г.

Проведено исследование влияния углеводородного загрязнения на микобиоту грунтов литорали холодноводных Белого и Баренцева морей. Образцы отбирали в локациях, в разной степени загрязненных нефтепродуктами — от припортовых зон до относительно чистых территорий. Использование среды на дизельном топливе позволило практически во всех исследованных грунтах выявить грибы, способные к разложению углеводородов. Они представляют собой относительно малочисленную группу, в которой наиболее обильными были виды *Penicillium chrysogenum* и *P. brevicompactum*. В то же время сообщества грибов, выделяемые на среде, содержащей сахара, показывали большее разнообразие и численность, а наиболее распространёнными грибами здесь были *Pseudogymnoascus pannorum*, *Penicillium chrysogenum* и *Acremonium fuci*. Важнейшими факторами, влияющими на структуру сообществ грибов, были доля углеводородов от общей массы органического углерода в случае углеводородокисляющих, и локация — в случае сахароразрушающих. В эксперименте наибольшую активность показали представители видов *Penicillium chrysogenum* (снижение концентрации остаточных углеводородов на 77.4%), *Cadophora fastigiata* (72%) и *Tolypocladium inflatum* (67.2%).

**Ключевые слова:** морские грибы, углеводородное загрязнение, арктические моря, углеводород-окисляющие грибы

DOI: 10.31857/S0026365624010051

Загрязнение морских акваторий и литоральных зон нефтепродуктами — одна из распространенных проблем в современном мире (Немировская, 2013). Загрязнение углеводородами (УВ) оказывает сильное воздействие на различных гидробионтов (Андрианов и соавт., 2016), но о его влиянии на морские грибы и их сообщества сведений пока крайне мало. В основном такие исследования связаны с катастрофическими разливами нефти или нефтепродуктов в тропических и субтропических регионах (Sadaba, Sarinas, 2010; Bik et al., 2012; Bovio et al., 2017), и пока только одна подобная работа была сделана в арктических морях (Исакова и соавт., 2023). Данные о связи численности УВ-окисляющих грибов с количеством углеводородов в морской среде противоречивы. С одной стороны, было показано, что в сообществах микобиоты под влиянием загрязнения вследствие разлива большого количества

топлива заметно увеличилась доля УВ-окисляющих штаммов (Bovio et al., 2017). С другой стороны, и численность, и доля УВ-окисляющих грибов в микобиоте в целом снижались по мере увеличения количества углеводородов в грунтах и почвах литорали на участках, в разной степени подверженных постоянной антропогенной нагрузке (Исакова и соавт., 2023). Последнее неожиданно, и, с нашей точки зрения, труднообъяснимо. Метагеномные исследования трансформации сообществ про- и эукариот при нефтяном загрязнении показали, что в таких условиях грибы из минорной могут становиться преобладающей группой: их обилие увеличивается в десятки раз, хотя при этом разнообразие снижается (Bik et al., 2012). Но, в то же время, обнаружено, что после такой трансформации микобиота восстанавливается довольно быстро и через три года уже может вернуться к своему исходному состоянию,

о чем свидетельствуют увеличение как общего видового разнообразия грибов, так и доли минорных видов (Sadaba, Sarinas, 2010).

Способность (зачастую высокая) к окислению как алифатических (АУВ), так и полициклических ароматических (ПАУ) углеводов, входящих в состав нефти и нефтепродуктов, была показана для морских изолятов грибов из различных родов (Артемчук, 1981; Simister et al., 2015; Batista-García et al., 2017; Bovio et al., 2017; Barnes et al., 2018; Maamar et al., 2020; Velez et al., 2020). В качестве активных окислителей УВ указываются, например, *Aspergillus terreus* и *Fusarium solani* (Simister et al., 2015), *A. terreus* и *Penicillium citreonigrum* (Bovio et al., 2017), *P. polonicum*, *P. chrysogenum* и *P. cyclopium* (Maamar et al., 2020). В работе Р. Л. Симистера и соавт. (Simister et al., 2015) было отмечено, что грибы чаще разлагают короткоцепочечные ( $<C_{18}$ ), нежели длинноцепочечные ( $C_{19}$ – $C_{36}$ ) АУВ; линейные  $C_{17}$  и  $C_{18}$  АУВ, нежели разветвленные, а среди ПАУ более подверженными разложению были низкомолекулярные соединения. Однако в других работах изученные штаммы отдавали предпочтение более длинноцепочечным ( $>C_{24}$ ) АУВ (Bovio et al., 2017; Barnes et al., 2018).

В целом, следует отметить, что сведения, как о влиянии УВ загрязнения на сообщества грибов в морских экосистемах, так и об УВ-окисляющей способности выделяемых из этих экосистем штаммов, пока не очень многочисленны и зачастую противоречивы. Кроме того, в арктических морях было проведено пока только одно исследование влияния нефтяного загрязнения на микобиоту литорали Баренцева моря.

Цель работы состояла в изучении и сравнении влияния УВ загрязнения на микобиоту литорали Баренцева и Белого морей, а также УВ-окисляющую активность обитающих здесь грибов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Отбор образцов.** Материалами нашего исследования послужили 30 образцов грунта средней литорали, собранных в начале августа 2020 года в 10 точках на Белом (3 в городе Кандалакша и 3 в его окрестностях; 4 в окрестностях ББС — Беломорской биостанции им. Н. А. Перцова в Кандалакшском заливе) и в 5 точках на Баренцевом море (2 в городе Мурманск и 3 — в поселке Териберка и окрестностях), по 2 образца в каждой точке (представлены далее в табл. 1). Образцы отбирали из верхних 2 см грунта, в локациях, в разной степени загрязненных углеводородами: от припортовых зон Мурманска и Кандалакши — до удаленных от крупных населенных пунктов относительно “чистых” участков в районе природного заказника (ББС) и поселка Териберка. Впоследствии для каждой точки определяли гранулометрический состав

и соленость грунта, содержание АУВ и ПАУ, а также  $C_{орг}$  — массовую долю органического углерода от общей массы осадка и долю УВ от  $C_{орг}$  — массовую долю углеводов от общей массы органического углерода. Первые два показателя были определены самостоятельно, остальные — в лаборатории отдела современных и древних осадков и взвеси Мирового океана Института океанологии им. П. П. Ширшова РАН (Москва, Россия).

