

# БИОРАЗНООБРАЗИЕ И УСТОЙЧИВОЕ РАЗВИТИЕ

Особенности пробоподготовки образцов монадных форм  
микроводорослей для сканирующей электронной микроскопии

РЫЛЬКОВА О. А., БОРОВКОВ А. Б., ХАНАЙЧЕНКО А. Н., ХАРЧУК И. А.,  
ГУДВИЛОВИЧ И. Н., ЛИШАЕВ В. Н.

ТОМ 8  
ВЫПУСК 4  
2023

## БИОРАЗНООБРАЗИЕ И УСТОЙЧИВОЕ РАЗВИТИЕ

*Журнал реферируется Всероссийским институтом научно-технической информации (ВИНИТИ),  
а также Российским индексом научного цитирования (РИНЦ) на базе Научной электронной библиотеки elibrary.ru.*

*Все материалы проходят двойное независимое анонимное рецензирование.*

### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Главный редактор:** Горбунов Роман Вячеславович, д.г.н., ФИЦ ИнБЮМ  
**Заместитель главного редактора:** Довгаль Игорь Васильевич, д.б.н., профессор, ФИЦ ИнБЮМ  
**Ответственный секретарь:** Жукова Юлия Владимировна, ФИЦ ИнБЮМ

**Алекперов Ильхам Хайям оглы**, чл.-корр. НАН Азербайджана, д.б.н., проф., Институт зоологии НАН Азербайджана, Азербайджан

**Василов Раиф Гаянович**, д.б.н., проф., НИЦ «Курчатовский институт»

**Воскресенская Елена Николаевна**, д.г.н., проф., ИПТС

**Давидович Николай Александрович**, д.б.н., ФИЦ ИнБЮМ

**Дмитренко Павел Сергеевич**, д.х.н., ТИБОХ

**Егоров Виктор Николаевич**, академик РАН, д.б.н., проф., ФИЦ ИнБЮМ

**Илюшина Татьяна Владимировна**, д.г.н., проф., МИИГАиК

**Керимов Ибрагим Ахмедович**, д.ф.-м.н., проф., ГГНТУ им. акад. М. Д. Миллионщикова

**Киприянова Лаура Мингалиевна**, д.б.н., ИВЭП СО РАН

**Кузнецов Андрей Николаевич**, д.б.н., Совместный Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр

**Найденко Сергей Валерьевич**, чл.-корр. РАН, д.б.н., проф., ИПЭЭ РАН

**Неврова Елена Леонидовна**, д.б.н., ФИЦ ИнБЮМ

**Ольчев Александр Валентинович**, д.б.н., проф., МГУ им. М. В. Ломоносова

**Плугатарь Юрий Владимирович**, чл.-корр. РАН, д.с.-х.н., НБС — ННЦ РАН

**Полонский Александр Борисович**, чл.-корр. РАН, д.г.н., проф., ИПТС

**Пономарева Елена Николаевна**, д.б.н., проф., ЮНЦ РАН

**Рожнов Вячеслав Владимирович**, академик РАН, д.б.н., ИПЭЭ РАН

**Рындин Алексей Владимирович**, академик РАН, д.с.-х.н., ФИЦ СЦ РАН

**Рябушко Виталий Иванович**, д.б.н., ФИЦ ИнБЮМ

**Сергеева Нелли Григорьевна**, д.б.н., ФИЦ ИнБЮМ

**Солдатов Александр Александрович**, д.б.н., проф., ФИЦ ИнБЮМ

**Черных Дмитрий Владимирович**, д.г.н., доцент, ИВЭП СО РАН

**Широкова Вера Александровна**, д.г.н. проф., ИИЕТ РАН

**Яицкая Наталья Александровна**, к.г.н., ФИЦ СЦ РАН

**Cosenza Carlos Alberto Nunes**, Dr. Sc., Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

**Krykhtine Fabio Luiz Peres**, Dr. Sc., Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

**Mayén-Estrada Rosaura**, PhD, National Autonomous University of Mexico, Mexico

**Pešić Vladimir**, PhD, University of Montenegro, Montenegro

**Ranasinghe Dona Marina Sherine Hemanthi**

**Kariyawasam**, PhD, University of Sri Jayewardenepura, Sri Lanka

**Tapas Chatterjee**, PhD, Dr. Sc., Indian School of Learning, ISM Annexe, India

#### Адрес учредителя, издателя и редакции:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр «Институт биологии  
южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»  
299011, г. Севастополь, пр-кт Нахимова, д. 2.  
Телефон +7 (8692) 54-41-10

#### Соиздатель журнала:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Федеральный исследовательский центр «Субтропический  
научный центр Российской академии наук»  
354002, Россия, Краснодарский край, г. Сочи,  
ул. Яна Фабрициуса, 2/28

E-mail: [biodiversity\\_journal@ibss-ras.ru](mailto:biodiversity_journal@ibss-ras.ru) | Сайт журнала: <https://eco-ibss.ru>

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», 2023

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук», 2023

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр  
«ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ имени А.О. КОВАЛЕВСКОГО РАН»

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Федеральный исследовательский центр  
«СУБТРОПИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

# БИОРАЗНООБРАЗИЕ И УСТОЙЧИВОЕ РАЗВИТИЕ

Выпуск 4(28)

2023

---

Основан в мае 2016 г.

Научный журнал

Выходит 4 раза в год

---

## СОДЕРЖАНИЕ

---

### Биоразнообразие экосистем и его сохранение.

---

*Болтачева Н. А., Ревков Н. К.* Донная фауна бухты Круглая (Черное море, Крым).  
Сообщение III: сезонные изменения макрозообентоса рыхлых грунтов ..... 3–19

### Проблема загрязнения водных экосистем и морская радиохемозэкология

---

*Пионтковский С. А., Минский И. А., Мегер Я. В.* Многолетняя изменчивость биомассы зоопланктона в регионах Мирового океана с различным уровнем нефтяного загрязнения .. 20–33

### Биологические ресурсы, биотехнология и аквакультура

---

*Кожухова Е. В., Макаревич Е. В., Литвинова М. Ю., Балачина Е. С.* Оценка биотрансформирующего потенциала штаммов микроорганизмов, выделенных из Баренцева моря ..... 34–51

*Ткачук А.А., Кладченко Е.С., Андреева А. Ю.* Роль бета-адренорецепторов и аденилатциклазы в процессе адаптации гемоцитов средиземноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis*) к гипоосмотическому стрессу ..... 52–61

*Рылькова О.А., Боровков А.Б., Ханайченко А.Н., Харчук И.А., Гудвилович И.Н., Лишаев В.Н.* Особенности пробоподготовки образцов монадных форм микроводорослей для сканирующей электронной микроскопии ..... 62–74

Federal State Budget Scientific Institution  
Federal Research Center  
«A.O. KOVALEVSKY INSTITUTE OF BIOLOGY OF THE SOUTHERN SEAS OF RAS»  
Federal State Budget Scientific Institution  
Federal Research Center  
«THE SUBTROPICAL SCIENTIFIC CENTRE OF RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES»

# BIODIVERSITY AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT

Issue 4(28)  
2023

---

Established in May 2016

Periodical

Issued 4 times a year

---

## CONTENT

---

### Biodiversity of ecosystems and his protection

---

*Boltachova N. A., Revkov N. K.* **Benthic fauna of the Kruglaya Bay (Black Sea, Crimea). Part III: seasonal variations of macrozoobenthos on soft sediments** ..... 3–19

---

### Problems of pollution of aquatic ecosystems and marine radiochemoecology

---

*Piontkovski S. A., Minsky I. A., Meger Ya. V.* **Long-term variability of zooplankton biomass and oil pollution in some regions of the World Ocean** ..... 20–33

---

### Biological resources, biotechnology and aquaculture

---

*Kozhukhova E. V., Makarevich E. V., Litvinova M. Yu., Balachina E. S.* **Biotransforming potential of microorganisms isolated from the Barents Sea** ..... 34–51

*Tkachuk A. A., Kladchenko E. S., Andreyeva A. Yu.* **The role of the adenylate cyclase signaling pathway in the adaptation of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes to hypoosmotic stress** ..... 52–61

*Rylkova O. A., Borovkov A. B., Khanaychenko A. N., Kharchuk I. A., Gudvilovich I. N., Lishaev V. N.* **Peculiarities of sample preparation of samples of monadic forms of microalgae for scanning electron microscopy** ..... 62–74

БИОРАЗНООБРАЗИЕ ЭКОСИСТЕМ  
ЕГО СОХРАНЕНИЕ

УДК 591.524.11(262.5)“32”

DOI: [10.21072/eco.2023.28.01](https://doi.org/10.21072/eco.2023.28.01)

**ДОННАЯ ФАУНА БУХТЫ КРУГЛОЙ (ЧЁРНОЕ МОРЕ, КРЫМ). СООБЩЕНИЕ III:  
СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МАКРОЗООБЕНТОСА РЫХЛЫХ ГРУНТОВ \***

**Болтачева Н. А., Ревков Н. К.**

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,  
г. Севастополь, Российская Федерация,  
e-mail: [nboltacheva@mail.ru](mailto:nboltacheva@mail.ru)

**Аннотация:** Бухта Круглая входит в число бухт Севастопольского региона. Использование её в качестве рекреационной зоны обуславливает интерес к изучению экологического состояния донных сообществ бухты. В предыдущих сообщениях были рассмотрены эпифитон макрофитов и общие параметры развития макрозообентоса её рыхлых грунтов по данным бентосных съёмок 1990, 2004 и 2013 гг. [Болтачева и др., 2022; Макаров, Бондаренко, Копий, 2022]. В настоящей работе рассмотрен сезонный аспект состава, структуры и количественного развития макрозообентоса на примере бентосной съёмки рыхлых грунтов, выполненной весной и осенью 2013 года. В целом в бухте Круглой в 2013 г. зарегистрировано 96 видов макрозообентоса, среди которых Annelida – 41, Mollusca – 21, Crustacea – 27. При существенном различии количества видов (весной 82, осенью 59 видов) весенне-осенний индекс общности фаун Чекановского — Сьеренсена составил 0,57. В оба сезона доминирующими группами по численности и биомассе являлись соответственно Annelida (83–87 % от общей численности макрозообентоса) и Mollusca (84–88 % общей биомассы). Наиболее массовый вид — многоресничковый червь *Protodorvillea kefersteini* имел высокую представленность в оба сезона, его плотность достигала 11 288 экз./м<sup>2</sup>. Достоверные сезонные различия в количественном развитии отдельных крупных таксонов (Annelida, Mollusca, Crustacea), как и макрозообентоса в целом, не выявлены. Отмечены сезонные нарушения в размерной структуре популяций ценозообразующих форм бентоса — двустворчатых моллюсков *Chamelea gallina*, *Lucinella divaricata*, *Gouldia minima*. В осенний период отмечено уменьшение численности организмов инфауны, в особенности полихет сем. Capitellidae. Индекс соотношения плотности поселений Capitellidae и Spionidae в мае составлял 2,43, в ноябре — 0,5. Предполагается, что обнаруженные сезонные различия связаны с изменениями кислородного режима в придонном слое и в толще донных осадков бухты в летний период.

**Ключевые слова:** макрозообентос, сезонная динамика, *Chamelea gallina*, *Protodorvillea kefersteini*, бухта Круглая, Чёрное море

### Введение

Наличие сезонных количественных и качественных изменений природных популяций связано с биологическими циклами развития, сопряжёнными с сезонными изменениями факторов среды [Одум, 1986]. Внутригодовая цикличность размножения, роста, смертности гидробионтов видоспецифична, очевидна и не вызывает сомнения. Когда мы переходим от популяционного уровня рассмотрения вопроса о сезонности на экосистемный, результат общих параметров её развития зависит от сопряжённости жизненных циклов многих видов. В экосистемах с более высоким

\*Статья подготовлена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Биоразнообразие как основа устойчивого функционирования морских экосистем, критерии и научные принципы его сохранения» (№ государственной регистрации 124022400148-4).

уровнем видового разнообразия более вероятным оказывается итоговое сглаживание динамики её суммарных количественных параметров развития. Особенностью черноморских донных биоценозов, по определению А. А. Шорыгина [Шорыгин, 1955], является их «островерхость», заключающаяся в доминировании по биомассе или численности одного-двух видов. В этих условиях итоговая внутригодовая динамика развития биоценоза оказывается во многом зависимой от динамики его руководящих видов, сопряжённой с изменениями факторов среды. Связь внутригодовой динамики биоценозов с изменяющимися факторами среды в Чёрном море малоизучена и представлена весьма противоречивыми, на первый взгляд, результатами. Например, в относительно стабильных температурных условиях (глубина более 50 м) в биоценозе *Modiolula phaseolina*, имеющей круглогодичный цикл размножения [Митилиды Чёрного ... , 1990], межсезонная динамика видового состава и количественного развития макрозообентоса присутствует [Киселёва, 1981], в то время как в условиях существенных сезонных колебаний температуры (песчаная сублитораль Западного Крыма, глубина 11 м) в биоценозе *Chamelea gallina*, имеющей ярко выраженный внутригодовой цикл размножения, таковая не выявлена [Ревков, Тимофеев, Лисицкая, 2014].

С целью получения дополнительной информации по внутригодовой динамике донной макрофауны в условиях ярко выраженной природной сезонности, рассмотрены особенности состава, структуры и количественного развития макрозообентоса в бухте Круглой (г. Севастополь) в весенний и осенний периоды 2013 г. Данные исследования являются составной частью работ отдела экологии бентоса ИнБИОМ, проводимых в рамках городской программы по оценке общего экологического состояния бухт г. Севастополя.

### Материалы и методы

В работе использованы материалы бентосной съёмки рыхлых грунтов акватории бухты Круглой, выполненной в мае (11 станций) и ноябре (10 станций) 2013 г. [Болтачева и др., 2022]. Сбор материала выполнен дночерпателем Петерсена ( $S = 0,04 \text{ м}^2$ ) на каждой станции в двух повторностях. При промывке проб использована система сит с минимальным диаметром ячеей фильтрации 0,5 мм.

При оценке структуры сообщества бухты использовано подразделение видов по частоте их встречаемости на три группы: руководящие (50 и более % станций), характерные (25–50 %) и редкие (менее 25 %) [Воробьёв, 1949]. Сходство фаун для двух сезонов рассчитывали с помощью коэффициента Чекановского — Сьеренсена в выражении:  $i = \frac{2a}{b+c}$ , где  $a$  — число общих видов,  $b$  и  $c$  — число видов в сравниваемых списках. Оценка сезонных различий в показателях количественного развития бентоса проведена на материалах восьми полностью совпадающих станций, выполненных как в мае, так и в ноябре 2013 г. (рис. 1).

При оценке сезонных изменений инфауны использован индекс (К) отношения численности полихет сем. Capitellidae ( $\alpha_c$ ) и сем. Spionidae ( $\alpha_s$ ):  $K = \alpha_c/\alpha_s$ , при этом  $\alpha = N + 10$ , где  $N$  — численность особей каждого из семейств в процентах общей численности спонид и капителлид [Лосовская, 1983]. Определение достоверности межсезонных различий исследованных параметров бентоса (при  $p < 0,05$ ) выполнено в программе ANOVA (пакет STATISTICA-10). Все построения выполнены в графических редакторах пакетов STATISTICA-10 и EXCEL. Таксономическая идентификация фауны проведена по определителям [Определитель фауны ... , 1968–1972; Киселёва, 2004; Grintsov, Sezgin, 2011] с верификацией названия таксонов по WoRMS [World Register ...].

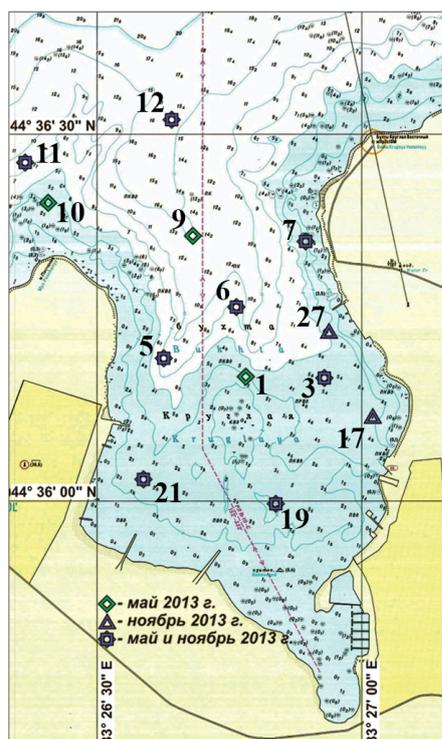


Рис. 1. Карта-схема станций в бухте Круглой, выполненных в мае и ноябре 2013 г.

## Результаты

**Таксономическое разнообразие.** Полный список таксонов макрозообентоса, обнаруженных в биотопе рыхлых грунтов бухты Круглой в ходе разносезонных исследований 2013 г., приведён в предыдущем сообщении [Болтачева и др., 2022]. Суммарно он включал 99 видов, в том числе Annelida — 41, Crustacea — 27, Bivalvia — 13, Gastropoda — 8, Bryozoa — 4 вида, Chordata, Echinodermata и Polyplacophora — по 1 виду и не идентифицированных до вида Oligochaeta, Platyhelminthes и Nemertea. Во внутригодовом цикле наблюдений наименьшее видовое богатство макрозообентоса зарегистрировано в осенний период. Снижение количества видов с 82 (май) до 59 (ноябрь) произошло во всех трёх основных таксономических группах — Annelida, Crustacea и Mollusca (рис. 2А). Индекс Чекановского — Сьеренсена общности макрофаун двух сезонов в целом составил 0,57, для моллюсков — 0,61, для аннелид и ракообразных — 0,48 и 0,44 соответственно.

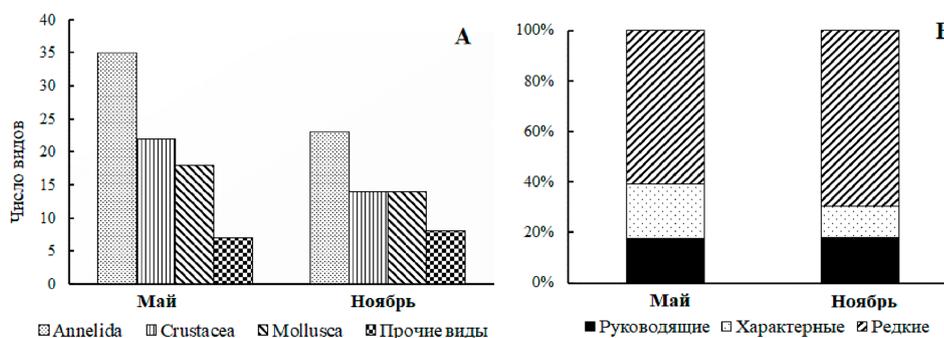


Рис. 2. Количество видов основных систематических групп (А) и структура сообщества (В) макрозообентоса в бухте Круглой в мае и ноябре 2013 г.

Сезонные изменения отмечены и в частоте встречаемости видов (рис. 2В). В ноябре, по сравнению с майскими сборами, заметно уменьшилось число характерных видов (было 17, стало 7), доля редких видов увеличилась, однако в абсолютном выражении их число уменьшилось (было 48, стало 39). Число руководящих видов в мае — 14, в ноябре — 10. Среди них 7 видов входили в эту группу в течение обоих периодов исследований: многощетинковые черви *Protodorvillea kefersteini*, *Cirrophorus harpagoneus*, *Syllis hyalina*, двустворчатый моллюск *Ch. gallina*, амфипода *Siphonoecetes dellavallei*, кумовый рак *Bodotria arenosa* и мшанка *Cryptosula pallasiana*. В мае к категории руководящих видов относились также моллюски *Gouldia minima*, *Lucinella divaricata* и полихета *Capitella capitata*; в ноябре их встречаемость снизилась до 30, 20 и 10 % соответственно. Из числа характерных видов общими для двух сезонов были 5 видов: многощетинковые черви *Ophelia limacina* и *Pholoe inornata*, моллюски *Caecum trachea*, *Moerella donacina*, ланцетник *Branchiostoma lanceolatum*.

**Количественное развитие.** Для корректности оценки различий в показателях количественного развития бентоса в разные сезоны дальнейшее сравнение проведено по данным восьми станций, выполненных как в мае, так и в ноябре 2013 г. Список видов, обнаруженных на этой части полигона (табл. 1), отличался от общего незначительно (92 против 99 видов).

Таблица 1

Состав и количественные показатели (N — численность, экз./м<sup>2</sup>; В — биомасса, г/м<sup>2</sup>) макрозообентоса на рыхлых грунтах бухты Круглой в разные сезоны 2013 г.