**Определение видового состава грибов.** Для определения видового состава грибов в образцах использовали метод комочков на агаризованных питательных средах: сусло-агар (Malt Extract Agar — MEA: на 1 л — 2 г общего содержания сахаров, при расчете разведения исходного ячменно-солодового концентрата, ТУ 9185-020-93454900-12; 20 г соли морской для аквариумов Red Sea Salt, “RS”, Израиль; 15 г агара) и дизель-агар (Diesel Oil Agar — DOA: на 1 л — 10 мл дизельного топлива зимнего, добавляли после стерилизации; 20 г соли морской для аквариумов Red Sea Salt, “RS”, Израиль; 15 г агара). В среды добавляли антибиотик цефатоксим, 0,8 г/л. Для посевов брали по 0,1 г грунта от каждого образца на каждую среду и стерильным шпателем равномерно распределяли его по поверхности среды; инкубировали при 8°C (MEA), 8 и 25°C (DOA) в течение 4–6 недель.

По окончании инкубации выделяли чистые культуры мицелиальных грибов для идентификации. Первичную идентификацию проводили по морфолого-культуральным признакам. Для уточнения таксономического положения ряда изолятов применяли молекулярно-генетические методы. Геномную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора LumiPure from AnySample (“Lumiprobe”, Германия), согласно приложенному протоколу. Для проведения ПЦР использовали праймеры ITS1F и ITS4R (Simister et al., 2015). Секвенирование ПЦР-продукта после очистки с помощью ацетата аммония (0,125 М) и 80% спирта проводили в компании “Синтол” (Москва, Россия). Полученные хроматограммы обрабатывали в программе CodonCode Aligner. Последовательности сравнивали с GenBank (Benson et al., 2017) с помощью алгоритма BLAST (Altschul et al., 1990). Пороговое значение сходства для идентификации на видовом уровне было принято равным 99%. Синонимии и актуальное положение всех идентифицированных таксонов приводили в соответствие с данными в базе MycoID (<https://www.mycobank.org/page/>). Последовательности ITS1-5.8S-ITS2 67 изолятов депонированы в GenBank, им присвоены номера OR269188-OR269254.

**Определение углеводородокисляющей активности выделенных грибов.** Для определения углеводородокисляющей (УВО) активности, отобрали 11 чистых культур разных видов из числа тех, которые первично были выделены на среду DOA. Это были изоляты факультативных морских грибов: *Acrostalagmus*

*luteoalbus*, *Penicillium brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. glabrum*, *Tolypocladium inflatum*, *T. tundrense* из Белого моря и *Cadophora fastigiata* и *C. malorum* из Баренцева; а также — изоляты облигатных морских грибов: *Acremonium fuci* и *Paradenryphiella arenariae* из Белого и *Asteromyces cruciatus* из Баренцева морей. Культивирование проводили в трех повторностях в колбах со 100 мл модифицированной среды Чапека (на 100 мл: 1 мл дизельного топлива зимнего, добавляли в колбы после стерилизации; 0.2 г NaNO<sub>3</sub>; 0.1 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.05 г MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0.05 г KCl; 2 г соли морской для аквариумов Red Sea Salt, “RS”, Израиль; 0.1 мл Tween 80). В качестве контроля использовали ту же среду, без инокуляции культурами. Колбы инкубировали на орбитальном шейкере Innova 43R (“New Brunswick Scientific”, США) при температуре 8°C и 130 об./мин в течение пяти недель. Экстракцию углеводов нефти гексаном проводили в соответствии со стандартом (ГОСТ Р 52406-2005, ISO 9377-2:2000). Элюат высушивали и взвешивали на аналитических весах вместе с тарой, также взвешивали тару отдельно и высчитывали массу остаточных углеводов (ОУВ). Процент биотического вклада в убыль углеводов рассчитывали по формуле:  $100 \times (M_{\text{ОУВ контроль}} - M_{\text{ОУВ образец}}) / M_{\text{ОУВ контроль}}$ .

**Определение видового разнообразия.** Для определения видового разнообразия рассчитывали индекс Шеннона (Magurran, 1988). Для первичного

исследования связей структуры микобиоты с известными параметрами среды (Jongman et al., 1999) применяли анализ соответствий (Correspondence Analysis — CA). Расчет различий таксономического состава микобиоты географических точек проводили с использованием индекса Брея-Кёртиса (Jongman et al., 1999). На основании полученных матриц различий проводили ординацию методом неметрического многомерного шкалирования (Multidimensional Scaling — nMDS) для выявления общих тенденций в распределении сообществ (Jongman et al., 1999). Для проверки правильности группировки вариантов была проведена проверка неслучайности группировки объектов (Analysis of Similarities — ANOSIM); пороговым уровнем значимости, ниже которого группировка считалась неслучайной, принимали равным 5% (Clarke, Warwick, 2001). Были проверены объединения вариантов в следующие группы: 1) по признаку локации (Кандалакша и окрестности; ББС и окрестности; Мурманск; Териберка и окрестности); 2) по типу грунта (песок без ила; песок слабозаиленный; ил с песком); 3) по уровню солености, psu (около 5; около 15; 20–25); 4) по содержанию АУВ, мкг/г (10–30; 50–75); 5) по содержанию ПАУ, нг/г (0; 0–500; 800–5000; более 5000); 6) по содержанию C<sub>орг</sub>, % (менее 0.1, 0.1–0.2, более 0.2); 7) по доле УВ от C<sub>орг</sub>, % (около 1; 1.5–2.5; более 2.8). Оценку вклада отдельных видов во внутривидовое сходство и выявление индикационных видов