Вид	Май 2013 г.		Ноябрь 2013 г.	
	N	В	N	В
<b>ANNELIDA</b>				
<i>Amphitritides gracilis</i> (Grube, 1860)	9 ± 9	0,250 ± 0,250	–	–
<i>Aonides oxycephala</i> (Sars, 1862)	–	–	9 ± 9	0,059 ± 0,059
<i>Aonides paucibranchiata</i> Southern, 1914	9 ± 7	0,025 ± 0,019	–	–
<i>Aricidea claudiae</i> Laubier, 1967	–	–	3 ± 3	0,003 ± 0,03
<i>Capitella capitata</i> (Fabricius, 1780)	91 ± 57	0,073 ± 0,050	3 ± 3	0,002 ± 0,002
<i>Cirriformia tentaculata</i> (Montagu, 1808)	2 ± 2	0,050 ± 0,050	3 ± 3	0,175 ± 0,175
<i>Cirrophorus harpagoneus</i> (Storch, 1967)	1231 ± 713	1,020 ± 0,684	1806 ± 762	0,338 ± 0,165
<i>Eulalia viridis</i> (Linnaeus, 1767)	–	–	3 ± 3	0,009 ± 0,009
<i>Eumida sanguinea</i> (Örsted, 1843)	2 ± 2	0,005 ± 0,005	–	–
<i>Exogone naidina</i> Örsted, 1845	208 ± 125	0,029 ± 0,019	–	–
<i>Glycera alba</i> (O.F.Muller, 1776)	6 ± 6	1,094 ± 1,094	16 ± 7	0,119 ± 0,074
<i>Glycera tridactyla</i> Schmarda, 1861	2 ± 2	0,047 ± 0,047	–	–
<i>Harmothoe reticulata</i> (Claparède, 1870)	2 ± 2	0,002 ± 0,002	–	–
<i>Harmothoe</i> sp.	–	–	3 ± 3	0,006 ± 0,006
<i>Heteromastus filiformis</i> (Claparède, 1864)	3 ± 3	0,005 ± 0,005	6 ± 4	0,013 ± 0,08
<i>Janua heterostropha</i> (Montagu, 1803)	34 ± 28	0,005 ± 0,003	–	–
<i>Lagis neapolitana</i> (Claparède, 1869)	–	–	9 ± 9	0,047 ± 0,047
<i>Micronephthys longicornis</i> (Perejaslavlseva, 1891)	33 ± 22	0,017 ± 0,010	341 ± 95	0,083 ± 0,024
<i>Microphthalmus similis</i> Bobretzky, 1870	64 ± 62	0,013 ± 0,012	–	–
<i>Mysta picta</i> (Quatrefages, 1866)	9 ± 9	0,038 ± 0,038	3 ± 3	0,169 ± 0,169
<i>Naineris laevigata</i> (Grube, 1855)	3 ± 3	0,125 ± 0,125	–	–
<i>Ophelia limacina</i> (Rathke, 1843)	16 ± 11	0,059 ± 0,054	47 ± 40	0,103 ± 0,062
<i>Perinereis cultrifera</i> (Grube, 1840)	–	–	3 ± 3	1,728 ± 1,728
<i>Pholoe inornata</i> Johnston, 1839	70 ± 41	0,041 ± 0,024	291 ± 182	0,048 ± 0,037
<i>Phyllodoce maculata</i> (Linnaeus, 1767)	3 ± 3	0,006 ± 0,006	–	–

Продолжение на следующей странице...

ДОННАЯ ФАУНА БУХТЫ КРУГЛОЙ (ЧЁРНОЕ МОРЕ, КРЫМ). СООБЩЕНИЕ III: СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МАКРОЗООБЕНТОСА РЫХЛЫХ ГРУНТОВ

Вид	Май 2013 г.		Ноябрь 2013 г.	
	N	B	N	B
Phyllodocidae g. sp.	5 ± 3	0,034 ± 0,031	–	–
<i>Platynereis dumerilii</i> (Audouin et Milne–Edwards, 1834)	14 ± 8	0,219 ± 0,159	–	–
<i>Polycirrus jubatus</i> Bobretzky, 1869	3 ± 3	0,009 ± 0,009	3 ± 3	0,003 ± 0,003
<i>Polygordius neapolitanus</i> Fraipont, 1887	55 ± 46	0,097 ± 0,083	47 ± 30	0,047 ± 0,033
<i>Polyophthalmus pictus</i> (Dujardin, 1839)	2 ± 2	0,001 ± 0,001	–	–
<i>Prionospio cirrifera</i> Wiren, 1883	5 ± 3	0,009 ± 0,007	–	–
<i>Protodorvillea kefersteini</i> (McIntosh, 1869)	3234 ± 1256	1,078 ± 0,418	1575 ± 662	0,154 ± 0,050
<i>Salvatoria clavata</i> (Claparède, 1863)	5 ± 3	0,002 ± 0,002	–	–
<i>Schistomeringos rudolphi</i> (Delle Chiaje, 1828)	–	–	6 ± 4	0,006 ± 0,004
<i>Scolecopsis (Parascolecopsis) tridentata</i> (Southern, 1914)	–	–	13 ± 13	0,575 ± 0,575
<i>Sigambra tentaculata</i> (Treadwell, 1941)	–	–	6 ± 4	0,006 ± 0,004
<i>Sphaerosyllis bulbosa</i> Southern, 1914	27 ± 12	0,006 ± 0,002	–	–
<i>Spio decorata</i> Bobretzky, 1870	16 ± 8	0,113 ± 0,050	–	–
Spionidae g. sp.	2 ± 2	0,002 ± 0,002	–	–
<i>Syllis gracilis</i> Grube, 1840	2 ± 2	0,003 ± 0,003	–	–
<i>Syllis hyalina</i> Grube, 1863	20 ± 8	0,041 ± 0,018	41 ± 16	0,020 ± 0,008
Oligochaeta g. sp.	30 ± 9	0,020 ± 0,008	6 ± 6	0,003 ± 0,003
СУММАРНО ДЛЯ ГРУППЫ	<b>5217 ± 1650</b>	<b>4,538 ± 1,163</b>	<b>4244 ± 1275</b>	<b>3,718 ± 2,008</b>
<b>CRUSTACEA</b>				
<i>Ampelisca diadema</i> (Costa, 1853)	8 ± 6	0,028 ± 0,028	–	–
<i>Ampelisca sevastopoliensis</i> Grintsov, 2011	–	–	3 ± 3	0,001 ± 0,001
<i>Ampithoe ramondi</i> Audouin, 1826	6 ± 5	0,010 ± 0,009	–	–
<i>Apherusa bispinosa</i> (Bate, 1857)	2 ± 2	< 0,001	–	–
<i>Apseudopsis ostroumovi</i> Bacescu & Carausu, 1947	3 ± 2	0,001 ± 0,001	–	–
<i>Atylus massiliensis</i> Bellan-Santini, 1975	5 ± 5	0,001 ± 0,001	3 ± 3	< 0,001
<i>Bathyporeia guilliamsoniana</i> (Bate, 1857)	–	–	9 ± 7	0,014 ± 0,010
<i>Bodotria arenosa mediterranea</i> (Steuer, 1938)	23 ± 12	0,023 ± 0,016	106 ± 45	0,029 ± 0,013
<i>Caprella acanthifera</i> Leach, 1814	45 ± 34	0,007 ± 0,004	–	–
<i>Centraloecetes dellavallei</i> (Stebbing, 1899)	63 ± 35	0,024 ± 0,019	22 ± 12	0,009 ± 0,005
<i>Chondrochelia savignyi</i> (Kroyer, 1842)	3 ± 3	0,001 ± 0,001	–	–
<i>Cumella limicola</i> Sars, 1879	6 ± 3	0,001 ± 0,001	–	–
<i>Dexamine spinosa</i> (Montagu, 1813)	16 ± 10	0,004 ± 0,002	–	–
<i>Diogenes pugilator</i> (Roux, 1829)	8 ± 6	0,214 ± 0,154	16 ± 12	2,529 ± 2,524
<i>Eurydice spinigera</i> Hansen, 1890	2 ± 2	0,044 ± 0,044	3 ± 3	< 0,001
<i>Gammarus insensibilis</i> Stock, 1966	–	–	6 ± 6	0,060 ± 0,060
<i>Iphinoe elisae</i> Băcescu, 1950	16 ± 10	0,001 ± 0,001	3 ± 3	0,001 ± 0,001
<i>Megaluropus massiliensis</i> Ledoyer, 1976	2 ± 2	< 0,001	–	–
<i>Microdeutopus</i> sp.	5 ± 3	0,001 ± 0,001	–	–
<i>Nototropis guttatus</i> Costa, 1853	–	–	9 ± 7	0,003 ± 0,002
<i>Periculodes longimanus</i> (Bate & Westwood, 1868)	33 ± 19	0,006 ± 0,004	16 ± 12	0,003 ± 0,002
<i>Phtisica marina</i> Slabber, 1769	2 ± 2	0,001 ± 0,001	–	–
<i>Stenosoma capito</i> (Rathke, 1837)	6 ± 5	0,060 ± 0,046	–	–
<i>Xantho poressa</i> (Olivi, 1792)	6 ± 6	0,463 ± 0,463	–	–
СУММАРНО ДЛЯ ГРУППЫ	<b>258 ± 84</b>	<b>0,889 ± 0,481</b>	<b>197 ± 45</b>	<b>2,648 ± 2,521</b>

Продолжение на следующей странице...

Вид	Май 2013 г.		Ноябрь 2013 г.	
	N	B	N	B
<b>MOLLUSCA</b>				
<i>Bela nebula</i> (Montagu, 1803)	2 ± 2	0,016 ± 0,016	–	–
<i>Bittium reticulatum</i> (da Costa, 1778)	6 ± 5	0,064 ± 0,043	–	–
<i>Bivalvia</i> g. sp.	3 ± 2	0,009 ± 0,008	3 ± 3	< 0,001
<i>Caecum trachea</i> (Montagu, 1803)	27 ± 17	0,030 ± 0,019	28 ± 22	0,053 ± 0,043
<i>Calyptraea chinensis</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	13 ± 13	0,025 ± 0,025
<i>Chamelea gallina</i> (Linnaeus, 1758)	122 ± 50	13,870 ± 6,127	197 ± 120	43,383 ± 37,786
<i>Gibbomodiola adriatica</i> (Lamarck, 1819)	2 ± 2	0,005 ± 0,005	–	–
<i>Gouldia minima</i> (Montagu, 1803)	192 ± 50	8,006 ± 2,820	56 ± 37	4,194 ± 3,129
<i>Loripes orbiculatus</i> Poli, 1791	–	–	3 ± 3	2,084 ± 2,084
<i>Lucinella divaricata</i> (Linnaeus, 1758)	327 ± 133	0,773 ± 0,262	22 ± 13	0,033 ± 0,018
<i>Moerella donacina</i> (Linnaeus, 1758)	47 ± 28	6,605 ± 4,418	53 ± 30	1,488 ± 1,292
<i>Mytilaster lineatus</i> (Gmelin, 1791)	9 ± 8	0,042 ± 0,034	3 ± 3	0,006 ± 0,006
<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	2 ± 2	0,006 ± 0,006	3 ± 3	0,006 ± 0,006
<i>Parthenina interstincta</i> (J. Adams, 1797)	–	–	3 ± 3	0,003 ± 0,003
<i>Parvicardium exiguum</i> (Gmelin, 1791)	3 ± 3	0,011 ± 0,011	–	–
<i>Pitar rudis</i> (Poli, 1795)	14 ± 12	0,508 ± 0,499	13 ± 13	0,375 ± 0,375
<i>Rissoa splendida</i> Eichwald, 1830	2 ± 2	0,002 ± 0,002	–	–
<i>Spisula subtruncata</i> (da Costa, 1778)	13 ± 9	0,522 ± 0,480	13 ± 13	2,538 ± 2,538
<i>Thracia phaseolina</i> (Lamarck, 1818)	3 ± 3	0,006 ± 0,006	–	–
<i>Tricolia pullus</i> (Linnaeus, 1758)	2 ± 2	0,022 ± 0,022	–	–
<b>СУММАРНО ДЛЯ ГРУППЫ</b>	<b>773 ± 183</b>	<b>30,495 ± 9,585</b>	<b>409 ± 160</b>	<b>54,188 ± 40,458</b>
<b>ПРОЧИЕ ВИДЫ</b>				
<i>Nemertea</i> g. sp.	13 ± 6	0,041 ± 0,018	16 ± 7	0,059 ± 0,031
<i>Platyhelminthes</i> ( <i>Turbellaria</i> g. sp.)	9 ± 4	0,025 ± 0,013	6 ± 6	0,002 ± 0,002
<i>Braikovia turgenewi</i> (Ostroumoff, 1886)	–	< 0,001	–	–
<i>Cradoscrupocellaria bertholletii</i> (Audouin, 1826)	–	0,001 ± 0,001	–	0,001 ± 0,001
<i>Cryptosula pallasiana</i> (Moll, 1803)	–	0,205 ± 0,093	–	0,215 ± 0,069
<i>Schizomavella</i> ( <i>Schizomavella</i> ) <i>auriculata</i> (Hassall, 1842)	–	0,008 ± 0,008	–	0,027 ± 0,020
<i>Leptosynapta inhaerens</i> (O.Muller, 1776)	–	–	13 ± 9	0,056 ± 0,044
<i>Branchiostoma lanceolatum</i> (Pallas, 1774)	13 ± 5	0,172 ± 0,090	25 ± 22	0,622 ± 0,495
<b>СУММАРНО ДЛЯ ГРУППЫ</b>	<b>35 ± 9</b>	<b>0,451 ± 0,135</b>	<b>59 ± 22</b>	<b>0,983 ± 0,506</b>

**Примечание:** приведены стандартные ошибки средних значений

Численность и биомасса макрозообентоса в мае колебались в пределах 1125–15 263 экз./м<sup>2</sup> (среднее (6283 ± 1793) экз./м<sup>2</sup>) и 11,1–83,2 г/м<sup>2</sup> ((36,4 ± 10,3) г/м<sup>2</sup>), в ноябре — 2100–13 875 экз./м<sup>2</sup> (среднее (4909 ± 1429) экз./м<sup>2</sup>) и 1,3–349,7 г/м<sup>2</sup> ((61,5 ± 42,3) г/м<sup>2</sup>) соответственно.

Преобладающей по численности группой (в среднем 83–87 % от общей численности зообентоса) являлись Annelida, далее по убывающей — Mollusca (8–12 %), Crustacea (4 %) и группа прочих видов (1 %) (рис. 3). По биомассе со столь же высоким процентом (84–88 % от общей биомассы макрозообентоса) в оба сезона доминировали Mollusca, далее шли Annelida (6–13 %), Crustacea (1–3 %) и прочие виды (менее 1 %). Полученные результаты указывают на стабильные позиции каждой из крупных таксономических групп в ранжированном ряду их количественной представленности, не зависящие от сезона исследования.

При наличии наблюдаемых сезонных изменений средних значений количественного развития (как по численности, так и по биомассе) каждой крупной таксономической группы и зообентоса в целом (см. табл. 1), ни в одном случае не найдено подтверждение достоверности этих различий (ANOVA, значение «р» во всех случаях сравнения по сезонам было выше 0,3).

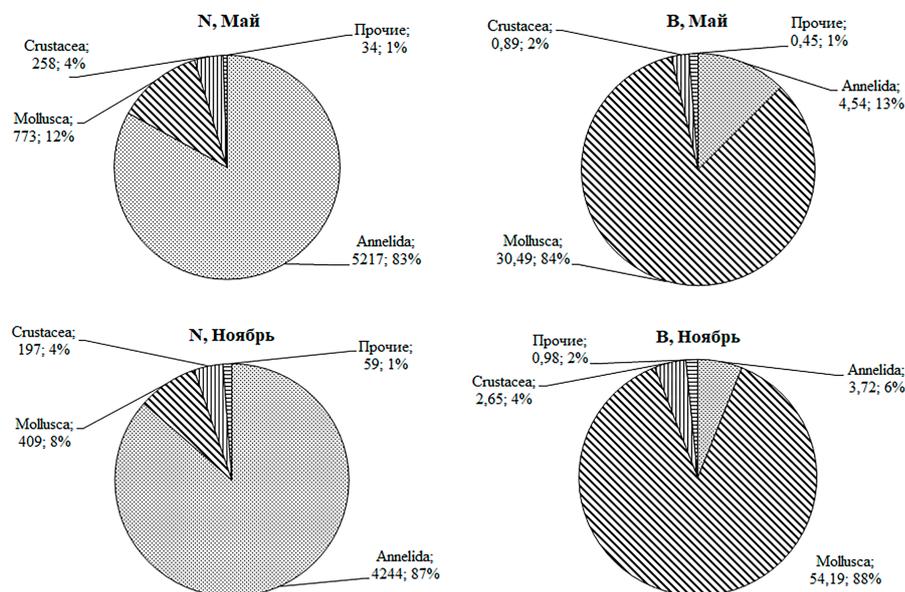


Рис. 3. Соотношение по численности N (экз./м²; %) и биомассе B (г/м²; %) основных систематических групп макрозообентоса б. Круглой в мае и ноябре 2013 г.

Несмотря на отсутствие достоверных межсезонных различий в развитии макрофауны в целом, мы констатируем увеличение (в 1,7 раза) средней биомассы макрозообентоса в ноябре по сравнению с маем. Указанный тренд может иметь накопительное значение и уже достоверно проявиться вне нашего сезонного цикла наблюдений. В связи с этим, даже в условиях отсутствия достоверных межсезонных различий, мы обращаем внимание на имеющиеся тренды количественного развития для различных систематических групп и отдельных таксонов.

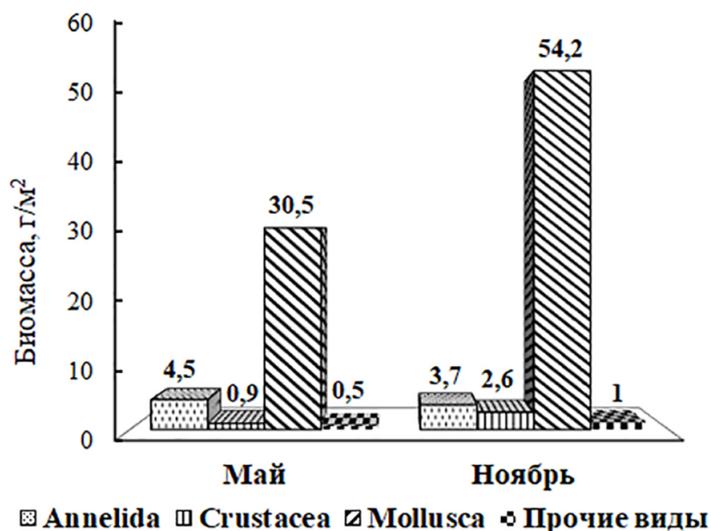


Рис. 4. Биомасса основных систематических групп макрозообентоса в бухте Круглой в мае и ноябре 2013 г.

Основной вклад в увеличение обозначенной средней внесли двустворчатые моллюски (рис. 4, табл. 1). При этом средняя биомасса *Ch. gallina* увеличилась в 3,1 раза (с 13,87 до 43,38 г/м<sup>2</sup>), у других массовых видов моллюсков — *L. divaricata*, *G. minima*, *M. donacina* — уменьшилась соответственно в 23, 1,9 и 4,4 раза. Для люцинеллы, в отличие от остальных двустворок, сезонное изменение биомассы оказалось достоверным (ANOVA,  $p = 0,014$ ). Численность и биомасса всех прочих двустворок (за исключением хамелеи) уменьшилась соответственно в 3,6 и 1,5 раза. Увеличение биомассы ракообразных произошло исключительно за счёт раков-отшельников *Diogenes pugilator* (с  $0,21 \pm 0,15$  до  $2,53 \pm 2,52$  г/м<sup>2</sup>).

Отмеченное нами увеличение средней удельной биомассы *Ch. gallina* произошло за счёт вероятностного попадания осенью в пробы крупных моллюсков с длиной раковины более 21 мм (рис. 5). С учётом времени размножения хамелеи в Чёрном море, которое большинство исследователей относит к наибольшему летнему прогреву вод в июле — августе — начале сентября [Захваткина, 1963; Чухчин, 1965], моллюски наших весенних сборов могут иметь наименьший ориентировочный возраст 7 месяцев, моллюски осенних сборов — практически 1 год. Согласно известному, как раз для акватории б. Круглой, темпу роста хамелеи [Boltacheva, Mazlymyan, 2003], размер таких годовиков ориентировочно составляет не более 15 мм. В последний — укладывается основная доля моллюсков как наших весенних, так и осенних сборов. Исключение — отдельные крупные особи, которые по размерам ориентировочно могут быть отнесены к трёхлеткам. В итоге получается, что весной и осенью 2013 г. оцениваемая нами размерно-возрастная структура поселения хамелеи в бухте Круглой в основном была представлена генерацией моллюсков 2012 г. с добавлением к осени ранней летней молодежи 2013 г. При наличии указанной логической цепочки рассуждений возникает законный вопрос о причине фактического отсутствия роста моллюсков в летний период. Для хамелеи, имеющей выраженный летне-осенний период пополнения поселений молодью, ростовые показатели могли быть представлены в смещении модальных пиков этого размерно-частотного распределения. Но этого смещения после лета 2013 г. мы не наблюдаем. Более того, если оцениваемый максимальный возраст хамелеи — до 9 лет [Boltacheva, Mazlymyan, 2003], то где представители остальных, хотя бы некоторых, размерно-возрастных классов? Отмеченные нами несколько моллюсков-трёхлеток не могут заполнить белое пятно в структуре поселения, претендующего на характеристики зрелого. Возникает общее предположение о внутри- и межгодовой нестабильности поселений хамелеи в бухте Круглой. На последнее, в частности, указывают материалы 1990 и 2004 гг., когда поселения данного вида в бухте были представлены существенно более полным размерным диапазоном (рис. 6).

В отношении полученных гистограмм размерно-частотной представленности других обозначенных нами моллюсков — *L. divaricata*, *G. minima* и *M. donacina* — явным оказывается отсутствие возможности судить о смещении их модальных пиков при общем сокращении плотности поселений.

В оба сезона среди аннелид отмечены представители семейств Capitellidae (живут в толще грунта) и Spionidae (обитают на поверхности грунта), соотношение численности которых в Чёрном море может быть использовано для оценки санитарного состояния акваторий [Лосовская, 1983]. Значение индекса К (соотношения численности Capitellidae и Spionidae) в мае (2,43) оказалось выше, чем в ноябре (0,5). В основе этого различия лежит существенное (в 10 раз) снижение обилия инфаунных полихет сем. Capitellidae в ноябре по сравнению с маем. При этом плотность спионид также уменьшилась, но лишь в 1,4 раза. Предполагается [Лосовская, 1983], что значительное увеличение плотности спионид может приводить к более полному изъятию детрита в поверхностных слоях грунта, уменьшению его количества в нижележащих слоях грунта и, соответственно, ухудшению пищевой базы капителлид. Однако в наблюдаемом случае плотность спионид мало изменилась, следовательно, существенное уменьшение численности капителлид — следствие влияния иных факторов.

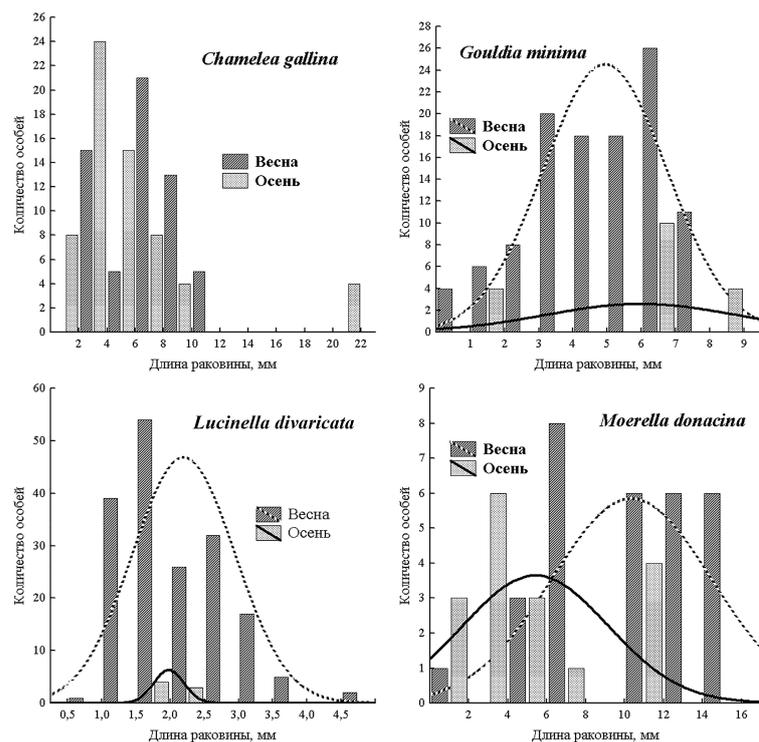


Рис. 5. Гистограммы размерного состава некоторых моллюсков в весенних и осенних пробах в бухте Круглой

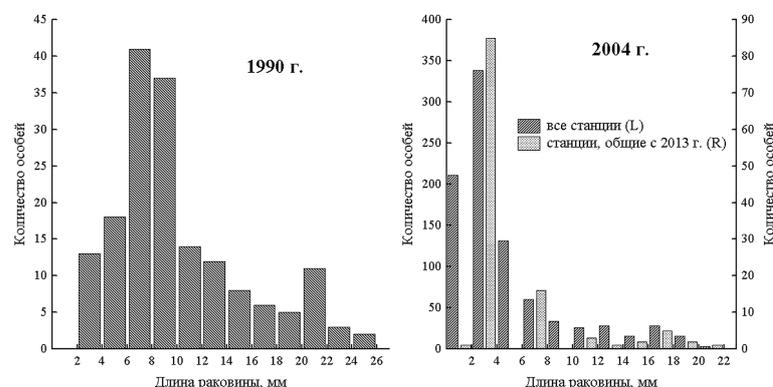


Рис. 6. Гистограммы размерного состава *Chamelea gallina* в биотопе рыхлых грунтов бухты Круглой в июле 1990 и 2004 гг.

### Обсуждение

При обсуждении материала сразу оговоримся, что саму экосистему бухты Круглой на этапе наших исследований мы рассматриваем как зрелую и уже достигшую некоторого баланса в существующих внутренних и внешних (как у любой открытой экосистемы) потоках вещества и энергии [Алемов и др., 2018; Болтачева и др., 2022]. В связи с этим, с нашей точки зрения, любые естественные изменения в экосистеме бухты (изменения отдельных её элементов) должны происходить в рамках уже достигнутого некоторого относительно устойчивого состояния. Любые естественные внутренние циклы развития экосистемы бухты, например связанные с популяционной динамикой отдельных видов или внутренними (для бухты) гидрохимическими циклами, не должны разрушать экосистему. Любые отклонения от равновесного состояния,

при кратковременности воздействия различных дестабилизирующих факторов, являются временными, что позволяет говорить о наличии у любой экосистемы определённого запаса прочности. Возможность нарушения равновесия экологических процессов в бухте и переход её в другое состояние может возникнуть при достаточно пролонгированном действии некоторого критического фактора, нарушившего предыдущее равновесное состояние. Однако, ввиду открытости экосистемы бухты, можно предположить, что её устойчивость будет во многом определяться компенсационными механизмами — возможностью восполнения каких-то постоянно или временно утрачиваемых ресурсов. Всё вышесказанное позволяет нам рассматривать сезонность в развитии донной макрофауны бухты и её отдельных компонентов как некоторый циклический фактор, определяющий возможные внутренние перестройки формально в рамках одной и той же экосистемы.

К сожалению, мы не имеем длительного (многолетнего) ряда наблюдений за сезонными изменениями в бентосе бухты Круглой. Но, отталкиваясь от обозначенного выше посыла о зрелости и относительной стабильности экосистемы бухты, полученные нами данные о сокращении видового богатства донной макрофауны в осенний период, по-видимому, следует относить к категории циклических изменений. На фоне общего сокращения видового богатства с 82 (76 — при сопоставлении восьми реперных станций) в мае до 59 (52) видов в ноябре произошло увеличение доли редких видов. Мы склонны полагать, что обозначенный осенний дефицит видового богатства донной макрофауны бухты может быть восполнен в следующем сезонном цикле за счёт личиночного фонда из соседних акваторий.

Осеннее сокращение видового богатства донной макрофауны бухты Круглой, по-видимому, только условно можно назвать осенним. Точнее, мы наблюдаем суммарный результат процессов в бентали бухты, происходящих фактически в летний период, между съёмками в мае и ноябре 2013 г. Нельзя также не обратить внимания и на межгодовую разницу в ранее выявленном общем видовом богатстве донной фауны в 2004 г. (142 вида и надвидовых таксона) и в 2013 г. (99) [Болтачева и др., 2022]. С нашей точки зрения, столь широкий разброс видового богатства донной макрофауны бухты, по-видимому, не является критическим для поддержания стабильности её биоценотической организации, наблюдаемой на протяжении 1990, 2004 и 2013 гг. [Болтачева и др., 2022].

Полученные нами результаты свидетельствуют об отсутствии достоверных различий в количественном (по численности и биомассе) развитии основных крупных таксонов и макрозообентоса в целом в весенний и осенний периоды исследований (см. табл. 1), что согласуется с известным положением об относительной стабильности донных сообществ верхней сублиторали [Пропп, 1971]. Отмеченный тренд осеннего увеличения общей биомассы макрозообентоса связан с вероятностной регистрацией в ноябрьских пробах отдельных крупных представителей двустворчатых моллюсков *Ch. gallina*. Однако следует подчеркнуть, что теоретически предполагаемого осеннего возрастания удельной численности донной макрофауны, в связи с ожидаемым пополнением поселений молодью для видов, основной этап размножения которых приходится на летний (июль — август) и раннеосенний (начало сентября) периоды, не обнаружено.

Кроме наблюдаемой относительной стабильности количественного развития зообентоса, мы отмечаем некоторые тревожные моменты нарушения структуры поселений отдельных руководящих форм в бентосе бухты. Таковой стала информация о нестабильности поселений двустворчатых моллюсков *Ch. gallina*, *L. divaricata*, *G. minima*, и *M. donacina*, являющихся одними из основных ценозообразующих видов в бентосе бухты Круглой [Болтачева и др., 2022].

Два наиболее массовых представителя макрофауны, определяющих фактически её межсезонную динамику, — многощетинковые черви *Protodorvillea kefersteini* (сем. Dorvilleidae) и *Cirrophorus harpagoneus* (сем. Paraonidae) имеют относительно высокую, но равномерную

представленность в оба сезона. Первый из них, по мнению М. И. Киселёвой [Киселёва, 2004], может в период размножения в летний сезон формировать поселения с плотностью свыше 2000 экз./м<sup>2</sup>. В наших пробах в сравниваемые периоды (май — ноябрь 2013 г.) на совпадающих восьми станциях этот вид имел 100%-ную встречаемость при средних значениях ((3235 ± 1256) экз./м<sup>2</sup>, май), ((1575 ± 662) экз./м<sup>2</sup>, ноябрь) при отсутствии между последними достоверных различий (ANOVA,  $p = 0,262$ ). Заметим, что зарегистрированный нами стационарный максимум (11 288 экз./м<sup>2</sup>, май, ст. 7) является абсолютным для черноморской популяции данного вида и приходится не на предполагаемый период его размножения. Учитывая наличие естественной зимней смертности молоди, можно говорить о том, что этот абсолютный максимум возможной плотности поселения *P. kefersteini* сильно занижен. Следует отметить, что Dorvilleidae, к которым относится *P. kefersteini*, являются видными представителями зон кислородного минимума, демонстрируют необычную толерантность к сульфидам, а также доминируют среди макробентоса в сульфидных осадках мелководных гаваней и загрязнённых эстуариев [Levin et al., 2013; Levin et al., 2013; Jumars, Dorgan, Lindsay, 2015]. Межсезонная динамика плотности поселений *S. harpagoneus npi* средних значениях (1164 ± 725) экз./м<sup>2</sup> в мае и (1806 ± 762) экз./м<sup>2</sup> в ноябре также отсутствует (ANOVA,  $p = 0,551$ ). Стационарные максимумы этого вида как весной (5263 экз./м<sup>2</sup>), так и осенью (5400 экз./м<sup>2</sup>) также являются абсолютными для Чёрного моря; ранее наиболее высокие значения плотности *S. harpagoneus* были отмечены у берегов Крыма и Болгарии и составляли 300 экз./м<sup>2</sup> [Киселёва, 2004]. Представители данных семейств (Dorvilleidae и Paraonidae) являются детритофагами, обитающими на поверхности грунта. Известно, что многие из них приурочены к средам, богатым органикой [Jumars, Dorgan, Lindsay, 2015]. Дорвиллиды известны также как оппортунисты, встречающиеся с высокой плотностью в местах вблизи канализационных труб и водовыпусков целлюлозных заводов и при выращивании рыбы в садках [Paxton, Davey, 2010]. Столь массовое развитие этих двух видов в акватории бухты Круглой свидетельствует о высоком органическом загрязнении её грунтов, существенно поднимающем верхние границы лимитирования их развития по фактору обеспеченности питанием.

Интересной оказалась информация и по двум другим представителям многощетинковых червей — *Capitella capitata* и *Heteromastus filiformis*. Отмечено снижение индекса К (соотношение капителлид и спионид) с 2,43 (в мае) до 0,5 (в ноябре), что свидетельствовало о наличии некоторых критических условий в самом грунте и реакции на эти условия со стороны сравниваемых групп инфаунных и эпифаунных полихет. Известно, что капителлиды *Capitella capitata* и *Heteromastus filiformis*, в отличие от большинства спионид, являются эвриоксибионтными формами, способными в течение некоторого времени переносить присутствие сероводорода [Лосовская, 1983; Киселёва, 2004]. Однако относительно длительный период сероводородного заражения грунтов не могут выносить и они [Якубова, Мальм, 1930]. Почти полное исчезновение капителлид в ноябре может свидетельствовать о длительном периоде аноксических условий в толще грунта в летние месяцы 2013 г. При этом известно, что в придонных слоях воды некоторое количество кислорода в летние месяцы обычно присутствует [Орехова, 2010]. Эти гипо- и аноксические условия в летний период являются несомненным фактором угрозы для всех кислородзависимых гидробионтов. При этом известно, что гипоксия может вызывать сокращение численности, разнообразия и размеров бентических организмов, влиять на их скорость дыхания, режим питания и даже на зрение [Levin et al., 2013].

Полученные нами данные относительно многощетинковых червей стали ключевыми для понимания причин отмеченных сезонных изменений в бентосе бухты Круглой. Известно, что органическое обогащение толщи воды и грунтов, как фактор достаточной обеспеченности пищей организмов-детритофагов, имеет два крайних критических момента реализации в зависимости от биотопических условий [Ревков, 2011]. В одном случае, при благоприятных

гидрологических условиях (таковые могут присутствовать на отдельных участках полигона), это мощный стимул развития бентонтов-детритофагов, в другом, при плохом водообмене, это может приводить к их гибели от заморов. Исследования севастопольских бухт показали, что в холодный период года их воды хорошо аэрированы и изменения концентрации  $O_2$  в придонном слое имеют сезонный характер с максимумом в феврале — марте и минимумом в августе — сентябре [Свищев, Кондратьев, Коновалов, 2011]. Последнее связано с быстрым расходом кислорода на разложение избыточного количества органики, которое при наличии плохой гидродинамики (при стагнации вод) приводит к его дефициту [Кондратьев, 2010]. Подобное явление придонной гипоксии, уровень которой колеблется в течение года, отмечено и в б. Круглой [Заика, Коновалов, Сергеева, 2011; Орехова, Коновалов, Овсяный, 2013].

Между двумя обозначенными выше крайними направлениями развития событий в гипертрофных условиях существует масса промежуточных вариантов, зависящих от места локализации, размеров и времени формирования критических кислород-дефицитных участков. Но в любом случае, даже при узколокальных проявлениях заморов, возможен выход сероводородного заражения на поверхность грунта [Заика, Коновалов, Сергеева, 2011] и далее — в толщу воды с последующим заражением соседних участков акватории и, возможно, бухты в целом. По данным Н. А. Ореховой [Орехова, 2010], в июле 2009 г. на отдельных участках акватории бухты Круглой, в придонном горизонте, были зарегистрированы аноксические условия, при этом в толще осадка содержание сероводорода увеличивалось, достигая максимума на глубине всего лишь 19 мм. Результатом же отмеченных в июле 2009 г. в бухте Круглой гипоксических условий в толще грунта было общее уменьшение обилия летнего макрозообентоса, при этом численность Annelida показывала чёткое снижение по мере уменьшения глубины залегания границы  $H_2S$  [Заика, Коновалов, Сергеева, 2011]. С нашей точки зрения, наблюдаемое в 2013 г. осеннее снижение развития макрозообентоса по количеству представленных таксонов (особенно ракообразных), уменьшение индекса соотношения ин- и эпифаунных полихет является прямым результатом реакции (элиминации) наиболее оксифильных форм гидробионтов в уже ранее описанных кислород-дефицитных условиях бухты Круглой в летний период.

Известно, что ряд представителей инфауны ограничивают свой контакт с грунтом, формируя в нём собственное аэрируемое жизненное пространство путём строительства трубок и систем сообщающихся с поверхностью грунта ходов (полихеты, рак-крот *Upogebia pusilla*). Для двустворчатых моллюсков, представляющих инфауну, в условиях летней придонной гипоксии важной (если нет возможности приподняться над поверхностью грунта, закрепившись на талломах донной растительности, как это часто наблюдается у некоторых кардиид и пектинид) может оказаться высота расположения сифонов над грунтом. В связи с этим обратим внимание на следующее: в размерном ряду двустворчатых моллюсков, найденных в бухте Круглой в массовых количествах (*Ch. gallina*, *G. minima*, *L. divaricata*), на первом месте стоит хамелея. Её максимальная длина в Чёрном море составляет 43 мм [Определитель фауны ... , 1968–1972], а наиболее крупные экземпляры в бухте Круглой имели длину раковины 21,8 мм. *G. minima* имеет меньшие размеры (в Чёрном море — до 11 мм, в б. Круглой — до 7,7 мм).

*Ch. gallina* обитает в поверхностном слое грунта, однако сифоны приподнимает относительно высоко над грунтом. Более мелкая *G. minima* имеет и более короткие сифоны. Ещё более мелкий моллюск — *L. divaricata* (сем. Lucinidae) не имеет вводного сифона и закачивает воду с поверхности грунта через построенную с помощью ноги трубку. Мы предполагаем, что в условиях формирования гипоксических условий в придонном горизонте среди двустворчатых моллюсков преимущество получают более крупные формы с хорошо развитыми сифонами, способные получать кислород из более удалённых от поверхности грунта слоёв воды. В связи с этим хамелея, имеющая такую возможность, получает преимущества для выживания по сравнению

с другими видами двусторчатых моллюсков бухты. Именно этот вид среди обозначенных выше демонстрирует свойства, позволяющие приспосабливаться к летним кислород-дефицитным условиям б. Круглой, сохраняя в целом высокие показатели развития по численности и биомассе (см. табл. 1).

*Ch. gallina* в Чёрном море, у берегов Крыма, продемонстрировала исключительную способность адаптации к условиям органического обогащения прибрежных акваторий. На пике кризиса черноморской экосистемы второй половины 20-го века было отмечено возрастание показателей развития данного вида [Revkov et al., 2008; Болтачева, Заика, 2018], аналогичное увеличение биомассы поселений хамелеи отмечено и вблизи локальных источников эвтрофирования [Ревков и др., 1999]. Многолетние (1989–1999 гг.) исследования показали, что именно в летне-осенний период в бухте Круглой часто наблюдаются высокие концентрации органического азота и фосфора, нитратов и БПК<sub>5</sub> [Павлова, Мурина, Куфтаркова, 2001]. По-видимому, наблюдаемый достаточно высокий уровень биомассы хамелеи может являться в том числе следствием обогащения акватории бухты органическим веществом в летний период.

Несомненно, что объяснение некоторых сезонных различий в зообентосе бухты следует искать не только в специфике биотопов, но и в биологических особенностях видов, населяющих бухту. Их сроки размножения и, соответственно, периоды пополнения поселений молодью — один из существенных факторов, который может определять численность бентоса в разные сезоны. Массовые виды моллюсков в бухте — хамелея и люцинелла, а также спиониды и капителлиды, обнаруженные в наших сборах, размножаются в Чёрном море в тёплое время года [Виноградов, 1949; Виноградова, 1950; Чухчин, 1965; Петров, 1990; Казанкова, 2002; Киселёва, 2004; Ревков, Тимофеев, Лисицкая, 2014]. Так, в августе 2013 г. в бухтах Севастополя (в том числе в бухте Круглой) численность личинок *Ch. gallina* в планктоне колебалась в пределах 109–206 экз./м<sup>3</sup>, а уже в сентябре личинки как *Ch. gallina*, так и других Veneridae обнаружены не были (по устному сообщению Е. В. Лисицкой). Следовательно, в ноябре должно было бы наблюдаться массовое пополнение поселений этих видов. Однако это оказалось справедливым лишь для хамелеи. У люцинеллы и капителлид, а в некоторой степени и у спионид, наоборот, в ноябре численность оказалась ниже. С нашей точки зрения, причиной этого могут быть именно кислород-дефицитные явления в грунте и придонных горизонтах бухты Круглой в летний период. Возможный вариант простого объяснения достоверного сокращения численности люцинеллы в осенних пробах (ANOVA,  $p = 0,039$ ) методическими причинами (молодь к ноябрю просто не успела подрасти, чтобы быть учтённой при промывке через сито в 0,5 мм) мы тоже принимаем во внимание. Однако результаты анализа внутригодовой динамики поселений люцинеллы на одном из участков западного побережья Крыма, при схожей методике промывки через сито с ячейей 0,5 мм, позволили прийти к выводу о летнем максимуме её размножения и пике присутствия в поселении молоди размером до 1 мм уже в летний период [Ревков, Тимофеев, Лисицкая, 2014]. В нашем случае с поселением люцинеллы в б. Круглой осенью произошёл не столько возможный «недоучёт» летней молоди 2014 г., но и общее сокращение плотности её поселения за счёт всех размерно-возрастных классов при сокращении её средних размеров в поселении с  $(2,19 \pm 0,06)$  (Mean  $\pm$  St. err.) до  $(1,97 \pm 0,08)$  мм (рис. 5). Сходное с люцинеллой достоверное (ANOVA,  $p = 0,046$ ) сокращение плотности поселения (см. табл. 1) отмечено у *Gouldia minima* при некотором увеличении среднего размера особей с  $(4,91 \pm 0,17)$  (весной) до  $(5,96 \pm 0,66)$  мм (осенью). Не выражены межсезонные изменения по плотности у *Moerella donacina* (см. табл. 1), однако средний размер особей в её поселении осенью оказался ниже, чем весной ( $(5,39 \pm 0,90)$  против  $(10,30 \pm 0,75)$  мм) (рис. 5).