**Таблица 1.** Характеристики отобранных образцов

Показатели	Баренцево море					Белое море									
	Мурманск		Териберка			Кандалакша					ББС				
	BS-01	BS-02	BS-03	BS-04	BS-05	WS-01	WS-02	WS-03	WS-04	WS-05	WS-06	WS-07	WS-08	WS-09	WS-10
Географическое положение															
Северная широта (°)	68.99	68.99	69.16	69.17	16.17	67.07	67.03	64.15	67.13	67.12	67.13	66.55	66.55	66.55	66.54
Восточная долгота (°)	33.05	33.05	35.13	35.14	35.17	34.40	32.32	32.40	34.43	32.47	32.41	33.10	33.10	33.07	33.13
Соленость и тип грунта															
Соленость (psu)	13.3	13.1	11.9	20	23.7	13.8	13.5	6.1	5.2	12.3	10.9	22.3	23.2	23.2	24.8
Тип грунта	3	3	2	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2
Параметры углеводородного загрязнения															
АУВ (мкг/г)	53.87	70.09	50.48	15.89	12.37	16.62	23.80	27.06	16.72	17.74	27.27	11.95	30.60	16.75	15.66
ПАУ (нг/г)	121500	141200	3750	310	480	820	0	150	260	110	4680	360	0	170	0
C <sub>орг</sub> (%)	0.130	0.182	0.150	0.075	0.042	0.164	0.334	0.080	0.104	0.034	0.040	0.115	0.265	0.252	0.157
Доля УВ от C <sub>орг</sub> (%)	3.56	3.45	2.89	1.82	2.53	0.87	0.61	2.91	1.38	4.49	5.86	0.89	0.99	0.57	0.86
Полученные количественные характеристики микобиоты															
Число колоний	41/6	42/10	30/7	9/1	4/2	63/14	77/5	38/9	20/9	18/7	35/5	49/15	46/9	7/6	37/6
Число морфотипов	8/3	9/5	13/5	3/1	3/2	20/5	20/4	14/7	8/6	8/5	13/4	13/6	13/1	4/5	6/2
Индекс Шеннона	1.8/0.9	1.8/1.4	2.1/1.5	0.7/0	1.1/0.7	2.6/1.2	2.6/1.3	2.3/3.1	1.7/1.7	1.8/1.5	2.4/1.3	2.1/1.2	2.3/0	1.3/1.6	1.5/0.7

Примечание. Тип грунта: 1 — песок; 2 — песок слабозаиленный; 3 — ил с песком. Данные о присутствии грибов (число колоний и число морфотипов) и значениях индекса разнообразия Шеннона приводятся отдельно по разным средам (MEA/DOA).

проводили с помощью процедуры SIMPER. Для расчетов использовали программу PRIMER v6 (Clarke, Warwick, 2001).

**Статистическая обработка результатов.** При выделении чистых культур грибов на каждой чашке подсчитывали число колоний каждого морфотипа, в дальнейшем суммировали результаты, полученные по двум образцам в каждой точке, и вычисляли обилие каждого морфотипа в каждой географической точке как отношение числа его колоний к общему числу колоний, выраженное в процентах. Во всех дальнейших расчетах использовали этот показатель.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Численность выделенных грибов.** Из навески одного образца массой 0.1 г выделялось 1–52 колонии на среде MEA и 0–8 колоний на среду DOA, или суммарно от 4 до 77 колоний на MEA и от 0 до 15 колоний на DOA из каждой географической точки (табл. 1). В пересчете на 1 грамм это дает десятки–сотни пропагул грибов. В целом, такой порядок численности характерен для грунтов холодноводных морей (Бубнова, Коновалова, 2018; Bubnova et al., 2020; Исакова и соавт., 2023), хотя в некоторых случаях численность может быть на порядок выше (Khusnullina et al., 2018). Ранее отмечалось, что чем ниже заиление, тем ниже содержание пропагул грибов в грунте (Bubnova et al., 2020). В данном случае также из песчаных не заиленных грунтов выделялось наименьшее число колоний грибов на обе среды. Еще одной особенностью исследованных образцов явилось то, что во всех случаях на среду DOA выделялось грибов меньше, чем на среду MEA (табл. 1). Это было ожидаемо, и мы связываем с неспособностью части грибов использовать УВ в качестве единственного источника питания, а также с возможным токсическим действием УВ на часть штаммов (Bovio et al., 2017; Maamar et al., 2020). В то же время в недавнем исследовании микобиоты побережья Баренцева моря, во многих случаях была обнаружена более высокая численность УВ-окисляющих грибов, а также увеличение их доли в сообществе при уменьшении содержания углеводов в среде (Исакова и соавт., 2023).

**Общее разнообразие микобиоты.** Всего из всех посево́в мы выделили представителей 88 морфотипов мицелиальных грибов, из которых 66 идентифицировали до вида по морфологическим или генетическим критериям, а оставшиеся 22 — до уровня рода, или выше по генетическим критериям (табл. 2). Обнаружены представители только двух отделов: *Mucoromycota* — 3 морфотипа и *Ascomycota* — все остальные. Наиболее многочисленными были представители классов *Sordariomycetes* (всего 235 колоний в 24 образцах), *Eurotiomycetes* (191 колония в 29 образцах) и *Leotiomycetes* (142 колоний в 18 образцах); представители класса *Dothideomycetes* были более

редкими (40 колоний в 17 образцах). Наиболее разнообразными были классы *Sordariomycetes* (46 морфотипов) и *Dothideomycetes* (18 морфотипов). Высокое обилие эврициевых обусловлено высокой представленностью рода *Penicillium*: в общей сложности 190 колоний восьми его видов были обнаружены во всех точках отбора, в 29 образцах. Также очень заметной группой был род *Acremonium*: 100 колоний десяти его морфотипов также обнаружены во всех точках, но в 21 образце. Из видов чаще других встречались *Penicillium chrysogenum* (107 колоний в 23 образцах из 14 точек), *Pseudogymnoascus pannorum* (89 колоний в 10 образцах из 9 точек) и *Acremonium fuci* (66 колоний в 15 образцах из 12 точек). Остальные морфотипы встречались реже и менее обильно, многие — единично. Подобная структура микобиоты в целом характерна для грунтов холодноводных морей. Класс *Eurotiomycetes* зачастую бывает наиболее многочисленным и/или разнообразным, именно за счет рода *Penicillium* (Бубнова, Коновалова, 2018; Khusnullina et al., 2018; Luo et al., 2020; Исакова и соавт., 2023). Большую численность и разнообразие представителей сордариевых и леоциевых, также как и дотидеевых, ранее отмечали для грунтов разных арктических морей (Khusnullina et al., 2018; Bubnova et al., 2020; Luo et al., 2020). И также во многих случаях высокое разнообразие этих групп выявлялось молекулярными методами, причем даже их использование не всегда помогало установить принадлежность исследуемых культур к каким-то видам, а только к категориям более высокого ранга (Rämä et al., 2017; Luo et al., 2020), как и в нашем случае. Большинство обнаруженных нами видов известны не только из морских, но и из наземных экосистем. Обязатно морскими являются только четыре: *Acremonium fuci*, *Asteromyces cruciatus*, *Paradendryphiella arenariae*, *P. salina*. Из этих четырех *A. cruciatus* был впервые обнаружен нами в арктических морях, а остальные довольно обычны здесь (Rämä et al., 2017). Кроме *A. cruciatus*, еще 11 видов ранее не были известны в арктических морях (табл. 2), все они выделялись небольшим числом колоний, чаще — единичными, из отдельных образцов.

**Особенности комплексов грибов, выделявшихся на разные среды.** Как уже было отмечено, численность грибов, выделяемых на среду DOA ниже выделяемых на среду MEA. Различия в видовом составе и структуре сообществ также существенны. В общей сложности на DOA выделились представители 44 морфотипов, из которых только 19 были уникальными для этого типа среды; на MEA выделились представители 69 морфотипов грибов, из которых 44 были уникальными; 25 морфотипов выделялись на оба варианта среды (табл. 1 и 2). Заметим, что все виды, уникальные для среды DOA и большинство видов, уникальных для MEA, выделялись единичными колониями, составляя минорный компонент сообщества. Наиболее представленными видами, с суммарным обилием выше 10%, в сообществах, выделявшихся на DOA,

Таблица 2. Таксономическое разнообразие исследованной микобиоты

MUCOROMYCOTA	
<i>Mucoromycetes</i>	<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer (3/0), <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill. (8/0)
<i>Umbelopsidomycetes</i>	<i>Umbelopsis ramanniana</i> (Möller) W. Gams (3/0)
ASCOMYCOTA	
<i>Incertae sedis</i>	<i>Ascomycota</i> i.s.* (1/0), <i>Pezizomycotina</i> i.s.* (1/0)
<i>Dothideomycetes</i>	<i>Capnodiales</i> i.s.* (1/0), <i>Dydimellaceae</i> i.s. 1* (1/2), <i>Dydimellaceae</i> i.s. 2* (1/0), <i>Sympoventuriaceae</i> i.s.* (0/1) <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. (1/0), <i>A. chlamydospora</i> Mouch.* (0/1), <i>A. phragmospora</i> Emden* (0/1), <i>Alternaria</i> i.s.* (1/0), <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud (2/0), <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries (2/1), <i>C. sphaerospermum</i> Penz. (5/0), <i>Cladosporium</i> i.s. (1/0)*, <i>Juxtiphoma eupyrena</i> (Sacc.) Valenz.-Lopez, Crous, Stchigel, Guarro & Cano* (1/1), <i>Paradendryphiella arenariae</i> (Nicot) Woudenb. & Crous (11/1), <i>P. salina</i> (G. K. Sutherl.) Woudenb. & Crous (2/0), <i>Paraphoma fimeti</i> (Brunaud) Gruyter, Aveskamp & Verkley* (0/1), <i>Paraphoma</i> i.s.* (1/0), <i>Phoma</i> i.s.* (0/1)
<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx (22/0), <i>P. brevicompactum</i> Dierckx (16/16), <i>P. chrysogenum</i> Thom (73/34), <i>P. citrinum</i> Thom (6/1), <i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling (8/3), <i>P. lanosum</i> Westling (6/2), <i>P. simplicissimum</i> (Oudem.) Thom (0/2), <i>P. thomii</i> Maire (1/0), <i>Phialophora verrucosa</i> Medlar (0/1)
<i>Leotiomycetes</i>	<i>Helotiales</i> i.s.* (1/0), <i>Asteromyces cruciatus</i> C. Moreau & Moreau ex Hennebert (2/1), <i>Cadophora fastigiata</i> Lagerb. & Melin (21/2), <i>C. malorum</i> (Kidd & Beaumont) W. Gams (9/4), <i>C. luteo-olivacea</i> (J.F.H. Beyma) T. C. Harr. & McNew* (6/3), <i>Pseudeurotium hygrophilum</i> (Sogonov, W. Gams, Summerb. & Schroers) Minnis & D. L. Lindner (2/0), <i>Pseudoeurotium</i> i.s.* (0/1), <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (Link) Minnis & D. L. Lindner (88/1), <i>Thelebolus</i> i.s.* (1/1)
<i>Saccharomycetes</i>	<i>Dipodascus geotrichum</i> (E. E. Butler & L. J. Petersen) Arx (2/1)
<i>Sordariomycetes</i>	<i>Sordariomycetes</i> i.s.* (1/0), <i>Hypocreales</i> i.s.* (1/0), <i>Hypocreomycetidae</i> i.s.* (1/0), <i>Sordariomycetidae</i> i.s.* (1/0) <i>Acaulium acremonium</i> (Delacr.) Sand.-Den., Guarro & Gené (3/0), <i>Acremonium alternatum</i> Link* (0/1), <i>A. byssoides</i> W. Gams & T. M. Lim (1/0), <i>A. fuci</i> Summerb., Zuccaro & W. Gams (61/5), <i>A. masseei</i> (Sacc.) W. Gams* (3/0), <i>A. murorum</i> (Corda) W. Gams (10/3), <i>A. rutilum</i> W. Gams (11/0), <i>A. sclerotigenum</i> (Moreau & R. Moreau ex Valenta) W. Gams* (1/0), <i>Acremonium</i> i.s. 1* (2/0), <i>Acremonium</i> i.s. 2 (0/1), <i>Acremonium</i> i.s. 3 (1/0), <i>Acrostalagmus luteoalbus</i> (Link) Zare, W. Gams & Schroers (21/1), <i>Akanthomyces lecanii</i> (Zimm.) Spatafora, Kepler & B. Shrestha (2/0), <i>Cephalotrichum microsporium</i> (Sacc.) P. M. Kirk (1/0), <i>C. nanum</i> (Ehrenb.) S. Hughes (9/0), <i>C. stemonitis</i> (Pers.) Nees (1/0), <i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams (1/0), <i>Cordyceps farinosa</i> (Holmsk.) Kepler, B. Shrestha & Spatafora (1/1), <i>Cylindrocarpon</i> i.s.* (1/0), <i>Dialonectria ullevolea</i> Seifert & Gräfenhan* (1/0), <i>Emericellopsis maritima</i> Beliakova* (0/1), <i>Fusarium oxysporum</i> Shtldl. (3/0), <i>F. acuminatum</i> Ellis & Everh.* (1/1), <i>Fusarium</i> i.s. (1/2), <i>Gibellulopsis nigrescens</i> (Pethybr.) Zare, W. Gams & Summerb. (0/1), <i>Ilyonectria</i> cf. <i>destructans</i> (Zinssm.) Rossman, L. Lombard & Crous (1/0), <i>Lasionectriopsis</i> cf. <i>pteridii</i> (W. Gams & J. C. Frankland) Lechat & P.-A. Moreau (0/1), <i>Lecanicillium psalliotae</i> (Treschew) Zare & W. Gams (0/3), <i>Microdochium lycopodium</i> (Jaklitsch, Siepe & Voglmayr) Hern.-Restr. & Crous* (1/0), <i>Nectria ramulariae</i> (Wollenw.) E. Müll. (4/1), <i>Neonectria candida</i> (Ehrenb.) Rossman, L. Lombard & Crous* (0/1), <i>N. lugdunensis</i> (Sacc. & Therry) L. Lombard & Crous* (2/0), <i>Papulaspora immersa</i> Hotson (6/0), <i>Plectosphaerella cucumerina</i> (Lindf.) W. Gams* (1/0), <i>Sarocladium kiliense</i> (Grütz) Summerb. (0/1), <i>S. strictum</i> (W. Gams) Summerb. (4/1), <i>Thelonectria olida</i> (Wollenw.) P. Chaverri & Salgado* (0/2), <i>Tolypocladium cylindrosporium</i> W. Gams (7/1), <i>T. inflatum</i> W. Gams (8/8), <i>T. tundrense</i> Bissett (0/1), <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1/0), <i>Wardomyces ovalis</i> W. Gams (23/0)