## Выводы

На фоне выявленного высокого уровня видового сходства (индекс Чекановского — Съеренсена равен 0,57) отмечены сезонные различия в структуре и количественном развитии фауны бухты Круглой в весенний и осенний периоды 2013 г. В осенний период в бентосе обнаружено меньшее количество видов (59 против 82 весной). На фоне отсутствия достоверных межсезонных изменений численности и биомассы макрозообентоса мы отмечаем нарушения в структуре популяций ценозообразующих форм бентоса — двустворчатых моллюсков *Ch. gallina*, *L. divaricata*, *G. minima* и *M. donacina*. Выявлено снижение индекса соотношения численности эпифаунных Spionidae и инфаунных Capitellidae с 2,43 (в мае) до 0,5 (в ноябре). Предполагается, что обнаруженные сезонные отличия связаны с формированием кислород-дефицитных условий в придонном слое воды и в толще донных осадков в бухте в тёплое время года.

Авторы выражают искреннюю признательность Л. В. Бондаренко за помощь в обработке материалов бентосной съёмки, а также рецензентам статьи за ценные замечания.

## Список литературы

1. Алемов С. В., Витер Т. В., Гусева Е. В., Волков Н. Г. Сообщества макрозообентоса акваторий севастопольского региона // Санитарно-биологические исследования прибрежных акваторий юго-западного Крыма в начале XXI века / отв. ред.: О. Г. Миронов, С. В. Алёмов. – Симферополь : АРИАЛ, 2018. – Гл. 5. – С. 108–178.
2. Болтачева Н. А., Заика В. Е. Моллюски *Chamelea gallina* и *Mytilus galloprovincialis* верхней сублиторали: многолетние изменения // Биология Черного моря у берегов Юго-Восточного Крыма / А. В. Агафонов, Ю. В. Белоусова, М. М. Бескаравайный [и др.] ; под ред. Н. С. Костенко. – Симферополь : АРИАЛ, 2018. – [Разд.] 3.1.3. – С. 87–96. – <https://doi.org/10.21072/978-5-907032-04-0>
3. Болтачева Н. А., Ревков Н. К., Бондаренко Л. В., Макаров М. В., Надольный А. А. Донная фауна бухты Круглой (Чёрное море, Крым). Сообщ. II. Таксономический состав и количественное развитие макрозообентоса рыхлых грунтов // Труды Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского – природного заповедника РАН. – 2022. – Вып. 2 (22). – С. 3–22.
4. Виноградов К. А. К фауне кольчатых червей (Polychaeta) Черного моря. – Киев : Изд-во АН УССР, 1949. – 84 с. – (Труды Карадагской биологической станции ; вып. 8).
5. Виноградова З. А. Материалы по биологии моллюсков Черного моря // Труды Карадагской биологической станции / Акад. наук УССР, Карадаг. биол. станция. – Киев : Изд-во АН УССР, 1950. – Вып. 9. – С. 100–159.
6. Воробьёв В. П. Бентос Азовского моря. – Симферополь : Крымиздат, 1949. – 193 с. – (Труды Азово-Черноморского научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии ; вып. 13).
7. Заика В. Е., Коновалов С. К., Сергеева Н. Г. Локальные и сезонные явления гипоксии на дне севастопольских бухт и их влияние на макробентос // Морской экологический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 15–25.
8. Захваткина К. А. Фенология личинок двустворчатых моллюсков Севастопольской бухты // Труды Севастопольской биологической станции. – 1963. – Т. 16. – С. 173–175.
9. Казанкова И. И. Сезонная динамика личинок двустворок и их вертикальное распределение в прибрежном планктоне внешнего рейда Севастопольской бухты (Черное море) // Экология моря / НАН Украины, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. – Севастополь : Экоси – Гидрофизика, 2002. – Вып. 61. – С. 59–63.

10. Киселёва М. И. Бентос рыхлых грунтов Черного моря. – Киев : Наук. думка, 1981. – 165 с.
11. Киселёва М. И. Многощетинковые черви (Polychaeta) Черного и Азовского морей. – Апатиты : Изд. Кол. науч. центра РАН, 2004. – 409 с.
12. Кондратьев С. И. Особенности распределения растворенного кислорода в водах Севастопольской бухты в 2006–2007 годах // Морской гидрофизический журнал. – 2010. – № 2. – С. 63–76.
13. Лосовская Г. В. О значении полихет как возможных индикаторов качества среды Черного моря // Экология моря / Акад. наук УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. – Киев : Наук. думка, 1983. – Вып.12. – С. 73–78.
14. Макаров М. В., Бондаренко Л. В., Копий В. Г. Донная фауна бухты Круглой (Чёрное море, Крым). Сообщ. 1. Эпифитон макрофитов // Труды Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского – Природного заповедника РАН. – 2022. – № 1 (21). – С. 11–26.
15. Митилиды Чёрного моря / Заика В. Е., Валовая Н. А., Повчун А. С., Ревков Н. К. ; отв. ред. В. Е. Заика. – Киев : Наук. думка, 1990. – 208 с.
16. Одум Ю. П. Экология. В 2 т. Т. 2. – Москва : Мир, 1986. – 376 с.
17. Определитель фауны Чёрного и Азовского морей. Свободноживущие беспозвоночные : в 3 т. / АН УССР, Ин-т биологии юж. морей ; под общ. рук. Ф. Д. Мордухай-Болтовского. – Киев : Наук. думка, 1968–1972. – 3 т.
18. Орехова Н. А. Гипоксия и аноксия в донных осадках крымского побережья // Географія та туризм : наук. зб. / Київ. нац. ун-т ім. Т. Шевченка ; відп. ред. Я. Б. Олійник. – Київ : Альтерпресс, 2010. – Вип. 4. – С. 146–152.
19. Орехова Н. А., Коновалов С. К., Овсяный Е. И. Изменение геохимических характеристик в донных осадках Крымского побережья // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное исследование ресурсов шельфа : сб. науч. тр. / Мор. гидрофиз. ин-т НАН Украины [и др.]. – Севастополь : МГИ, 2013. – Вып. 27. – С. 284–288.
20. Павлова Е. В., Мурина В. В., Куфтаркова Е. А. Гидрохимические и биологические исследования в бухте Омега (Чёрное море, Севастопольский шельф) // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное исследование ресурсов шельфа : сб. науч. тр. / АН Украины, Мор. гидрофиз. ин-т. – Севастополь : МГИ, 2001. – Вып. 2. – С. 159–176.
21. Петров А. Н. Исследование экологии моллюсков с применением некоторых индексов (на примере черноморских двустворок *Bivalvia*) : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 1990. – 24 с.
22. Пропт М. В. Экология прибрежных донных сообществ Мурманского побережья Баренцева моря. – Ленинград : Наука, 1971. – 128 с.
23. Ревков Н. К. Макрозообентос украинского шельфа Чёрного моря. Современное состояние зооресурсов бентали Азово-Черноморского бассейна // Промысловые биоресурсы Чёрного и Азовского морей / НАН Украины, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского ; ред.: В. Н. Еремеев [и др.]. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011. – С. 140–162. – <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4583.7280>
24. Ревков Н. К., Валовая Н. А., Колесникова Е. А., Николаенко Т. В., Шаляпин В. К. К вопросу о реакции черноморского макрозообентоса на эвтрофирование // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа: сб. науч. тр. / АН Украины, Мор. гидрофиз. ин-т. – Севастополь : МГИ, 1999. – С. 199–212.
25. Ревков Н. К., Тимофеев В. А., Лисицкая Е. В. Состав и сезонная динамика макрозообентоса локального биотического комплекса *Chamelea gallina* (западный Крым, Чёрное море) // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2014. – Вып. 11. – С. 247–259.

26. Свищев С. В., Кондратьев С. И., Коновалов С. К. Закономерности сезонных изменений содержания и распределения кислорода в водах Севастопольской бухты // Морской гидрофизический журнал. – 2011. – № 4. – С. 64–78.
27. Чухчин В. Д. Биология размножения *Venus gallina* L. (Lamellibranchia) в Черном море // Бентос : сб. ст. / отв. ред. В. А. Водяницкий. – Киев : Наук. думка, 1965. – С. 15–23.
28. Шорыгин А. А. О биоценозах // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отд. Биологический. – 1955. – Т. 60, вып. 6. – С. 87–98.
29. Якубова Л. И., Мальм Е. Н. Явления временного анаэробнобиоза у некоторых представителей бентоса Черного моря // Доклады АН СССР. Сер. А. – 1930. – № 14. – С. 363–366.
30. Boltacheva N. A., Mazlymyan S. A. The growth and longevity of *Chamelea gallina* (Mollusca, Veneridae) in the Black Sea // Вестник зоологии. – 2003. – Т. 37, № 3. – С. 71–74.
31. Grintsov V., Sezgin M. Manual for identification of Amphipoda from the Black Sea. – Sevastopol : DigitPrint, 2011. – 151 p.
32. Jumars P. A., Dorgan K. M., Lindsay S. M. Diet of worms emended: an update of polychaete feeding guilds // Annual Review of Marine Science. – 2015. – Vol. 7. – P. 497–520. – <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-020007>
33. Levin L. A., Ziebis W., Mendoza G. F., Bertics V. J., Washington T., Gonzalez J., Thurber A. R., Ebbe B., Lee R. W. Ecological release and niche partitioning under stress: lessons from dorvilleid polychaetes in sulfidic sediments at methane seeps // Deep-Sea Research. Pt. II. – 2013. – Vol. 92. – P. 214–33. – <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.02.006>
34. Levin L. A. Oxygen minimum zone benthos: adaptation and community response to hypoxia // Oceanography and Marine Biology : an annual review / ed. by R. N. Gibson, R. J. A. Atkinson. – London : CRC Press, 2003. – Vol. 41. – P. 1–45. – <https://doi.org/10.1201/9780203180570>
35. Levin L. A., Mendoza G. F., Neira C., Giddings S. N., Crooks J. A. Consequences of mouth closure and hypoxia-induced state changes in low-inflow estuaries: benthic community and trait-based response // Estuaries and Coasts. – 2023. – 46, iss. 8. – P. 2128–2147. – <https://doi.org/10.1007/s12237-022-01132-3>
36. Paxton H., Davey A. A new species of Ophryotrocha (Annelida: Dorvilleidae) associated with fish farming at Macquarie Harbour, Tasmania, Australia // Zootaxa. – 2010. – Vol. 2509. – P. 53–61. – <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2509.1.4>
37. Revkov N., Abaza V., Dumitrache C., Todorova V., Konsulova T., Mickashavidze E., Varshanidze M., Sezgin M., Ozturk B., Chikina M. V., Kucheruk N. V. The state of zoobenthos // State of the Environment of the Black Sea (2001–2006/7) : a report by the Commission on the Protection of the Black Sea Against Pollution. – Istanbul : [s. n.], 2008. – Chap. 8. – P. 243–290.
38. World Register of Marine Species. – URL:<http://www.marinespecies.org> (access date: 01.08.2024).

### **BENTHIC FAUNA OF THE KRUGLAYA BAY (BLACK SEA, CRIMEA). PART III: SEASONAL VARIATIONS OF MACROZOOBENTHOS ON SOFT SEDIMENTS**

**Boltacheva N. A., Revkov N. K.**

*A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation,  
e-mail: [nboltacheva@mail.ru](mailto:nboltacheva@mail.ru)*

**Abstract:** Kruglaya Bay is a member of the bays in Sevastopol region. Its use as a recreational area has led to an interest in studying the ecological condition of the bay's benthic communities. Previous reports have discussed the development both of the macrophyte's epiphyton values and macrozoobenthos in total on the soft-bottoms of the bay from benthic surveys in 1990, 2004 and 2013 [Boltacheva et al., 2022; Makarov, Bondarenko, Kopy, 2022]. In this paper, the seasonal aspect of the composition, structure and quantitative development of the macrozoobenthos is considered, using the example of a benthic survey of the soft sediments performed

in spring and autumn 2013. A total of 96 macrozoobenthos species were recorded in Kruglaya Bay in 2013, including 41 Annelida, 21 Mollusca, and 27 Crustacea. With a significant difference in the number of species (82 species in spring, 59 in autumn), the spring-fall Czekanowsky — Sørensen faunal commonality index was 0.57. In both seasons, the dominant groups in terms of abundance were Annelida (83–87 % of total macrozoobenthos abundance) and in terms of biomass were Mollusca (84–88 % of total macrozoobenthos biomass). The most abundant species, the polychaete worm *Protodorvillea kefersteini*, was highly represented in both seasons, with densities reaching 11 288 ind./m<sup>2</sup>. Significant seasonal differences in quantitative representation of large taxa (Annelida, Mollusca, Crustacea) as well as macrozoobenthos in general were not revealed. Seasonal disturbances in the population size structure of census-forming benthos forms — bivalves *Chamelea gallina*, *Lucinella divaricata*, *Gouldia minima* — were noted. Decrease in the abundance of infauna organisms, especially polychaetes of the family Capitellidae, was noted in autumn. The ratio index of the Capitellidae and Spionidae abundance in May was 2.43, in November — 0.5. It is assumed that the detected seasonal differences are related to changes in the oxygen regime in the near-bottom layer and in the bottom sediment column of the bay during the summer period.

**Keywords:** macrozoobenthos, seasonal dynamics, *Chamelea gallina*, *Protodorvillea kefersteini*, Kruglaya Bay, Black Sea

#### Сведения об авторах

Болтачева  
Наталья  
Александровна кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, Севастополь, 299011, Российская Федерация, nboltacheva@mail.ru

Ревков  
Николай  
Константинович кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, Севастополь, 299011, Российская Федерация, nrevkov@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.07.2022 г.

Принята к публикации 08.04.2024 г.

ПРОБЛЕМА ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ  
И МОРСКАЯ РАДИОХЕМОЭКОЛОГИЯ

УДК [574.583.044:549.88](26)

DOI: [10.21072/eco.2023.28.02](https://doi.org/10.21072/eco.2023.28.02)

МНОГОЛЕТНЯЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БИОМАССЫ ЗООПЛАНКТОНА В РЕГИОНАХ  
МИРОВОГО ОКЕАНА С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ \*

Пионтковский С. А.<sup>1</sup>, Минский И. А.<sup>1,2</sup>, Мегер Я. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Севастопольский государственный университет, Севастополь, Российская Федерация,  
e-mail: [spiontkovski@mail.ru](mailto:spiontkovski@mail.ru)

<sup>2</sup>ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,  
г. Севастополь, Российская Федерация

**Аннотация:** В водных экосистемах зоопланктон является важным промежуточным звеном в трансформации вещества и энергии от продуцентов (фитопланктон) к консументам (мелкие пелагические рыбы и другие организмы). Под воздействием природных факторов структурные и функциональные свойства сообществ зоопланктона подвержены многомасштабной пространственно-временной изменчивости. При этом возрастающее антропогенное воздействие выступает дополнительным и всё более значимым фактором. Для выявления трендов межгодовой изменчивости в регионах, различающихся фоновыми концентрациями нефтяных углеводородов (Персидский залив, Мексиканский залив, Каспийское море, Чёрное море и Средиземное море), выполнен анализ биомассы зоопланктона с 1970-х годов до первых декад 21-го века. Регионы ранжированы в соответствии с уровнем загрязнения нефтяными углеводородами. Для анализа временных трендов суммарной биомассы в верхнем 200-метровом слое использованы материалы опубликованных статей и международная база данных по зоопланктону (COPEPOD). В качестве фоновых характеристик использованы данные по температуре поверхности моря и концентрации хлорофилла *a* как показателя биомассы фитопланктона. Основу биомассы зоопланктона в исследованных регионах формировали мелкие Copepoda. Отмечено наличие монотонных отрицательных трендов биомассы зоопланктона в регионах с высокой фоновой концентрацией нефтяных углеводородов и их отсутствие в регионах со сравнительно низкими концентрациями.

**Ключевые слова:** зоопланктон, нефтяное загрязнение, межгодовая изменчивость, хлорофилл *a*, температура поверхности моря

## Введение

Оценка биомассы зоопланктона является составной частью глобального мониторинга Мирового океана и его морей. Необходимость оценки предопределена той важной ролью, которую зоопланктон играет в формировании структуры и функционировании морских экосистем, являясь промежуточным звеном в трансформации вещества и энергии по трофическим цепям [Ratnarajah et al., 2023]. Мониторинг биомассы планктона в различных регионах позволил выявить тренды её многолетней изменчивости [Пионтковский, Минский, Мегер, 2023; Boyce et al., 2020; Gregg, Rousseaux, 2019; Kröncke et al., 2019; Piontkovski, Serikova, 2022; Roxy et al., 2016].

\*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00007). Авторы признательны Е. Ю. Георгиевой и Ю. А. Загородней (ИнБИОМ) за данные по биомассе фитопланктона и зоопланктона северной части Чёрного моря, а также А. Н. Коршенко (ГОИН) за данные по нефтяным углеводородам.

Наличие отрицательных трендов чаще всего связывают с глобальным потеплением и его следствием: усилением термогалинной стратификации верхних слоёв океана, что препятствует поступлению биогенов в эвфотический слой и отрицательно влияет на биомассу фитопланктона и первичную продукцию [Behrenfeld et al., 2016; Sallée et al., 2021]. Трофодинамические взаимодействия распространяют отрицательный эффект по трофической цепи экосистем. В силу пространственно-временной изменчивости термогалинной структуры и динамических процессов океан регионально неоднороден по характеру многолетних трендов: наряду с отрицательными существуют и положительные [Пионтковский, Минский, Мереп, 2023; Steinberg, Lomas, Cope, 2012]. При этом океан регионально неоднороден не только по природным факторам, но и по антропогенной нагрузке на шельф. В этой нагрузке по экологической значимости доминирует нефтяное загрязнение, о чём свидетельствует ретроспективный анализ экологических ситуаций в континентальных морях [Polinov, Boorman, Levin, 2021].

Попадая в верхние слои, коагулированная фракция нефтяных углеводородов становится частью пищевого рациона организмов зоопланктона, которые аккумулируют её в теле [Bejarano et al., 2006; Gyllenburg, 1981], а также передают далее по трофической цепи [Hebert, Poulet, 1980; Lee, Köster, Paffenhöfer, 2012]. Организмы зоопланктона более чувствительны к нефтяному загрязнению по сравнению с фитопланктоном, что объясняется различной потребностью в кислороде и различием порогов критических (летальных) концентраций углеводородов [Hallare, Lasafin, Magallanes, 2011; Jiang et al., 2010; Isukul, Ideozu, Udom, 2023].

Основными источниками нефтяного загрязнения океана являются выходы сырой нефти с морского дна (составляющие около 50 % всех утечек), утечки при бурении и обслуживании нефтяных скважин, аварийные разливы при судоходстве и континентальные стоки с нефтесодержащими отходами [Патин, 2017]. При эксплуатации природных ресурсов экосистемы шельфа испытывают наибольшие нагрузки, что обуславливает необходимость их рационального использования и разработки унифицированной системы их экологического мониторинга. В его основе лежат концепции больших морских экосистем [Sherman, 2014] и мониторинга индексов здоровья экосистем [Halpern et al., 2012].