Примечание. Звездочкой (\*) отмечены таксоны, верифицированные с помощью молекулярных методов; подчеркнуты таксоны, впервые обнаруженные в арктических морях; в скобках за каждым видом — число колоний, суммарно выделенных на разные среды (MEA/DOA).

были *P. chrysogenum* и *P. brevicompactum*; в сообществах, выделявшихся на МЕА — *Pseudogymnoascus pannorum*, *Penicillium chrysogenum* и *Acremonium fuci*. Индексы разнообразия Шеннона (табл. 1) для сообществ, выделявшихся на DOA, варьировали от 0 до 3.1 (среднее — 1.2); для МЕА — от 0.7 до 2.6 (среднее — 1.9). За исключением одной точки в Белом море, во всех остальных локациях индекс Шеннона был выше для сообществ, выделявшихся на МЕА, по сравнению с сообществами, выделяемыми на DOA. В целом мы можем констатировать, что сообщество грибов, выделяемое на среду с дизелем, можно рассматривать как обеднённое и реструктурированное сообщество грибов, выделяемых на среду МЕА. Анализ с помощью nMDS и проверка уровня значимости фактора использованной для выделения среды по ANOSIM, показала, что он чрезвычайно высоко значим (0.1%).

**Связь структуры микобиоты с параметрами среды.** Итак, исходно мы предполагали наличие 7 возможных группировок сообществ грибов в соответствии с влиянием семи различных факторов среды (локация, тип грунта, уровень солёности, содержание АУВ, ПАУ,  $C_{орг}$  и доля УВ от  $C_{орг}$ ). Проведенные анализы показали, что для сообществ грибов, выделявшихся на DOA, единственным значимым фактором была доля УВ от  $C_{орг}$ , а для сообществ грибов, выделявшихся на МЕА — локация; все остальные предполагаемые группировки были не достоверны (табл. 3).

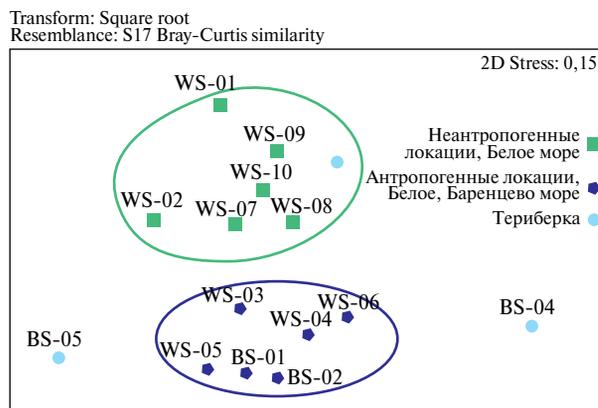
Интересно, что, кроме доли УВ от  $C_{орг}$  в случае DOA, другие факторы, связанные с нефтяным загрязнением (содержание АУВ и ПАУ), имеют очень слабое влияние на структуру микобиоты. Мы предполагаем, что это может быть обусловлено тем, что имеющиеся в наших образцах концентрации этих веществ не настолько высоки, чтобы оказывать существенное ингибирующее действие

**Таблица 3.** Уровень значимости объединения по ANOSIM для сообществ грибов, выделенных на разных средах

Фактор среды	Уровень значимости по ANOSIM, %	
	DOA*	МЕА
Локация	34	2.5**
Тип грунта	12.5	6.6
Солёность, psu	91.5	16
АУВ, мкг/г	33.8	87.3
ПАУ, нг/г	46.5	56.4
$C_{орг}$ , %	39.2	32.1
Доля УВ от $C_{орг}$ , %	0.3**	34.9
“Антропоген”	2.3**	0.1**

\* DOA — для сообществ, выделенных на среде с дизелем; МЕА — для сообществ, выделенных на сусло-агаре.