Задачей наших исследований был сравнительный анализ многолетних трендов биомассы зоопланктона в регионах, наиболее подверженных нефтяному загрязнению. К таковым можно отнести континентальные моря (Средиземное, Чёрное, Каспийское) и заливы Мирового океана с большими объёмами нефтедобычи (Мексиканский и Персидский). Рабочая гипотеза состояла в том, что в регионах с высоким уровнем нефтяного загрязнения существует отрицательный наклон многолетних трендов биомассы зоопланктона, в то время как в регионах со сравнительно низким уровнем загрязнения концентрация нефти перестаёт быть доминирующим фактором и наклоны могут быть иными (положительными или нулевыми).

## **Материалы и методы**

Общая характеристика регионов представлена в таблице 1. Указанные диапазоны нефтяного загрязнения приближительны и охватывают несколько различающиеся периоды сбора планктонных проб. Для анализа временных трендов суммарной биомассы в верхнем 200-метровом слое были использованы материалы опубликованных статей и международная база данных по зоопланктону «COPROP» [O'Brien, 2005], из которой были выбраны временные серии среднегодовых значений по регионам.

Дополнительные материалы по планктону Чёрного моря были любезно предоставлены коллегами из Института биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН. При анализе данных биомасса была разделена на кормовой зоопланктон и некормовой (желетель). Основу

кормового зоопланктона (как рациона мелких пелагических рыб) формировали организмы размером 0,2–2,0 мм, среди которых массовыми являются, как правило, веслоногие ракообразные (*Copepoda*). Распределение соотношения биомассы кормового и желетелого зоопланктона рассмотрено нами в другой работе [Пионтковский, Минский, Мегер, 2023].

Таблица 1

Общие характеристики регионов

Регион и координаты	Годы измерений	Нефтяное загрязнение, мкг л <sup>-1</sup>	Зоопланктон	Источник
Персидский залив, 28–30° с. ш., 48–52° в. д.	1991–2020	190* 7–15	Расчётный метод**	[Elshobargy, 2005]
Каспийское море, 38–40° с. ш., 50–55° в. д.	2001–2019	30–50	Планктонная сеть с ячейей 100–500 мкм	[Качество морских вод, 2023]
Мексиканский залив, 28–30° с. ш., 90–95° з. д.	1982–2008	0,4–43	Сеть Бонго с ячейей 333 мкм	[Gulf State Fisheries ... ; Murawski et al., 2016]
Чёрное море (шельф Крыма), 44,5–45° с. ш., 34–36° з. д.	2000–2022	19 ± 13**	Сеть Джеди с ячейей 145 мкм	[Обзор состояния ... , 2022; Коршенко и др., 2023]
Море Альборан, 35–40° с. ш., 2–5° з. д.	1974–2005	7–26	Сеть Бонго с ячейей 200 мкм	[Zsolnay, 1979]

\*Разлив нефти в период военных действий 1991 г. \*\*См. раздел «Результаты»

Данные по нефтяному загрязнению в регионах взяты из разных источников (табл. 1). Эти данные фрагментарны, что не позволило решить задачу построения среднегодовых временных серий концентрации нефтяных углеводородов (за исключением крымского шельфа), поэтому при сопоставлении регионов были использованы диапазоны фоновых концентраций, которые не имеют надёжной статистики.

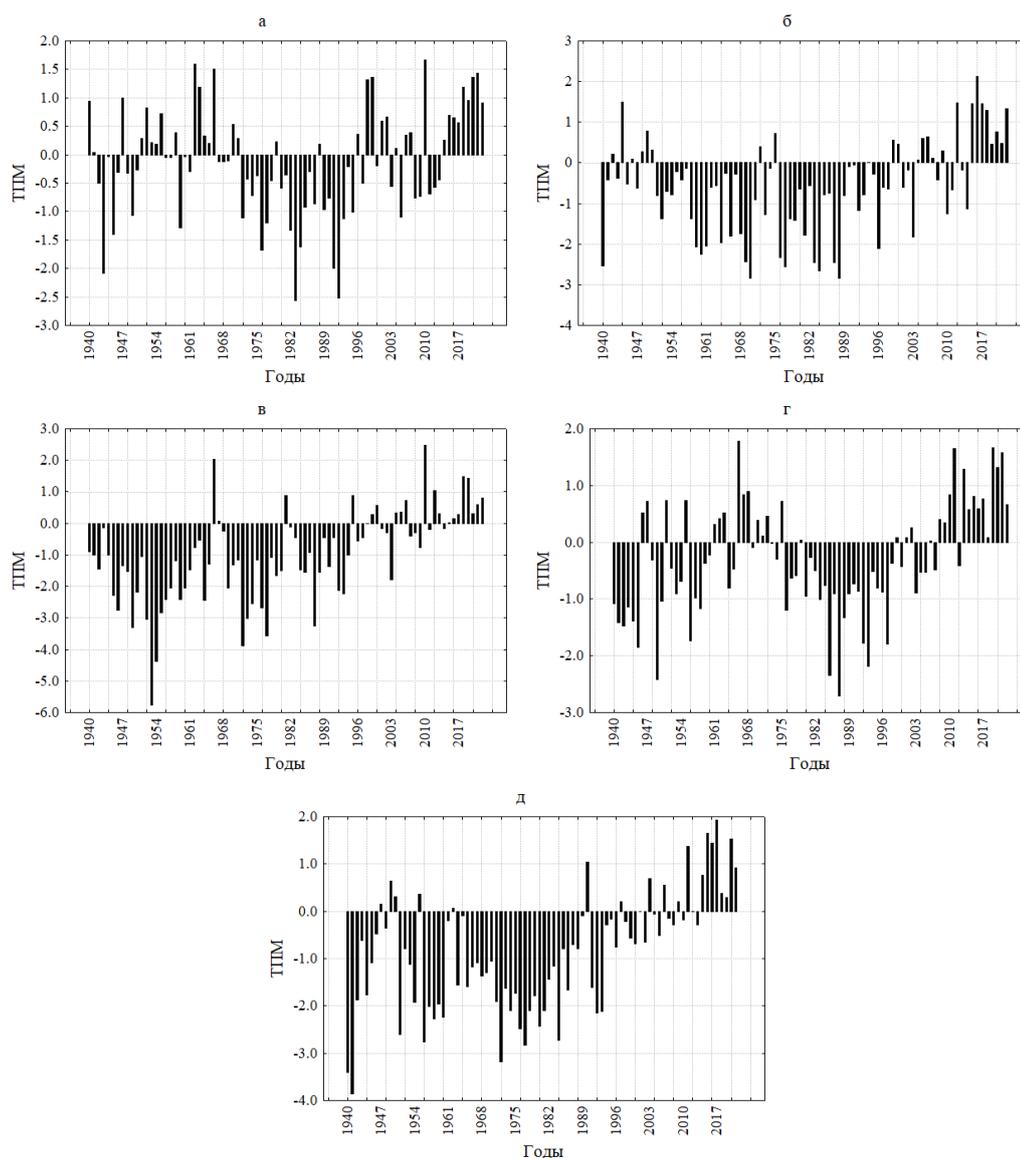
Для анализа многолетних временных серий температуры поверхности и концентрации хлорофилла *a* использовали базы данных HadISST1.1, Giovanni и Reanalysis (ECMWF ERA5) [HadISST1.1 ... ; Giovanni. The Bridge ... ; Monthly Reanalysis ... ].

Для графического представления и статистической обработки использованы программные пакеты Statistica v.9 и PAST v.3.25, позволяющие применять методы линейной и нелинейной статистики в оценках пространственно-временного распределения изучаемых характеристик. В частности, проверка статистической значимости монотонного многолетнего тренда во временных сериях базировалась на непараметрическом критерии Манна — Кендалла, применяемом в анализе временных серий в гидрофизике и гидрометеорологии [Wang et al., 2020]. В этом тесте параметр  $Z$  следует нормальному распределению с  $E(Z) = 0$   $V(Z) = 1$ . Нулевая гипотеза  $H_0$  (о статистической незначимости тренда) отвергается при абсолютном значении  $Z > Z_{1-a/2}$ , где  $a$  — принятый уровень значимости (в нашем случае  $a = 0,05$ ). При  $p$ -значении теста ниже принятого уровня значимости во временной серии присутствует монотонный тренд.

## Результаты

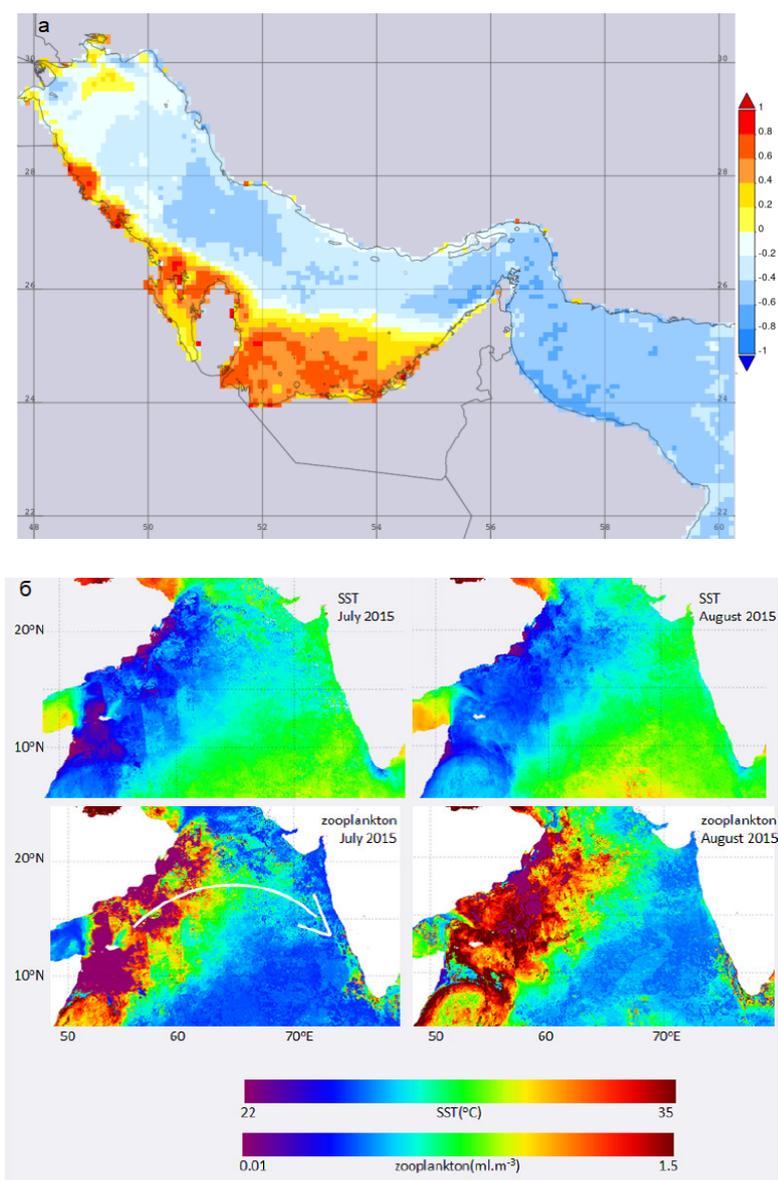
Исходя из рабочей гипотезы, выбранные для анализа регионы были ранжированы по объёмам нефтеперевозок, объёму и количеству разливов нефти и фоновым характеристикам концентрации нефтяных углеводородов, приводимых в литературе. При этом все районы оказались расположенными в сравнительно узком широтном поясе северного полушария ( $28\text{--}46^\circ$  с. ш.) (табл. 1). При изложении результатов первыми представлены океанические регионы, за которыми следуют регионы континентальных морей.

Графическое представление многолетней изменчивости температуры поверхности показало, что характерным свойством большинства временных серий в исследованных регионах является фаза положительных аномалий, начало которой приходится на первую декаду 21-го века (рис. 1).



**Рис. 1.** Временные серии среднегодовых отклонений температуры поверхности моря в исследованных регионах: Персидском заливе (а), Мексиканском заливе (б), южной части Каспийского моря (в), северной части Чёрного моря (г) и море Альборан (д)

**Персидский залив.** Война между Ираком и Кувейтом в 1991 г. привела к экологической катастрофе, которой по масштабам нет равных в истории антропогенных нагрузок на экосистемы шельфа. Объём разлитой нефти оценивался примерно в 2 млн тонн [State of the Marine ... , 2003]. В последующие годы Персидский залив был (и остаётся) самым нагруженным, обеспечивая 70 % мировых перевозок нефти. В результате нефтяное загрязнение в совокупности с другими антропогенными факторами привело к значительной деградации залива как экосистемы [Sheppard, 1993; Sheppard et al., 2010]. Что касается экологического мониторинга, то нам не удалось найти данных по многолетним измерениям биомассы зоопланктона, поэтому оценка характера тренда построена на косвенных расчётах. К таковым относятся данные по температуре поверхности моря и концентрации хлорофилла *a* (рис. 2).



**Рис. 2.** Распределение коэффициента корреляции концентрации хлорофилла *a* с температурой поверхности моря в Персидском и Оманском заливах (а). Пример соотношения пространственного распределения температуры поверхности моря и биомассы зоопланктона в северо-западной части Аравийского моря (б) [Dwiwedi et al., 2016]. Белая стрелка указывает направление генерального переноса биомассы зоопланктона из зоны Оманского прибрежного апвеллинга

Распределение коэффициента корреляции хлорофилла *a* с температурой поверхности моря указывает на существование обширной зоны отрицательных значений, охватывающей большую часть залива. Фрагментарные исследования зоопланктона показывают доминирование мелких копепод родов *Oithona*, *Paracalanus*, *Oncaea* и *Temoga* в суммарной численности организмов [Al-Yamani et al., 1998; Hamza et al., 2020]. Поскольку фитопланктон является основой их рациона, можно предположить, что многолетний тренд биомассы зоопланктона имеет отрицательный знак, так как тренд температуры поверхности моря в регионе положителен [Al-Rashidi et al., 2009]. Характерно, что значения коэффициента корреляции между температурой поверхности моря и концентрацией хлорофилла *a* нарастают в восточном направлении от Персидского залива — к Оманскому. В последнем видовое разнообразие и биомасса зоопланктона значительно выше [Piontkovski et al., 2019].

Другой способ оценки знака тренда в многолетней изменчивости биомассы зоопланктона в данном регионе основан на использовании алгоритма расчёта биомассы зоопланктона по дистанционным измерениям взвешенного органического углерода и температуры поверхности моря [Dwiwedi et al., 2016]. Данные по пространственному распределению указывают на отрицательную корреляцию между температурой поверхности и биомассой зоопланктона (рис. 2). Следовательно, положительный тренд температуры поверхности моря сопровождается отрицательным трендом биомассы.

**Мексиканский залив.** Взрыв на нефтедобывающей платформе Deepwater Horizon в 2010 г. привёл к разливу нефти в объёме 700 тысяч тонн [Noirungsee et al., 2020]. Наряду с этим район изобилует природными источниками (сипами) многолетнего поступления нефти в воды залива в связи с залеганиями нефтеносных пластов на малых глубинах шельфа.

Временная серия биомассы зоопланктона характеризует центральную часть шельфа штата Луизиана, на котором полевые съёмки были выполнены по сетке океанографических станций с последующим осреднением данных до среднегодовых величин (рис. 3). В пробах из интегрального слоя, собранных над шельфом, отклонения от средней аппроксимированы отрицательным трендом, показанным пунктиром. Тест Манна — Кендалла также свидетельствует о наличии монотонного тренда ( $S = -132$ ,  $Z = 2,59$ ,  $p = 0,01$ ). Мелкие копеподы (0,5–2,5 мм) родов *Oithona*, *Oncaea*, *Farranula*, *Coquasaeus* и др. вносили наибольший вклад в биомассу зоопланктона [Daly et al., 2021].

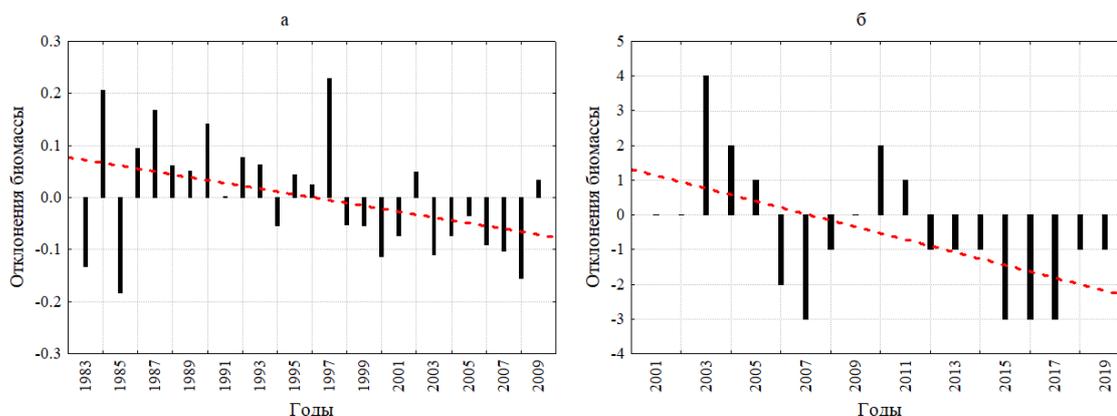
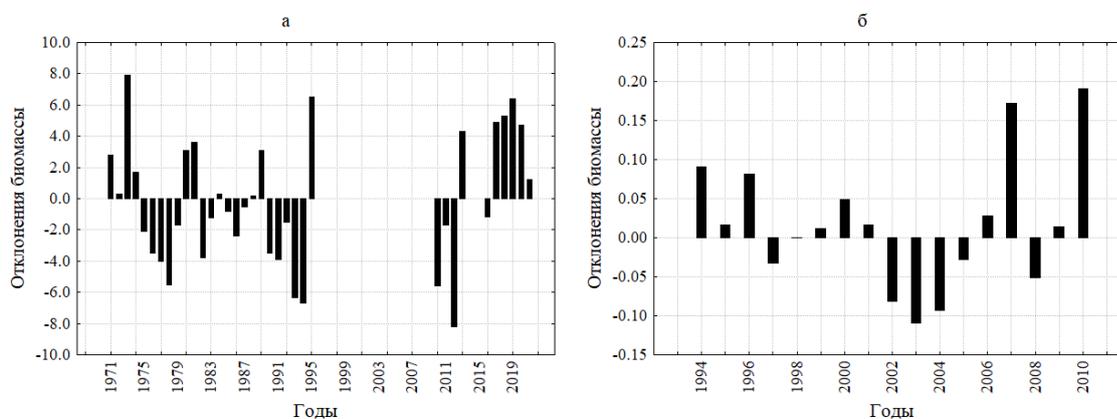


Рис. 3. Многолетняя изменчивость отклонений биомассы зоопланктона в Мексиканском заливе (а) [Seamap] и в южной части Каспийского моря (б) [Roohi et al., 2021]

**Каспийское море.** По объёму нефтеперевозок регион занимает третье место в выстроенной системе рангов (табл. 1). Его геоморфологической особенностью является большое количество грязевых вулканов и сипов (их более 400 в южной части моря), производящих большой объём выбросов нефти (около 500 тонн в сутки) параллельно с большими утечками при нефтедобыче. Оба процесса генерируют нефтяные плёнки площадью около 1000 квадратных километров с количеством пятен, растущим по годам [Mityagina, Lavrova, 2016].

Временная серия биомассы зоопланктона, полученная после обработки проб, характеризует южную часть моря (рис. 3). Основу биомассы кормового зоопланктона составляли копеподы родов *Acartia*, *Eurytemora*, *Limnocalanus* и др., видовое разнообразие которых заметно уменьшилось за указанный период сбора проб [Roohi et al., 2021]. Отклонения от средней биомассы аппроксимированы отрицательным трендом. Тест Манна — Кендалла также свидетельствует о его наличии ( $S = -65$ ,  $Z = 2,30$ ,  $p = 0,02$ ). Монотонный отрицательный тренд характерен и для биомассы массового вида-вселенца, относящегося к желетелым организмам, — *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz 1865 ( $S = -85$ ,  $Z = 4,21$ ,  $p = 0,003$ ).

**Чёрное море.** Наряду с проливом Босфор северная часть моря относится к регионам с наибольшей нагрузкой, возникающей вследствие морских транспортных перевозок, включая и транспорт нефти. По данным многолетнего мониторинга, концентрация нефтяных углеводородов в северной части моря составляла 3,0–9,0 мкг л<sup>-1</sup>. Временная серия межгодовой изменчивости биомассы зоопланктона на шельфе Крыма была любезно предоставлена Ю. А. Загородней (рис. 4). Основу биомассы зоопланктона в ней составляли мелкие копеподы родов *Pseudocalanus*, *Paracalanus*, *Oithona*, *Calanus*, *Centropages* и *Acartia* [Загородняя, Темных, Морякова, 2007].



**Рис. 4.** Многолетняя изменчивость отклонений биомассы зоопланктона от средней на шельфе Крыма (а) и в Средиземноморском бассейне (б) (Море Альборан) [Copepod. Interactive ... ]

Межгодовая динамика отклонений биомассы от средней указывает на отсутствие монотонного тренда во временной серии. Отсутствовал он и в межгодовой изменчивости биомассы фитопланктона интегрального слоя над шельфом. Однако её оценки охватывали лишь первые декады 21-го века.

Среди рассматриваемых регионов шельф Крыма оказался единственным с доступными многолетними данными по среднегодовым концентрациям нефтяных углеводородов в 2000–2022 гг. [Коршенко и др., 2023]. Их статистический анализ показал отсутствие межгодового тренда во временных сериях, построенных для районов Севастополя, Ялты, Керчи, и временной серии пространственно осреднённых величин для шельфа (тест Манна — Кендала,  $S = -24$ ,  $Z = 0,61$ ,  $p = 0,54$ , для средней по шельфу).

**Средиземное море.** Западная часть Средиземноморского бассейна (море Альборан) является одной из самых продуктивных и самых загрязнённых, поскольку все маршруты нефтеналивных танкеров, как и маршруты других судов, курсирующих между Средиземным морем и Атлантикой (около 90 000 судов в год), проходят в этих водах. Для данного региона были проанализированы две временные серии. В пробах зоопланктона первой серии многолетний мониторинг позволил выявить положительный тренд суммарной численности организмов на шельфе с 1992 по 2020 г., в то время как в прибрежных районах таковой отсутствовал [Yebra et al., 2022].

На восток от этой станции располагалась станция со второй временной серией (с координатами 39°29' с. ш., 2°25' в. д., у острова Майорка). Пробы зоопланктона были собраны в 1994–2005 гг. [Fernandes de Puellas, Valencia, Vicente, 2004]. Многолетняя изменчивость биомассы зоопланктона не обнаружила статистически значимого тренда (рис. 4). В обоих регионах в пробах доминировали мелкоразмерные копеподы родов *Clausocalanus* и *Oithona*. Что касается характеристик фитопланктона, то для разных районов моря Альборан в целом характерен нулевой или слабоотрицательный межгодовой тренд концентрации «спутникового» хлорофилла [Copernicus Marine ... ].

### Обсуждение результатов

Результаты статистического анализа трендов по регионам не противоречат нашей рабочей гипотезе. В её основе лежат известные факты стрессового влияния нефтяных углеводородов различной концентрации как на физиологию организмов зоопланктона, так и на динамику их популяций через повышенную смертность: ароматические углеводороды (бензол, этилбензол, толуол и др.) растворимы в воде и быстро проникают в живые клетки, разрушая клеточные мембраны. При концентрациях нефтяных углеводородов, превышающих 50 мкг л<sup>-1</sup> (которая в российской государственной программе мониторинга стандартизирована как ПДК), отмечены снижение скорости роста и репродукции зоопланктонных организмов, а при больших концентрациях — сублетальные и летальные эффекты [Патин, 2017; Avila, Bersano, Fillmann, 2010].

Из регионов, выбранных для сравнительного анализа, высокие концентрации нефтяных углеводородов характерны для Персидского залива, Мексиканского залива и южной части Каспийского моря. Отрицательные тренды биомассы характерны для всех трёх регионов. В Чёрном море (на крымском шельфе в районе г. Ялты) и Средиземноморском бассейне (в море Альборан), где фоновые концентрации нефти меньше, отрицательных трендов биомассы зоопланктона отмечено не было.

Вместе с тем следует отметить и факт совокупного действия природных и антропогенных факторов, что затрудняет оценку их отдельного влияния. Так, многолетний стресс нефтяного загрязнения существует на фоне многолетнего увеличения температуры в верхних слоях океана, которое влияет как на физиологические процессы [Машукова, Силаков, 2020], так и (опосредованно) на динамику численности организмов зоопланктона через их смертность [Avila, Bersano, Fillmann, 2010]. Влияние температуры может быть опосредованным и через концентрацию растворённого кислорода, которая уменьшается во всех трёх названных регионах, где отмечен отрицательный тренд биомассы [Lachkar et al., 2022; Rabalais, Turner, 2019; Tuzhilkin, Katunin, Nalbandov, 2005]. При этом, как известно, увеличение температуры уменьшает растворимость кислорода в воде [Корякин и др., 2015].

В исследованных регионах на фоне глобальных многолетних трендов температуры поверхности очевидны и её значительные межгодовые колебания (рис. 1). Они модулируются атмосферными аномалиями, трансформирующими своё влияние (через поле ветра) в межгодовую динамику течений в верхнем слое океана, в изменчивость термогалинной структуры

и в конечном итоге в межгодовую изменчивость биомассы зоопланктона. Это находит отражение в корреляции биомассы с индексами крупномасштабных атмосферных аномалий. Например, для северной части Атлантического океана и Черноморского региона часто используют индекс Северо-Атлантического колебания, известный в иностранной литературе как North Atlantic Oscillation [Oguz, Dippner, Kaymaz, 2006].

Положительные и отрицательные фазы этого колебания отражают чередование холодных сухих и тёплых дождливых зим в Северной Америке и Восточной Европе. Для корреляции межгодовых колебаний биомассы зоопланктона и этого индекса характерны временные лаги, вызванные опосредованным характером их связи [Piontkovski et al., 2006].

Для понимания комплексного характера влияния на зоопланктон к абиотическим факторам следует добавить биотические, регулирующие это промежуточное структурное звено экосистемы «снизу» и «сверху». При этом добавляется фактор обеспеченности зоопланктона пищей (т. е. фитопланктоном) и трофический пресс «верхних» хищников (мелких пелагических рыб).

Таким образом, влияние природных факторов в совокупности с антропогенными может разнопланово регулировать качественный характер трендов многолетней изменчивости биомассы зоопланктона (их положительный или отрицательный наклон) в зависимости от соотношения силы влияния этих факторов в данном регионе. Проблема оценки доминирующих факторов обычно решается методами многофакторного анализа, но в данном случае формирование временных серий было лимитировано недостатком многолетних измерений ряда экологически значимых характеристик в регионах.

### Выводы

Ретроспективный сравнительный анализ данных по межгодовой изменчивости биомассы зоопланктона (с 1970-х годов до первых декад 21-го века) показал наличие монотонных отрицательных трендов в регионах с высокой фоновой концентрацией нефтяных углеводородов и отсутствие таких трендов в регионах со сравнительно низкими концентрациями углеводородов. Основу биомассы в исследованных регионах составляли мелкие ракообразные.

### Список литературы

1. Загородняя Ю. А., Темных А. В., Морякова В. К. Сезонные изменения голопланктона в прибрежной зоне Чёрного моря в 2002 г. // Морской экологический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 31–42.
2. Качество морских вод по гидрохимическим показателям : Ежегодник, 2021 / Федер. служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, Гос. океаногр. ин-т им. Н. Н. Зубова ; под общ. ред. Н. Н. Коршенко. – Москва : ГОИН. 2023. – 248 с.
3. Коршенко А. Н., Костылева А. В., Жохова Н. В., Долгова А. О., Мезенцева И. В., Мальченко Ю. А., Дьяков Н. Н., Зайцева О. И., Брайко О. И., Фурник Д. В., Алексеенко А. И., Дербичева Т. И., Кобец С. В. Черное море // Качество морских вод по гидрохимическим показателям : Ежегодник, 2021 / Федер. служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, Гос. океаногр. ин-т им. Н. Н. Зубова ; под общ. ред. Н. Н. Коршенко. – Москва : ГОИН. 2023. – Гл. 3. – С. 70–105.
4. Корякин А. Ю., Колесникова И. М., Кильянова М. Ю., Колесников С. И. Содержание кислорода в водных системах и его влияние на состояние систем // Территория Нефтегаз. – 2015. – № 3. – С. 70–74.

5. Машукова О. В., Силаков М. И. Сравнительная характеристика воздействия нефтепродуктов на биолюминесценцию черноморских гребневиков-вселенцев *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 и *Beroe ovata* Mayer, 1912 // Труды Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского – природного заповедника РАН. – 2020. – № 4. – С. 58–67. – <https://doi.org/10.21072/eco.2021.16.06>
6. Обзор состояния и загрязнения окружающей среды в Российской Федерации за 2021 год // Росгидромет : [сайт]. – 2022. – URL: <https://www.meteorf.gov.ru/product/infomaterials/90/?year=2021&ID=90> (дата обращения: 18.12.2023).
7. Патин С. А. Нефть и экология континентального шельфа. В 2 т. Т. 2. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : ВНИРО, 2017. – 284 с.
8. Пионтковский С. А., Минский И. А., Мегер Я. В. Соотношение биомассы желтелого и кормового зоопланктона в Мировом океане // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2023. – Т. 8, № 1. – С. 93–98.
9. Al-Rashidi T. B., El-Gamily H. I., Amos C. L., Rakha K. A. Sea surface temperature trends in Kuwait Bay, Arabian Gulf // Natural Hazards. – 2009. – Vol. 50. – P. 73–82. – <https://doi.org/10.1007/s11069-008-9320-9>
10. Al-Yamani F., Al-Rifaie K., Al-Mutairi H., Ismail W. Post-spill spatial distribution of zooplankton in the ROPME sea area // Offshore Environment of the ROPME Sea Area after the War-Related Oil Spill / eds A. Otsuki [et al.]. – Tokyo : Terra Sci. publ. co, 1998. – P. 193–202.
11. Avila T. R., Bersano J. G. F., Fillmann G. Lethal and sublethal effects of the water-soluble fraction of a light crude oil on the planktonic copepod *Acartia tonsa* // Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology. – 2010. – Vol. 5, iss. 1. – P. 19–25.
12. Behrenfeld M. J., O'Malley R. T., Boss E. S., Westberry T. K., Graff J. R., Halsey K. H., Milligan A. J., Siegel D. A., Brown M. B. Revaluating ocean warming impacts on global phytoplankton // Nature Climate Change. – 2016. – Vol. 6, iss. 3. – P. 323–330. – <https://doi.org/10.1038/nclimate2838>
13. Bejarano A. C., Chandler G. T., He L., Coull B. C. Individual to population level effects of South Louisiana crude oil water accommodated hydrocarbon fraction (WAF) on a marine meiobenthic copepod // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. – 2006. – Vol. 332, iss. 1. – P. 49–59. – <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.11.006>
14. Boyce D. G., Lotze H. K., Tittensor D. P., Carozza D. A., Worm B. Future ocean biomass losses may widen socioeconomic equity gaps // Nature Communications. – 2020. – Vol. 11. – Art. 2235. – <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15708-9>
15. Copepod. Interactive time-series explorer // Copepod. The Global Plankton Database project : [site] / Nat. Oceanic and Atmospheric Administration. – URL: <https://www.st.nmfs.noaa.gov/copepod/toolkit/overview.html> (access date: 07.12.2023).
16. Copernicus Marine Data Store : [site]. – URL: <https://data.marine.copernicus.eu/products> (accessed date: 18.02.2024).
17. Daly K. L., Remsen A., Outram D. M., Broadbent H., Kramer K., Dubickas K. Resilience of the zooplankton community in the northeast Gulf of Mexico during and after the Deepwater Horizon oil spill // Marine Pollution Bulletin. – 2021. – Vol. 163. – Art. 111882. – <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111882>
18. Dwiwedi R., Priyaja P., Baliarsingh S. K., Kumar T. S., Shenoi S. S. C. Basin-Scale Retrieval of Zooplankton Using Split Algorithm and MODIS Data in the Arabian Sea : techn. report : ESSO/INCOIS/ASG/TR/07 / Ind. Nat. Centre for Ocean Inform. Services [et al.]. – Hyderabad, India : INCOIS, 2016. – 18 p.
19. Elshobargy W. Overview of marine pollution in the Arabian Gulf with emphasis on pollutant transport modeling // Arabian Coast – 2005, Dubai, 15 Oct. 2005 : [conference]. – URL: [https://www.academia.edu/2595870/Overview\\_of\\_marine\\_pollution\\_in\\_the\\_Arabian\\_Gulf\\_with\\_emphasis\\_on\\_pollutant\\_transport\\_modeling](https://www.academia.edu/2595870/Overview_of_marine_pollution_in_the_Arabian_Gulf_with_emphasis_on_pollutant_transport_modeling) (access date: 20.02.2024).

20. *Fernandes de Puellas M. L., Valencia J., Vicente L.* Zooplankton variability and climatic anomalies from 1994 to 2001 in the Balearic Sea (Western Mediterranean) // *ICES Journal of Marine Science*. – 2004. – Vol. 61, iss. 4. – P. 492–500. – <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2004.03.026>
21. Giovanni. The Bridge Between Data and Science : [database] / Nat. Aeronautics and Space Administration. – URL: <https://giovanni.gsfc.nasa.gov> (access date: 12.12. 2023).
22. *Gregg W. W., Rousseaux C. S.* Global ocean primary production trends in the modern ocean color satellite record (1998–2015) // *Environmental Research Letters*. – 2019. – Vol. 14, nr 12. – Art. 124011. – <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab4667>
23. Gulf State Fisheries commission. Southeast Area Monitoring and Assessment Program (SEAMAP). – URL: <https://www.gsmfc.org/seamap> (accessed date: 18.02.2024).
24. *Gyllenburg G.* Ingestion and turnover of oil and petroleum hydrocarbons by two planktonic copepods in the Gulf of Finland // *Annales Zoologici Fennici*. – 1981. – Vol. 18. – P. 225–228.
25. HadISST1.1 – Global Monthly Mean Gridded SSTs (1870–2015) / Hadley Centre for Climate Prediction and Research // CEDA. Archive : [database] / The Centre for Environmental Data Analysis. – 2007. – URL: <https://catalogue.ceda.ac.uk/uuid/542291c0956a3e4ea2c5085f1a31b94a> (access date: 08.12.2023).
26. *Hallare A. V., Lasafin K. J. A., Magallanes J. R.* Shift in phytoplankton community structure in a tropical marine reserve before and after a major oil spill event // *International Journal of Environmental Research*. – 2011. – Vol. 5, iss. 3. – P. 651–660. – <https://doi.org/10.22059/ijer.2011.372>
27. *Halpern B. S., Longo C., Hardy D., McLeod K. L., Samhoury J. F., Katona S. K., Kleisner K., Lester S. E., O’Leary J., Ranelletti M., Rosenberg A. A., Scarborough C., Selig E. R., Best B. D., Brumbaugh D. R., Chapin F. S., Crowder L. B., Daly K. L., Doney S. C., Elfes C., Fogarty M. J., Gaines S. D., Jacobsen K. I., Karrer L. B., Leslie H. M., Neeley E., Pauly D., Polasky S., Ris B., Martin K. S., Stone G. S., Sumaila U. R., Zeller D.* An index to assess the health and benefits of the global ocean // *Nature*. – 2012. – Vol. 488, iss. 7413. – P. 615–620. – <https://doi.org/10.1038/nature11397>
28. *Hamza W., Aljunaibi M., Piontkovski S., Al Hashmi K.* Comparative plankton dynamics in Arabian Gulf and Sea of Oman at opposite sides of the strait of Hormuz // *GEOLINKS International Conference, Plovdiv, 2020, 05–07 Oct.* – Plovdiv : SAIMA CONSULT LTD, 2020. – Bk. 2, vol. 2. – <https://doi.org/10.32008/geolinks2020/b2/v2/01>
29. *Hebert R., Poulet S. A.* Effect of modification of particle size of emulsions of venezuelan crude oil on feeding, survival and growth of marine zooplankton // *Marine Environmental Research*. – 1980. – Vol. 4, iss. 2. – P. 121–134. – [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(80\)90050-1](https://doi.org/10.1016/0141-1136(80)90050-1)
30. *Isukul A. O., Ideozu R. U., Udom G. J.* The effect of crude oil spill on plankton abundance in Santa Barbara River, Nembe, Bayelsa State // *International Journal of Agriculture and Environmental Research*. – 2023. – Vol. 9, iss. 3. – P. 289–304. – <https://doi.org/10.51193/IJAER.2023.9303>
31. *Jiang Z., Huang Y., Xu X., Liao Y., Shou L., Liu J., Chen Q., Zeng J.* Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton // *Acta Ecologica Sinica*. – 2010. – Vol. 30, iss. 1 – P. 8–15. – <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2009.12.002>
32. *Kröncke I., Neumann H., Dippner J. W., Holbrook S., Lamy T., Miller R., Padedda B. M., Pulina S., Reed D. C., Reinikainen M., Satta C. T., Sechi N., Soltwedel T., Suikkanen S., Lugliè A.* Comparison of biological and ecological long-term trends related to northern hemisphere climate in different marine ecosystems // *Nature Conservation*. – 2019. – Iss. 34. – P. 311–341. – <https://doi.org/10.3897/natureconservation.34.30209>
33. *Lachkar Z., Mehari M., Lévy M., Paparella F., Burt J. A.* Recent expansion and intensification of hypoxia in the Arabian Gulf and its drivers // *Frontiers in Marine Science*. – 2022. – Vol. 9. – Art. 891378. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2022.891378/full> – Publication date: 07.09.2022.

34. Lee R. F., Köster M., Paffenhöfer G.-A. Ingestion and defecation of dispersed oil droplets by pelagic tunicates // *Journal of Plankton Research*. – 2012. – Vol. 34, iss. 12. – P. 1058–1063. – <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs065>
35. Mityagina M., Lavrova O. Satellite survey of inner seas: oil pollution in the Black and Caspian seas // *Remote Sensing*. – 2016. – Vol. 8, iss. 10. – Art. 875. – <https://doi.org/10.3390/rs8100875>
36. Monthly Reanalysis Time Series // *Climate Reanalyzer* : [database] / Climate Change Inst., Univ. of Maine. – URL: [https://climatereanalyzer.org/research\\_tools/monthly\\_tseries](https://climatereanalyzer.org/research_tools/monthly_tseries) (access date: 23.12.2023).
37. Murawski S. A., Fleeger J. W., Patterson III W. F., Hu C., Daly K., Romero I., Toto-Farmer G. A. How did the Deepwater Horizon oil spill affect coastal and continental shelf ecosystems in the Gulf of Mexico? // *Oceanography*. – 2016. – Vol. 29, nr 3. – P. 161–173. – <https://doi.org/10.5670/oceanog.2016.80>
38. Noirungsee N., Hackbusch S., Viamonte J., Bubenheim P., Liese A., Müller R. Influence of oil, dispersant, and pressure on microbial communities from the Gulf of Mexico // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – Art. 7079. – <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63190-6>
39. O'Brien T. D. COPEPOD: A Global Plankton Database : NOAA Technical Memorandum, NMFS-F/SPO-73 / U. S. Department of Commerce, Nat. Oceanic and Atmospheric Administration. – USA : NOAA, 2005. – 136 p.
40. Oguz T., Dippner J. W., Kaymaz Z. Climatic regulation of the Black Sea hydro-meteorological and ecological properties at interannual-to-decadal time scales // *Journal of Marine Systems*. – 2006. – Vol. 60, iss. 3/4. – P. 235–254. – <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2005.11.011>
41. Piontkovski S. A., Hamza W. M., Al-Abri N. M., Al-Busaidi S. Z., Al-Hashmi K. A. A comparison of seasonal variability of Arabian Gulf and the Sea of Oman pelagic ecosystems // *Aquatic Ecosystem Health & Management*. – 2019. – Vol. 22, nr 2. – P. 108–130. – <https://doi.org/10.1080/14634988.2019.1621133>
42. Piontkovski S. A., O'Brien T. D., Umani S. F., Krupa E. G., Stuge T. S., Balymbetov K. S., Grishaeva O. V., Kasymov A. G. Zooplankton and the North Atlantic oscillation: a basin scale analysis // *Journal of Plankton Research*. – 2006. – Vol. 28, iss. 11. – P. 1039–1046. – <https://doi.org/10.1093/plankt/fbl037>
43. Piontkovski S. A., Serikova I. M. Fading bioluminescence of the tropical Atlantic Ocean // *Luminescence*. – 2022. – Vol. 37, iss. 3. – P. 514–519. – <https://doi.org/10.1002/bio.4188>
44. Polinov S., Boorman R., Levin N. Spatial and temporal assessment of oil spills in the Mediterranean Sea // *Marine Pollution Bulletin*. – 2021. – Vol. 167. – Art. nr 112338. – <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112338>
45. Rabalais N. N., Turner R. E. Gulf of Mexico hypoxia: past, present and future // *Limnology and Oceanography Bulletin*. – 2019. – Vol. 28, iss. 4. – P. 117–124. – <https://doi.org/10.1002/lob.10351>
46. Ratnarajah L., Abu-Alhaija R., Atkinson A., Batten S., Bax N. J., Bernard K. S., Canonico G., Cornils A., Everett J. D., Grigoratou M., Ishak N. H. A., Johns D., Lombard F., Muxagata E., Ostle C., Pitois S., Richardson A. J., Schmidt K., Stemmann L., Swadling K. M., Yang G., Yebra L. Monitoring and modelling marine zooplankton in a changing climate // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14. – Art. 564. – <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36241-5>
47. Roohi A., Kideys A. E., Jolodar M. N., Bandpei M. A., Rostami A. M. Long-term changes in gelatinous zooplankton, mesozooplankton and kilka fish in the Southern Caspian Sea: environmental controls and trophic webs interactions // *Journal of Oceanography and Marine Science*. – 2021. – URL: <https://hdl.handle.net/11511/101110>. – Publication date: 01.12.2021.