\*\* Ячейки с уровнем значимости ниже 5%.



**Рис. 1.** Диаграмма многомерного шкалирования (nMDS) для объединенных сообществ грибов по признаку общего антропогенного воздействия (фактор “Антропоген”). WS — образцы с побережья Белого, BS — с побережья Баренцева моря.

на рост грибов, а с другой стороны, — их пищевая доступность для грибов также может не быть связана с их концентрацией в имеющихся пределах. Можно предположить, что они являются фоном, на котором сообщества грибов литорали исследованных локаций существуют постоянно. Возможно, более высокие концентрации, например, при катастрофических разливах смогут заметно повлиять на структуру микобиоты (Sadaba, Sarinas, 2010; Vik et al., 2012) за счет подавления роста одних грибов и селективного стимулирования развития других, способных к утилизации этих соединений.

В ходе проведения первичного анализа соответствия мы предположили существование еще одной группировки, отличной от исходных. Это предположение было основано на формировании на различных вариантах ординационных диаграмм двух групп точек: 1) почти все беломорские точки за пределами города Кандалакша (WS-01 и WS-02 — в окрестностях города и все точки около ББС) и одна точка в Териберке (BS-03); 2) все точки в пределах городов Мурманск (BS-01 и BS-02) и Кандалакша (точки WS-03, WS-04 и WS-06), а также одна точка за пределами Кандалакши (WS-05). При этом две точки, расположенные в Териберке на пляже (BS-04 и BS-05), везде располагаются отдельно, в разных случаях формируя или не формируя общую группу (рис. 1).

Последнее, видимо, связано с тем, что грунт в этом случае песчаный, с заметно отличающейся от остальных локаций существенно обедненной микобиотой. Мы проверили также и данную группировку с помощью nMDS и ANOSIM, предположив существование групп “антропогенные локация”, “неантропогенные локация”, “Териберка пляж”, а фактор, отвечающий за существование данных групп, мы назвали “Антропоген” (рис. 1, табл. 3). Этот фактор оказался значимым для обеих

использованных сред. На наш взгляд, объяснить существование этих двух групп и отделение двух последних локаций можно с точки зрения существования комплекса условий, состоящего из общего антропогенного воздействия крупного населенного пункта (города) и преобладающего влияния типа грунта в последнем случае. Мы не можем количественно оценить данный фактор, но его наличие свидетельствует о том, что на формирование микобиоты в исследованных нами условиях влияет не только уровень УВ загрязнения, но и какие-то неучтенные факторы. Эти факторы, скорее всего, связаны с антропогенным воздействием, загрязнением не только нефтепродуктами, а также, например, тяжелыми металлами, бытовыми и промышленными стоками. Тем не менее уровень нефтяного загрязнения, очевидно, также влияет на формирование сообществ углеводородоокисляющих грибов в исследованных условиях. Последнее подтверждается тем фактом, что средние значения индекса разнообразия для сообществ, выделяемых на среде MEA, выше для неантропогенных локаций, а на среде DOA — для антропогенных (табл. 1). Т.е., в исследованных нами антропогенных локациях возрастает разнообразие сообщества УВ-окисляющих грибов, а в неантропогенных локациях — сообществ сахароразрушающих грибов. Интересно, что ранее сообщалось о несколько другом эффекте: увеличении общего разнообразия сообществ сахаролитических и углеводородоокисляющих грибов в урбанизированных и антропогенно загрязненных районах Кольского полуострова (Исакова и соавт., 2023).

После проведенных анализов, выявления важности комплексного антропогенного воздействия и обнаружения группировки образцов по этому признаку, мы провели сравнительный анализ структуры микобиоты этих групп. С помощью процедуры SIMPER были выявлены виды грибов, определяющие объединение образцов в эти группы: “антропогенные локации” — *A. fuci*, *P. chrysogenum*, *P. arenaria*, *C. fastigiata*, *P. pannorum*, *C. malorum* и *N. ramularia*; “неантропогенные локации” — *P. chrysogenum*, *P. aurantiogriseum*, *T. inflatum*, *P. pannorum*, *A. fuci*, *P. brevicompactum*, *P. lanosum*, *A. luteoalbus*, *W. ovalis* и *A. rutilum*; “Териберка пляж” — *P. chrysogenum* и *P. brevicompactum*. Интересно, что в комплекс определяющих видов антропогенных локаций входят морские виды *A. fuci* и *P. arenaria*, а также виды рода *Cadophora*. В то время как в комплекс определяющих видов для неантропогенных локаций — *T. inflatum* и *P. pannorum* и представители рода *Penicillium* — все обильно спороносящие грибы, обычные в морях, но широко распространенные в самых разных экосистемах. Интересный и пока необъяснимый факт тяготения морских видов к антропогенным локациям. По данным для наземных почв (Марфенина, 2005), можно было ожидать обратной картины, но в данном случае, видимо, мы имеем дело с относительно

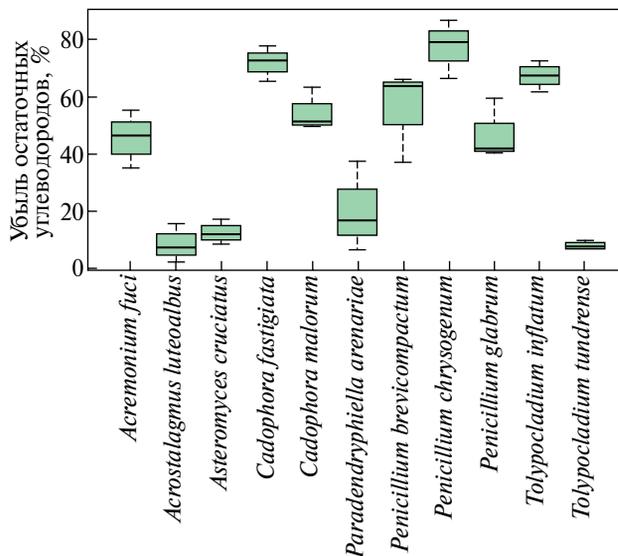


Рис. 2. Убыль остаточных углеводов при росте исследованных изолятов грибов.