48. Roxy M. K., Modi A., Murtugudde R., Valsala V., Panickal S., Kumar S. P., Ravichandran M., Vichi M., Lévy M. A reduction in marine primary productivity driven by rapid warming over the tropical Indian Ocean // *Geophysical Research Letters*. – 2016. – Vol. 43, iss. 2. – P. 826–833. – <https://doi.org/10.1002/2015GL066979>
49. Sallée J.-B., Pellichero V., Akhoudas C., Pauthenet E., Vignes L., Schmidtko S., Garabato A. N., Sutherland P., Kuusela M. Summertime increases in upper-ocean stratification and mixed-layer depth // *Nature*. – 2021. – Vol. 591, iss. 7851. – P. 592–598. – <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03303-x>
50. Seamap: Texas/Louisiana shelf central. Gulf of Mexico : Related Copepod plankton data collections // Copepod. The Global Plankton Database project : [site] / Nat. Oceanic and Atmospheric Administration. – URL: <https://www.st.nmfs.noaa.gov/copepod/time-series/us-50202/> (access date: 16.12.2023).
51. Sheppard C. R. C. Physical environment of the Gulf relevant to marine pollution: an overview // *Marine Pollution Bulletin*. – 1993. – Vol. 27. – P. 3–8. – [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(93\)90003-3](https://doi.org/10.1016/0025-326X(93)90003-3)
52. Sheppard C., Al-Husiani M., Al-Jamali F., Al-Yamani F., Baldwin R., Bishop J., Benzoni F., Dutrieux E., Dulvy N. K., Durvasula S. R. V., Jones D. A., Loughland R., Medio D., Nithyanandan M., Pilling G. M., Polikarpov I., Price A. R. G., Purkis S., Riegl B., Saburova M., Zainal K. The Gulf: a young sea in decline // *Marine Pollution Bulletin*. – 2010. – Vol. 60, iss. 1. – P. 13–38. – <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.10.017>
53. Sherman K. Toward ecosystem-based management (EBM) of the world's large marine ecosystems during climate change // *Environmental Development*. – 2014. – Vol. 11. – P. 43–66. – <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2014.04.006>
54. State of the Marine Environment Report : ROPME/GC-11/003 / Reg. Org. for the Protection of the Marine Environment. – Kuwait : ROPME, 2003. – 217 p.
55. Steinberg D. K., Lomas M. W., Cope J. S. Long-term increase in mesozooplankton biomass in the Sargasso Sea: linkage to climate and implications for food web dynamics and biogeochemical cycling // *Global Biogeochemical Cycles*. – 2012. – Vol. 26, iss. 1. – Art. 1004. – <https://doi.org/10.1029/2010GB004026>
56. Tuzhilkin V. S., Katunin D. N., Nalbandov Y. R. Natural chemistry of Caspian Sea waters // *The Caspian Sea Environment* / eds: Kostianov A. G. and Kosarev A. N. – Berlin [et al.] : Springer, 2005. – P. 83–108. – (The Handbook of Environmental Chemistry ; pt. P). – [https://doi.org/10.1007/698\\_5\\_005](https://doi.org/10.1007/698_5_005)
57. Wang F., Shao W., Yu H., Kan G., He X., Zhang D., Ren M., Wang G. Re-evaluation of the power of the Mann – Kendall test for detecting monotonic trends in hydrometeorological time series // *Frontiers in Earth Science*. – 2020. – Vol. 8. – Art. 14. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/feart.2020.00014/full>. – Publication date: 06.02.2020.
58. Yebra L., Puerto M., Valcarcel-Perez N., Putzeys S., Gómez-Jakobsen F., García-Gómez C., Mercado J. M. Spatio-temporal variability of the zooplankton community in the SW Mediterranean 1992–2020: linkages with environmental drivers // *Progress in Oceanography*. – 2022. – Vol. 203. – Art. 102782. – <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2022.102782>
59. Zsolnay A. Hydrocarbons in the Mediterranean Sea, 1974–1975 // *Marine Chemistry*. – 1979. – Vol. 7, iss. 4. – P. 343–352. – [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(79\)90020-3](https://doi.org/10.1016/0304-4203(79)90020-3)

**LONG-TERM VARIABILITY OF ZOOPLANKTON BIOMASS AND OIL POLLUTION  
IN SOME REGIONS OF THE WORLD OCEAN**

**Piontkovski S. A.<sup>1</sup>, Minsky I. A.<sup>1,2</sup>, Meger Ya. V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation,  
e-mail: [spiontkovski@mail.ru](mailto:spiontkovski@mail.ru)

<sup>2</sup>A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

**Abstract:** Zooplankton act as an important structural constituent of matter and energy transfers in marine ecosystems. Structural and functional properties of zooplankton communities are subjected to multiple scale spatio-temporal variability modulated by natural factors. An increasing anthropogenic impact on pelagic ecosystems acts as the addition to natural factors. A retrospective analysis of data on zooplankton biomass (from the 1970s through first decades of the 21<sup>st</sup> century), was carried out across the regions (namely the Persian Gulf, the Mexican Gulf, the Caspian, Black and Mediterranean seas). These regions were ranked by the oil pollution, respectively. Published papers and international COPEPOD database were employed, to set up time series on the total zooplankton biomass of the upper 200 m layer, across regions for the time range from 1971 to 2020. Sea surface temperature and chlorophyll *a* concentration act as the background characteristics. Small sized copepods set up the base of zooplankton biomass across regions. Inter-annual negative trends were associated with highly polluted regions, while no trends were observed in regions with relatively low pollution.

**Keywords:** zooplankton, oil pollution, inter-annual variability, chlorophyll *a*, sea surface temperature

Сведения об авторах

Пионтковский Сергей Александрович	доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, Российская Федерация, <a href="mailto:spiontkovski@mail.ru">spiontkovski@mail.ru</a>
Минский Иван Александрович	аспирант, ведущий инженер, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, Севастополь, 299011, Российская Федерация, <a href="mailto:ivansimfer@yandex.ru">ivansimfer@yandex.ru</a>
Мегер Яков Васильевич	магистрант, младший научный сотрудник, ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, Российская Федерация, <a href="mailto:megeer@mail.ru">megeer@mail.ru</a>

*Поступила в редакцию 11.12.2023 г.*

*Принята к публикации 28.02.2024 г.*

БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ,  
БИОТЕХНОЛОГИЯ И АКВАКУЛЬТУРА

УДК 579.6.017.85(268.45)

DOI: [10.21072/eco.2023.28.03](https://doi.org/10.21072/eco.2023.28.03)

ОЦЕНКА БИОТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА ШТАММОВ  
МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БАРЕНЦЕВА МОРЯ \*

Кожухова Е. В., Макаревич Е. В., Литвинова М. Ю., Балачина Е. С.

ФГАОУ ВО «Мурманский арктический университет», г. Мурманск, Российская Федерация,

e-mail: [kozkhukhovaev@mstu.edu.ru](mailto:kozkhukhovaev@mstu.edu.ru)

**Аннотация:** Применение в биоремедиации акваторий Баренцева моря активных микроорганизмов-трансформаторов, изолированных непосредственно из природных гидроэкосистем Крайнего Севера, наиболее целесообразно, поскольку изоляты обладают специфичными ферментативными комплексами, адаптированы к факторам окружающей среды, не являются генетически модифицированными и не оказывают токсического действия на других гидробионтов экосистемы. В работе приведена оценка потенциала гетеротрофных микроорганизмов, выделенных из различных районов Баренцева моря, к трансформации фосфор- и углеводородсодержащих соединений на основании комплекса физико-химических показателей (фосфатаккумулирующая и углеводородокисляющая способности, флокулирующая активность биодеструкторов, уровень гидрофобности поверхности бактериальных клеток и индекс эмульгирующей активности нефтепродуктов). Исследуемые культуры в условиях, имитирующих состав опреснённых морских экосистем, проявляли способность к утилизации поллютантов в пределах 25–44 %. Однако в модельных экспериментах из семи тестируемых штаммов всего лишь три культуры (*B. cereus*, *S. proteamaculans* и *Sh. baltica*) показали средний уровень биотрансформирующей активности, достигнув отметки в 43 %.

**Ключевые слова:** гетеротрофные бактерии, Баренцево море, фосфор, углеводороды, микробная трансформация, биофлокуляция.

### Введение

Водные экосистемы Арктического региона характеризуются повышенной уязвимостью и высокой антропогенной нагрузкой. Различные абиотические факторы среды (в первую очередь низкие уровни температуры и инсоляции) приводят к замедлению биологических процессов трансформации различных веществ и отдельных элементов в акватории Баренцева моря [Голубовская, 1978; Очистка производственных ... , 1985]. Несмотря на огромную связь фосфора с развитием жизни в водоёмах, стремительно возрастающие объёмы фосфорсодержащих веществ и низкая интенсивность поглощения органических и минеральных форм фосфора фитопланктоном в климатических условиях Арктики обуславливают неизбежное накопление данного элемента. Переизбыток в водоёмах важнейшего из биогенов приводит к нарушению биологических процессов в водных экосистемах [Бабинова, Герасимова, Орлова, 2003; Экологический мониторинг ... , 2003; Денисов, Павлинова, Климова, 2006; Миндубаев и др., 2011; Кисленко, Колычев, Госманов, 2012; Богданова, 2014; Материалы международной ... , 2019]. Различные участки Баренцева моря также подвержены хроническому влиянию загрязняющих

\*Исследование выполнено в рамках инициативной НИОКР № 124041100063-4 «Изучение структуры и функциональной характеристики микробных сообществ Арктического региона для комплексной оценки их экологической роли и биотехнологического потенциала».

веществ углеводородного происхождения [Ильинский, Коронелли, Семененко, 1990; Ильинский, Измайлов, 1992; Ежегодные доклады ... , 2018–2022]. Ввиду малой растворимости большинства нефтепродуктов в воде, при их попадании в водную среду образуется двухфазная система, что приводит к замедлению процессов биотрансформации токсичных для гидробионтов углеводородов [Ильинский, 2000].

Спецификой круговорота фосфора в природе является незамкнутость цикла, поскольку наблюдается однонаправленный поток данного элемента из горных пород суши в океанические глубины [Benitez-Nelson, 2000; Paytan, McLaughlin, 2007]. В связи с этим фосфорный обмен в водоёмах обеспечивается в значительной мере за счёт трансформации различных форм фосфора бактериями [Павлова, 2009; Дзюба, Маркевич, Сигиневич, 2011; Доняров и др., 2020]. Под биотрансформацией фосфора в основном подразумевается минерализация органических соединений фосфора в неорганические фосфаты и перевод нерастворимых форм фосфора в более доступные для организмов растворимые. Определённые группы бактерий, являющиеся неотъемлемыми компонентами водного микробиоценоза, также способны целенаправленно мобилизовать в своих клетках растворённые формы фосфора в виде полифосфатных гранул. И, несмотря на то что накопление полифосфатов является универсальной способностью многих микроорганизмов, данная возможность позволила некоторым фосфатаккумулирующим бактериям (представителям родов *Acinetobacter*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Zoogloea* и т. д.) участвовать в усовершенствовании процесса биологического удаления фосфора из сточных вод [Павлова, 2009; Дзюба, Маркевич, Сигиневич, 2011]. Кроме этого, микробная мобилизация фосфора, по всей видимости, играет важную экологическую роль в извлечении фосфора из донных отложений крупных малоподвижных водных объектов [Carman, Edlund, Damberg, 2000; Hupfer, Ruübe, Schmieder, 2004; Hupfer, Gloess, Grossart, 2007], поскольку скорость биохимических процессов трансформации загрязняющих веществ определяется в том числе гидродинамической характеристикой водного пространства. Таким образом, универсальная, на первый взгляд, способность бактерий к ферментативному дефосфатированию водной среды даёт им конкурентное преимущество по отношению к другим микроорганизмам, не способным накапливать внутриклеточные резервы.

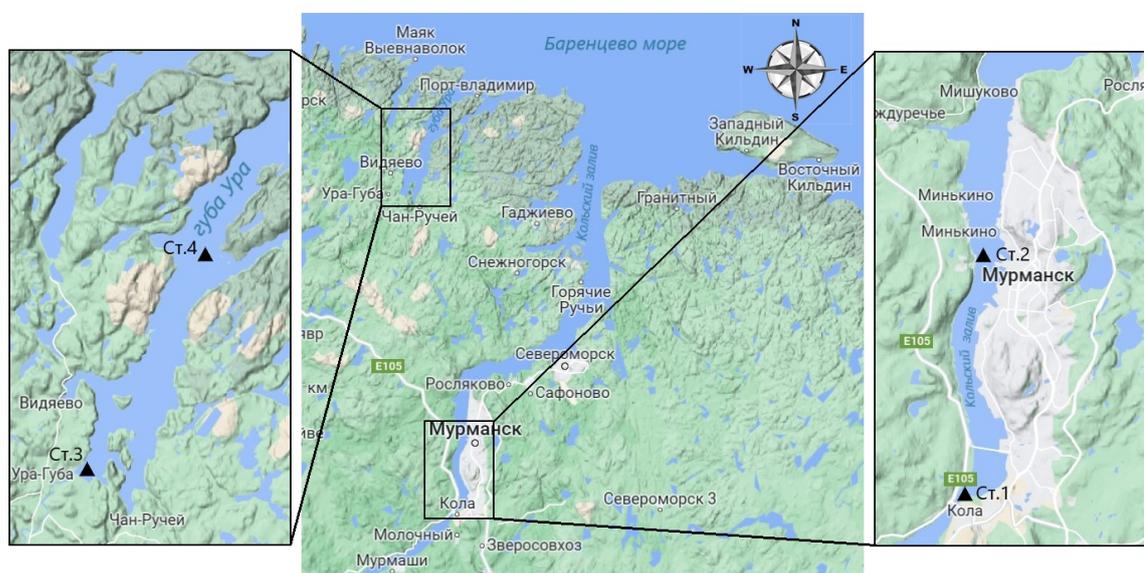
Помимо способности связывать фосфор, некоторые бактерии, функционируя в водной среде, также способны проявлять флокулирующую активность. Синтезируя в окружающую среду внеклеточные полимеры (биофлокулянты), бактерии формируют некие флокулы (устойчивые хлопья, состоящие из микроорганизмов и синтезируемых ими же веществ), которые адсорбируют на себе трудноокисляемые или недоокисленные химические соединения и нерастворимые в водной среде взвешенные частицы. Процесс хлопьеобразования в конечном итоге направлен на обеспечение относительно быстрой седиментации специфических конгломератов в водной среде и тем самым способствует очищению водной фазы от вышеупомянутых веществ [Денисов и др., 1996; Сироткин, Шагинурова, Ипполитов, 2007]. По мнению некоторых исследователей, в процессе внутриклеточной деградции накопленных соединений фосфора разрыв полифосфатных связей с целью использования энергии не приводит к выбросу больших концентраций фосфатов обратно в окружающую среду [Шеломков, Захватаева, 2008; Дзюба, Маркевич, Сигиневич, 2011]. Однако присущие природным гидроэкосистемам нестабильные условия существования так или иначе способствуют периодическому нарушению баланса между лизированными и активно развивающимися бактериальными клетками. В таком случае гибель фосфатаккумулирующих бактерий закономерно сопровождается отдачей фосфора обратно во внешнюю среду [Васильев и др., 2001]. Для дальнейшего снижения в толще воды концентрации фосфора перспективным является вовлечение его во флокулы и осаждение с последующими процессами биотрансформации в донных слоях водоёмов.

Возможность усваивать углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии также присуща самым разнообразным представителям микромира. Микробная деградация нефти и продуктов её переработки возможна благодаря высокой окислительной активности клеток прокариот и многоэтапному процессу превращения исходных углеводородов и промежуточных продуктов их распада. Наличие у бактерий, окисляющих углеводороды, специфических экзо- и эндоферментов позволяет данной группе микроорганизмов не только расщеплять трудноусвояемые органические соединения, но и снижать их концентрацию до нетоксичного для других деструкторов уровня. Это особенно важно в работе целого бактериального консорциума, задачей которого является комплексная утилизация поллютантов из водной среды. Используя продукты нефтепереработки в своём метаболизме, углеводородоокисляющие бактерии вносят колоссальный вклад в процессы биохимического разрушения нефтепродуктов [Коронелли и др., 1994; Литвинова, 2013; Пуговкин, 2016]. В настоящее время известны по крайней мере около восьмидесяти родов бактерий, способных утилизировать углеводороды без вреда для собственного онтогенеза [Head, Jones, Roling, 2006]. При этом способность потреблять нефтепродукты довольно часто встречается у бактериальных культур, отнесённых к родам *Aeromonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Shewanella*, *Vibrio* и др., широко распространённых в водах северных морей [Белоусова, Шкидченко, 2004; Шигаева и др., 2010; Lo Giudice et al., 2010]. Однако в условиях низких температур скорость естественного очищения водоёмов, во многом определяющаяся активностью представителей гетеротрофного бактериоценоза, неизбежно снижается [Ильинский, 2000; Перетрухина, Ильинский, Литвинова, 2006]. Данный факт диктует необходимость всесторонне изучать биотрансформирующий потенциал аборигенных микроорганизмов гидроэкосистем Арктики. Полученные в результате подобных экспериментов данные будут важны как для понимания «судьбы» поллютантов в низкотемпературной среде, так и для контроля их содержания в различных водоёмах. К тому же, несмотря на пристальное внимание биологов к экосистемам Арктического региона, данных об экологии микробной трансформации различных поллютантов в полярных широтах мало.

Очевидно, что высокоширотные представители бактериопланктона обладают уникальным комплексом метаболических особенностей и высокой способностью к снижению концентраций фосфора и углеводородных соединений в водной среде с низкими плюсовыми температурами. Изучение способностей, благодаря которым в естественных условиях «работы» северных штаммов микроорганизмов осуществляется не только деструкция веществ, но и другие немаловажные процессы (изъятие из водного компонента органического и минерального фосфора, взвешенных веществ, трудноокисляемых и недоокисленных соединений), представляется весьма актуальным вопросом и имеет практический интерес. Систематические исследования аборигенных психрофильных и психротрофных представителей водных бактериоценозов приведут к выделению высокоэффективных биодеструкторов и дальнейшему использованию их в качестве основы биопрепаратов для эффективной очистки акваторий региона от различных загрязняющих веществ. Кроме того, такого рода биопроспектинг поможет в дальнейшем использовать ценные штаммы микроорганизмов и в других областях народного хозяйства. Таким образом, цель данной работы заключалась в сравнительной оценке потенциала гетеротрофных микроорганизмов, выделенных из различных районов Баренцева моря, к трансформации фосфор- и углеводородсодержащих соединений на основании комплекса показателей. Биотрансформирующий потенциал исследуемых штаммов оценивался по способности культур в той или иной мере мобилизовать фосфорсодержащие соединения (показатель N2) и окислять нефтепродукты (показатель N1), а также по степени флокулирующей активности биодеструкторов (показатель N3), уровню гидрофобности поверхности бактериальных клеток (показатель N4) и индексу эмульгирующей активности нефтепродуктов (показатель N5).

## Материалы и методы

В качестве объектов исследования в данной работе использовали ранее выделенные в лабораторных условиях и идентифицированные на основе изучения морфокультуральных и физиолого-биохимических свойств [Bergey's Manual ... , 2005] чистые культуры микроорганизмов, обитающих в акватории Баренцева моря. Культуры выделяли из проб воды, отобранных в июне 2022 г. на четырёх удалённых друг от друга станциях акватории Баренцева моря (рис. 1), две из которых расположены в южном колене Кольского залива — кутовой части залива (ст. № 1) и прибрежной зоне микрорайона Абрам-Мыс (ст. № 2), остальные две — в губе Ура: прибрежная (ст. № 3) и морская зоны (ст. № 4). Технически отбор проб осуществляли, ориентируясь на актуальные рекомендации нормативно-технической документации и практической научной литературы [ГОСТ 17.1.5.04–81; ГОСТ 31861–2012; ГОСТ 31942–2012; Практическая гидробиология ... , 2006].