невысоким уровнем загрязнения, которое оказывает скорее стимулирующее воздействие на микобиоту, чем угнетающее.

**Углеводородоокисляющая способность выделенных грибов.** При культивировании всех 11 изолятов, принимавших участие в данном эксперименте, была отмечена убыль УВ, хотя и выраженная в разной степени. Наиболее заметную убыль остаточных углеводов показали изоляты *Penicillium chrysogenum*, *Cadophora fastigiata* и *Tolypocladium inflatum*, у которых она составила в среднем 77,4, 72 и 67,2% УВ соответственно (рис. 2).

Согласно стандартам РФ, использованное нами дизельное топливо зимнее, представляет собой депарафинированное (то есть с уменьшенным содержанием алканов длинной  $C > 18$ ) топливо, в котором ароматические углеводороды составляют не более 11% (ГОСТ Р 55475-2013). Исходя из этого, можно предположить, что протестированные нами изоляты обеспечивают убыль в первую очередь короткоцепочечных алифатических УВ. Для представителей рода *Penicillium* во многих работах ранее была показана высокая УВ-окисляющая активность, в том числе и преимущественно по отношению к короткоцепочечным алканам (Davies, Westlake, 1979; Barnes et al., 2018). В литературе есть сведения и о *P. chrysogenum* (Elshafie et al., 2007), и *P. brevicompactum* (Chaîneau et al., 1999). В отношении *T. inflatum*, показавшем высокую активность в нашем эксперименте, ранее было отмечено полное разложение алканов при достаточно низком общем разложении сырой нефти (Davies, Westlake, 1979). Что касается представителей рода *Cadophora*, сведений об их УВ-окисляющей способности нет, так же как и для морских грибов в нашем

эксперименте — *Acremonium fuci*, *Paradenryphiella arenariae* и *Asteromyces cruciatus*. В целом, можно отметить, что более высокую убыль углеводов показали изоляты видов, более обильно представленные в посевах на DOA, чем на MEA.

Итак, мы предприняли попытку исследования влияния углеводородного загрязнения на состав и структуру сообществ углеводородокисляющих и сахароразлагающих грибов литорали Белого и Баренцева морей. Для обеспечения последующего сравнительного анализа мы отбирали образцы в предполагаемо загрязненных локациях (портовые зоны крупных городов на Белом — Кандалакша, и Баренцевом — Мурманск, морях), и в предполагаемо чистых локациях (природный заказник ББС на Белом и окрестности поселка Териберка — на Баренцевом море). Но проведенные анализы содержания УВ показали, что абсолютно чистых локаций среди исследованных нами нет: во всех грунтах в той или иной степени содержатся углеводороды выше фоновых значений. Разница между предполагаемо чистыми и загрязненными локациями заключается только в их концентрации и составляет в большинстве случаев всего 2–4 раза. Таким образом, в исследованных районах Белого и Баренцева морей микобиота находится под влиянием относительно невысокого, но постоянного загрязнения нефтепродуктами. Более высокое содержание УВ в грунтах более загрязненных локаций, видимо, не служит заметным стрессом для грибов и не стимулирует массовое развитие УВ-разрушающей микобиоты в грунтах литорали, о чем также свидетельствует пересекающийся видовой состав грибов, при выделении на среды с дизелем и без него. Из всех рассмотренных нами параметров углеводородного загрязнения единственным значимым оказалась доля УВ в общем органическом углеводе. Из других факторов наиболее значимым был территориальный. Но на микобиоту исследованных грунтов влияют и изначально неучтенные нами параметры, которые удалось выявить статистическими методами, но не удалось идентифицировать. Исходя из полученных нами результатов, стало очевидно, что для определения пределов стрессового воздействия нефтяного загрязнения на микобиоту исследование стабильных природных и антропогенных экосистем Белого и Баренцева моря не подходит. Эти пределы можно будет определить или при катастрофических событиях (например, при авариях и разливах, как было в Онежском заливе Белого моря в 2003 году и в Мексиканском заливе в 2010 году, а также при крупной утечке, которая случилась в порте Витино в Кандалакшском заливе в 2010 году), или же в экспериментальных условиях.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотрудникам аналитической лаборатории отдела современных и древних осадков и взвеси Мирового океана Института океанологии им. П. П. Ширшова РАН и руководителю лаборатории д.г.-м.н. И. А. Немировской за проведение анализов содержания углеводов в образцах и обсуждение их результатов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 20-04-00882а).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреанов В. В., Лебедев А. А., Неверова Н. В., Лукин Л. Р., Воробьева Т. Я., Собко Е. И., Кобелев Е. А., Лисицына Т. Ю., Самохина Л. А., Климов С. И. Долговременные последствия аварийного разлива нефтепродуктов в южной части Онежского залива Белого моря // Биология моря. 2016. Т. 42. № 3. С. 169–178.
- Артемчук Н. Я. Микрофлора морей СССР. М.: Наука, 1981. 192 с.
- Бубнова Е. Н., Коновалова О. П. Разнообразие мицелиальных грибов в грунтах литорали и сублиторали Баренцева моря (окрестности поселка Дальние Зеленцы) // Микология и фитопатология. 2018. Т. 52. № 5. С. 319–327.
- Исакова Е. А., Корнейкова М. В., Мязина В. А. Численность и видовое разнообразие культивируемых микроскопических грибов побережья Баренцева моря // Микология и фитопатология. 2023. Т. 57. № 4. С. 231–246.
- Марфенина О. Е. Антропогенная экология почвенных грибов. М.: Медицина для всех, 2005. 196 с.
- Немировская И. А. Нефть в океане (загрязнение и природные потоки). М.: Научный мир, 2013. 432 с.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.
- Barnes N. M., Khodse V. B., Lotlikar N. P., Meena R. M., Damare S. R. Bioremediation potential of hydrocarbon-utilizing fungi from select marine niches of India // 3Biotech. 2018. V. 8. P. 1–10.
- Batista-García R. A., Kumar V. V., Ariste A., Tovar-Herrera O. E., Savary O., Peidro-Guzman H., Gonzales-Abradelo D., Jackson S. A., Dobson A. D. W., Sanchez-Carbente M. D. R., Folch-Mallol J. L., Leduc R., Cabana H. Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial effluents // J. Environ. Manage. 2017. V. 198. P. 1–11.
- Benson D. A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Sayers E. W. GenBank // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. Iss. D1. P. D67–D72.
- Bik H. M., Halanych K. M., Sharma J., Thomas W. K. Dramatic shifts in benthic microbial eukaryote communities following the Deepwater Horizon oil spill // PloS One. 2012. V. 7. № 6. e38550.

- Bovio E., Gnani G., Prigione V., Spina F., Denaro R., Yakimov M., Calogero R., Crisafi F., Varese G. C. The culturable mycobiota of a Mediterranean marine site after an oil spill: isolation, identification and potential application in bioremediation // *Sci. Total Environ.* 2017. V. 576. P. 310–318.
- Bubnova E. N. Fungal diversity in bottom sediments of the Kara Sea // *Botanica Marina.* V. 53. P. 595–600.
- Bubnova E. N., Grum-Grzhimailo O.A., Kozlovsky V. V. Composition and structure of the community of mycelial fungi in the bottom sediments of the White sea // *Moscow University Biol. Sci. Bull.* 2020. V. 75. № 3. P. 153–158.
- Chaîneau C. H., Morel J., Dupont J., Oudot J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil // *Sci. Total Environ.* 1999. V. 227. № 2–3. P. 237–247.
- Clarke K. R., Warwick R. M. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. 2<sup>nd</sup> edn. Plymouth. UK: PRIMER-E, 2001. 172 p.
- Davies J. S., Westlake D. W.S. Crude oil utilization by fungi // *Can. J. Microbiol.* 1979. V. 25. P. 146–156.
- Elshafie A., AlKindi A.Y., Al-Busaidi S., Bakheit C., Al-bahry S. N. Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman // *Marine Pollut. Bull.* 2007. V. 54. P. 1692–1696.
- Jongman R. H.G., Ter Braak C. J.F., van Tongeren O. F.R. Data analysis in community and landscape ecology. Cambridge University Press, 1995. 324 p.
- Khusnullina A. I., Bilanenko E. N., Kurakov A. V. Microscopic fungi of White Sea sediments // *Contemp. Probl. Ecol.* 2018. V. 11. P. 503–513.
- Luo Y., Luo Z. H., Pang K. L. Diversity and temperature adaptability of cultivable fungi in marine sediments from the Chukchi Sea // *Bot. Marina.* 2020. V. 63. P. 197–207.
- Maamar A., Lucchesi M. E., Debaets S., van Long N. N., Quemener M., Cotton E., Bouderbala M., Burgaud G., Matallah-Boutiba A. Highlighting the crude oil bioremediation potential of marine fungi isolated from the Port of Oran (Algeria) // *Diversity.* 2020. V. 12. P. 196–214.
- Magurran A. E. Ecological diversity and its measurement. Springer-Science and Business Media B. V., 1988. 192 p.
- Rämä T., Hassett B. T., Bubnova E. Arctic marine fungi: from filaments and flagella to operational taxonomic units and beyond // *Bot. Marina.* 2017. V. 60. P. 433–452.
- Sadaba R. B., Sarinas B. G.S. Fungal communities in bunker C oil-impacted sites off southern Guimaras, Philippines: a post-spill assessment of Solar 1 oil spill // *Bot. Marina.* 2010. V. 53. P. 565–575.
- Simister R. L., Poutasse C. M., Thurston A. M., Reeve J. L., Baker M. C., White H. K. Degradation of oil by fungi isolated from Gulf of Mexico beaches // *Mar. Pollut. Bull.* 2015. V. 100. P. 327–333.
- Velez P., Gasca-Pineda J., Riquelme M. Cultivable fungi from deep-sea oil reserves in the Gulf of Mexico: Genetic signatures in response to hydrocarbons // *Mar. Environ. Res.* 2020. V. 153. P. 104816.

## Effect of Hydrocarbon Pollution on the Fungal Communities of the White and Barents Sea Littoral Sediments

A. Yu. Fadeev<sup>1</sup>, L. A. Gavirova<sup>1</sup>, M. L. Georgieva<sup>1, 2</sup>, V. V. Kozlovsky<sup>3</sup>, U. V. Simakova<sup>4</sup>,  
A. I. Shestakov<sup>1</sup>, and E. N. Bubnova<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

<sup>2</sup>Gause Institute for New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

<sup>3</sup>Marine Research Center, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

<sup>4</sup>Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

\*e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru

Received July 15, 2023; revised September 20, 2023; accepted October 21, 2023

**Abstract**—The effect of hydrocarbon pollution on the fungal communities of littoral sediments of the cold-water White and Barents seas was investigated. The samples were collected at locations with different levels of pollution with oil products, from ports to relatively undisturbed areas. Using the diesel fuel-containing medium resulted in detection of hydrocarbon-degrading fungi in almost all studied samples, although in all cases they were less diverse than sugar-degrading fungi. In this relatively small group, *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium brevicompactum* were the most common organisms. Fungal communities isolated on a sugar-containing medium exhibited higher diversity and abundance, with being the most common sugar degraders. The major factors affecting the structure of the fungal communities were the percentage of hydrocarbons in the total mass of organic carbon in the samples in the case of hydrocarbon-degrading fungi and location, for sugar degraders. In the experiment, the highest hydrocarbon-degrading activity was shown for *Penicillium chrysogenum* (the loss of residual hydrocarbons was 77.4%), *Cadophora fastigiata* (72%), and *Tolypocladium inflatum* (67.2%).

**Keywords:** marine fungi, hydrocarbon pollution, Arctic seas, hydrocarbon-degrading fungi