**Рис. 1.** Карта-схема Мурманского берега Баренцева моря с расположением станций отбора проб №№ 1–4

До вида культуры идентифицировали с помощью физико-химического метода анализа на масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия). Результатом тщательного отбора стали семь бактериальных штаммов, относящихся к пяти различным родам, — *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* и *Shewanella*. Бактериальные штаммы, выделенные из воды на станции 1, относились к видам *Pseudomonas taetrolens* и *Shewanella baltica*, на станции 2 — *Aeromonas bestiarum*, *Bacillus cereus* (шт. № 1) и *Serratia proteamaculans*, на станции 3 — *Pseudomonas protegens*, а на станции 4 — *Bacillus cereus* (шт. № 2). Из выращенных на скошенной среде суточных культур целевых штаммов готовили суспензии с определённой концентрацией клеток путём смыва изотоническим раствором в стерильные пробирки. Стандартизацию бактериальных взвесей проводили методом визуального сравнения мутности полученных растворов по отношению к стандартному образцу мутности бактерийных взвесей СОП 1-98-15 «Ормет» (Россия) согласно инструкции. В качестве стандартного образца мутности был выбран вариант БАК-5, эквивалентный пяти международным единицам (5 МЕ) бактериальной мутности и соответствующий концентрации клеток в диапазоне  $0,02–0,6 \times 10^9$  кл./мл. Полученная суспензия являлась инокулятом для последующего культивирования в модельных питательных средах (МПС) различного состава (табл. 1).

Таблица 1

Состав модельных питательных сред для оценки биотрансформирующего потенциала культивируемых штаммов

Компоненты питательной среды, г/л	Обозначение питательной среды			
	ММС 3 ‰ + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	ММС 32 ‰ + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	ММС 3 ‰ + ДТ	ММС 32 ‰ + ДТ
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	1,0	1,0	1,0	1,0
KCl	0,7	0,7	0,7	0,7
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,0	1,0	1,0	1,0
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5,0	5,0	–	–
NaCl	3,0	32,0	3,0	32,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	0,5	–	–
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	1,0	–	–
ДТ-Л-К5, мл/л	–	–	10,0	10,0

В качестве основы питательных сред использовали модифицированную морскую минеральную среду ММС [Mills, Breuil, Colwell, 1978], описанную в Практической гидробиологии под редакцией В. Д. Фёдорова [Практическая гидробиология ... , 2006], с внесением небольших правок. Базовый субстрат приближённо имитировал минеральный состав природных морских водоёмов, а в качестве единственного источника углерода содержал глюкозу в одном случае и дизельное топливо (ДТ) марки «летнее» экологического класса К5 (ДТ-Л-К5) по [ГОСТ 32511–2013] — в другом. Помимо различий в содержании углеродного компонента, МПС отличались и концентрацией хлорида натрия, соответствовавшей солёности воды в точках отбора микробиологических проб (табл. 1). Отношение бактериального инокулята к МПС при инокуляции составляло 1 : 10, а во всех проводимых экспериментах устанавливались определённые условия культивирования, включая аэробность среды, температуру (8 ± 2) °С и экспозицию от 7 до 30 суток (в зависимости от трофических возможностей штаммов). Вместе с посевами в аналогичных условиях культивировали стерильные МПС для чистоты эксперимента и с учётом нестабильности нефтепродуктов при хранении в негерметичных ёмкостях. Даже в стерильном виде углеводородам свойственно испаряться, окисляться кислородом воздуха, полимеризоваться и уплотняться [Аксенов, 1970; Зеркалов, 1990]. Все манипуляции с культурами микроорганизмов в лабораторных экспериментах также осуществляли при соблюдении низких плюсовых температур.

Для исследования способности целевых штаммов к эффективной мобилизации из МПС минерального фосфора и окислению углеводов в ММС с ДТ все культуральные жидкости подвергали определению массовых концентраций общего фосфора и нефтепродуктов соответственно. На первые, вторые и седьмые сутки культивирования штаммов в ММС с минеральным фосфором проводили отделение бактериальных клеток от питательных сред путём центрифугирования на установке Hettich Micro 120 Hettichlab (Германия). Выполнение предварительного центрифугирования диктовалось необходимостью исключения из дальнейшего эксперимента мобилизованного клетками фосфора. Режим разделения составил 6 мин при относительном центробежном ускорении (RCF) 8000 g. При определении концентрации общего фосфора использовали надосадочную жидкость, а контролем эффективности центрифугирования служило выборочное микроскопирование супернатанта на отсутствие бактериальных клеток.

Массовую концентрацию фосфорсодержащих соединений (в пересчёте на общий фосфор) определяли фотометрическим методом с молибдатом аммония и предварительной минерализацией в пробе всех фосфорсодержащих веществ надсерноокислым аммонием в среде серной кислоты. Измерение оптической плотности проводили с помощью откалиброванного фотометра фотоэлектрического КФК-3-01 (ЗОМЗ, Россия) согласно инструкции производителя. На тридцатые сутки экспозиции штаммов в ММС с ДТ проводили определение остаточных концентраций нефтепродуктов путём экстрагирования нефтепродуктов гексаном в исследуемых пробах и измерения сигналов флуоресценции в растворах флуориметрическим методом на анализаторе жидкости Флюорат-02-5М («Люмэкс», Россия).

Определение способности исследуемых штаммов к синтезу биофлокулянтов, образованию флокул и осаждению мелкодисперсной фазы нерастворимого вещества проводили модифицированным методом Курана [Kurane, Takeda, Suzuki, 1986; Gao et al., 2006], основанного на смешении культуральной жидкости с каолиновой глиной, отстаивании бактериально-каолиновой смеси и измерении коэффициента поглощения света верхней фазой раствора с помощью фотометра фотоэлектрического КФК-3-01-ЗОМЗ. Метаболические свойства исследуемых штаммов микроорганизмов, влияющих на углеводородокисляющую способность, изучали путём определения показателя гидрофобности и эмульгирующей активности. Известно, что углеводородокисляющие микроорганизмы, взаимодействуя с нефтепродуктом, способны к непосредственному контакту с углеводородом за счёт гидрофобной клеточной поверхности, обусловленной наличием в ней липидных компонентов [Zhang, Miller, 1995; Яскович, 1998]. Поэтому определение показателя гидрофобности является одной из ключевых характеристик клеточной поверхности, определяющей адсорбционную иммобилизацию микроорганизмов. Для анализа показателя гидрофобности использовали метод Розенберга в модификации Серебряковой [Серебрякова и др., 2002], где в качестве углеводородной фазы использовали хлороформ, а измерение оптической плотности контрольных (без хлороформа) и обработанных хлороформом проб проводили на фотометре фотоэлектрическом КФК-3-01-ЗОМЗ. Немаловажным показателем эффективности процессов биодеструкции нефтепродуктов является индекс эмульгирования, который позволяет оценить способность продуцируемых микроорганизмами соединений эмульгировать несмешивающиеся жидкости в системе масло — вода [Льонг, Нечаева, Понаморева, 2019]. Эмульгирующую активность целевых штаммов определяли визуально с применением методики, разработанной Купером и Голденбергом [Cooper, Goldenberg, 1987].

В воде, отобранной в местах обитания выделенных культур, измеряли температуру ( $T$ , °C), биологическое потребление кислорода (БПК<sub>5</sub>, мгО<sub>2</sub>/л) и содержание солей (солёность  $S$ , ‰). Известно [Перетрухина, Ильинский, Литвинова, 2006], что изменение солёности водной среды, так же как и концентрация нестойкого органического вещества, способны оказывать влияние на скорость биodeградации нефтяных углеводородов морскими бактериями. При определении указанных гидролого-гидрохимических показателей руководствовались нормативно-технической документацией [РД 52.10.243-92; РД 52.24.420-2019; РД 52.24.496-2018].

Выделение штаммов микроорганизмов осуществлялось однократно из проб на каждой станции акватории Баренцева моря. Абиотические параметры воды в точках отбора проб анализировались трёхкратно (в течение одного месяца) с усреднением полученных данных. Все модельные эксперименты проводились в трёх повторностях ввиду возможного влияния на ход исследования различных внешних и внутренних факторов. Достоверность данных обеспечена использованием современных методик и статистической обработкой результатов с помощью пакетов компьютерных программ Microsoft Excel 7.0.

## Результаты и обсуждение

Динамичность и изменчивость водных экологических систем является важной основой функций самоподдержания и саморегуляции, в том числе и самоочищения. Для комплексной оценки биотрансформирующего потенциала исследуемых штаммов целесообразно в первую очередь проанализировать основные абиотические параметры их сред обитания. Уровень биохимической активности микроорганизмов в известной мере зависит от многих факторов, наиболее важным из которых является температура окружающей среды. На момент анализа гидролого-гидрохимических показателей станций, расположенных в Кольском заливе и губе Ура, температура воды в местах отбора проб не превышала  $(10 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , при этом наблюдалась сходная для двух фьордов тенденция снижения температуры на  $(2,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$  в отдалённых от береговой линии точках отбора (рис. 1). Предположительно, незначительное повышение температуры воды на станциях 1 и 3 можно объяснить более эффективным прогревом небольших глубин вдоль береговой линии водоёмов, а также подогревом водных масс городскими стоками близкорасположенных населённых пунктов. По результатам гидрохимических измерений, показатели солёности на третьей и четвёртой станциях ( $(32,0 \pm 1,5) ‰$ ) значительно превышали значения, полученные в ходе анализа воды Кольского залива ( $(3,0 \pm 0,8) ‰$  в среднем по двум точкам). Данный факт свидетельствует о большей степени опреснения водных масс в районе станций 1 и 2 за счёт речных стоков крупных рек — Кола и Тулома. О загрязнении органическими веществами воды станций 1 и 2 можно судить по достаточно высоким показателям БПК<sub>5</sub> ( $(4,32 \pm 0,70)$  и  $(3,91 \pm 0,50)$  мгО<sub>2</sub>/л соответственно). Данные точки характеризуются высоким уровнем загрязнения ввиду близости к населённым пунктам и активно развивающемуся морскому порту. Полученные нами результаты по показателям температуры, солёности и БПК<sub>5</sub> в пробах воды легли в основу методологии проведения дальнейших модельных экспериментов.

Целью данной работы являлся не только анализ предметных способностей выделенных штаммов микроорганизмов, но и проведение комплексной оценки биотрансформирующего потенциала каждого из изолятов. Таким образом, неотъемлемой частью исследований служила разработка критериев комплексной оценки. В дальнейшем подобного рода анализ можно использовать как средство для отбора наиболее эффективных с точки зрения биоэкологии штаммов микроорганизмов. Биотрансформирующий потенциал исследуемых штаммов оценивался по способности культур в той или иной мере мобилизовать фосфорсодержащие соединения (показатель N1) и окислять нефтепродукты (показатель N2) как наиболее широко распространённые поллютанты северных морей. Поскольку немаловажной характеристикой уровня снижения концентрации минерального фосфора в среде является флокулирующая активность биодеструктора, в качестве равноценного критерия биотрансформирующего потенциала изучалась степень флокулирующей активности (показатель N3) целевых штаммов. Помимо этого, эффективность биодеструкции ДТ зависит от уровня гидрофобности поверхности бактериальных клеток (показатель N4) и индекса эмульгирующей активности нефтепродуктов (показатель N5), что также учитывались при комплексной оценке биотрансформирующего потенциала штаммов. Участвующим в оценке показателям устанавливались уровни активности (баллы) в соответствии с представленными в таблице 2 критериями. Для комплексной оценки каждому показателю также определялся коэффициент весомости.

Расчёт комплексного коэффициента ( $K$ ) биотрансформирующего потенциала штамма производился с использованием формулы:

$$K = (v_{N1} \times k_{N1} + v_{N2} \times k_{N2}) + v_{N3} \times k_{N3}(v_{N4} \times k_{N4} + v_{N5} \times k_{N5})$$

Таблица 2

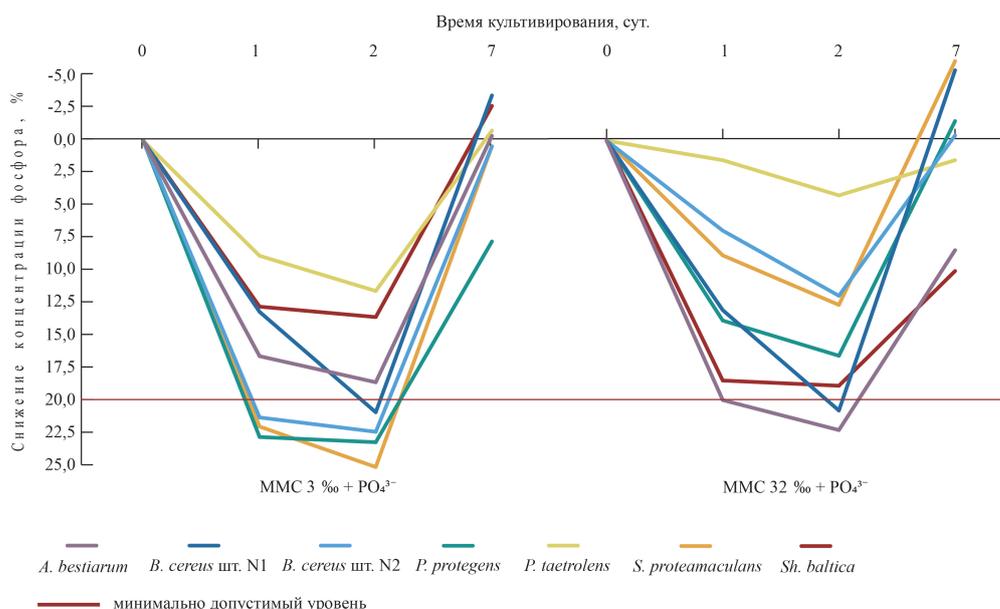
Критерии комплексной оценки биотрансформирующего потенциала				
Показатель биотрансформирующего потенциала	Критерий оценивания	Шкала активности	Уровень активности в баллах, <i>k</i>	Коэффициент весомости, <i>v</i>
(N1) Уровень фосфатаккумуляции	<20 %	низкий уровень	0	1,0
	20–50 %	средний уровень	1	
	>50 %	высокий уровень	2	
(N2) Уровень биодеструкции ДТ	<30 %	низкий уровень	0	1,0
	30–60 %	средний уровень	1	
	>60 %	высокий уровень	2	
(N3) Степень флокулирующей активности	<30 %	низкий уровень	0	1,0
	30–50 %	средний уровень	1	
	>50 %	высокий уровень	2	
(N4) Уровень гидрофобности	<30 %	низкий уровень	0	0,5
	30–60 %	средний уровень	1	
	>60 %	высокий уровень	2	
(N5) Индекс эмульгирования	<30 %	низкий уровень	0	0,5
	30–60 %	средний уровень	1	
	>60 %	высокий уровень	2	

Первичные продуценты как основные трансформаторы фосфорсодержащих веществ, в условиях более высоких температур, за счёт ассимиляции и последующего вовлечения в процессы седиментации, извлекают из водной среды в среднем до 45 % растворённого фосфора [Environmental phosphorus handbook, 1973; Janssen, Meinema, van der Roest, 2002]. В качестве приемлемого уровня снижения концентрации фосфора в среде бактериями холодных экосистем нами принималось значение не ниже 20 %. Снижение концентрации фосфора более чем на 50 % расценивалось как высокий уровень мобилизации фосфорсодержащих веществ. В исследованиях, проведённых в отношении микроорганизмов активных илов, выделенных и функционирующих при температурных режимах в пределах 20–30 °С, флокулирующая активность на уровне 50 % характеризуется как минимально достаточная для использования штаммов в качестве биофлокулянт-продуцирующих микроорганизмов [Денисов и др., 1996; Багаева, Зинурова, 2008]. Однако, с учётом низких плюсовых температур водных экосистем Арктики, в качестве потенциально перспективных дефосфотаторов нами рассматривались те штаммы, чья степень флокулирующей активности находилась в диапазоне от 30 до 100 %, при этом минимальный уровень составлял 30 %, средний — 30–50 %, а высокий — более 50 %. Согласно опубликованным данным, стандартным показателем достаточной для эффективной деструкции нефтепродуктов углеводородокисляющей способности является значение не ниже 40 %. Для индекса эмульгирования порог составляет 50 %, а для показателя гидрофобности — 20–30 % [Коронелли, Комарова, Игнатченко, 1983; Дермичева, 1985; Ильинский, Коронелли, Семененко, 1990; Серебрякова и др., 2002]. В рамках данного эксперимента критерии для показателей N1, N4 и N5 снижены в процентном соотношении ввиду ведущей роли низкотемпературного фактора.

Значения коэффициентов весомости показателей определялись их приоритетностью. Показатели N1–N3, характеризующие степень прямого и косвенного извлечения поллютантов из МПС, имели равноценные коэффициенты значимости (1,0), поскольку основной решаемой проблемой в ходе эксперимента являлось удаление из водной толщи загрязняющих компонентов. Кроме того, коэффициент показателя биодеструкции ДТ выносился за скобки, тем самым определялась необходимость и возможность проведения последующих действий в отношении показателей уровня

гидрофобности и индекса эмульгирования штамма. Коэффициенты весомости данных показателей имели равную весомость (по 0,5) и в сумме составляли единицу. При условии одновременного проявления культурой максимальных уровней по пяти измеряемым показателям, значение комплексного коэффициента биотрансформирующего показателя, таким образом, составит 8.

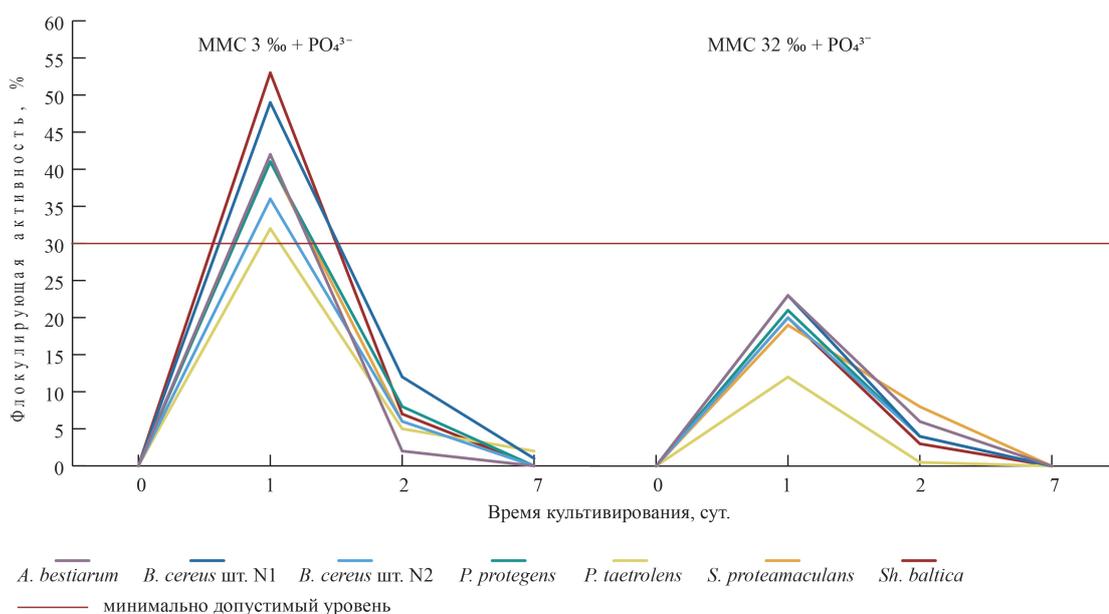
Исследуемые культуры оценивали на предмет их фосфатмобилизующего потенциала, основываясь на способности штаммов к мобилизации минерального фосфора — компонента МПС. Динамика изменения массовой концентрации фосфора в среде с различной солёностью представлена на рисунке 2.



**Рис. 2.** Динамика изменения массовой концентрации фосфора у исследуемых штаммов при культивировании в среде с различной солёностью

В ходе модельного эксперимента скорость снижения концентрации фосфора в МПС для большинства штаммов была максимальной в первые сутки инкубирования и значительно снижалась ко вторым суткам. Исключение составила культура *Bacillus cereus* штамм № 1, выделенный из проб воды на станции 2, расположенной в Кольском заливе. Данный штамм демонстрировал относительно стабильную скорость дефосфатирования (0,27 мгР/сут в среднем) МПС в течение первых 48 ч культивирования. Значения фосфатаккумулялирующей способности для двухсуточных культур варьировали в пределах от 12 до 25 %. Максимальную активность в отношении процесса мобилизации неорганического фосфора проявляла двухсуточная культура *Serratia proteamaculans* (выделенная из проб воды со станции 2) при культивировании в среде с уровнем солёности 3 ‰. Важно отметить, что на седьмые сутки культивирования в культуральных жидкостях наблюдался процесс высвобождения фосфора в среду, вероятно, из-за начавшегося процесса лизиса клеток при продолжительном культивировании в несменяемых средах. Оценка способности целевых штаммов изменять концентрацию фосфора в среде проводилась на субстратах с различными уровнями солёности, как соответствующих условиям среды обитания бактерий, так и на субстратах с низким и высоким порогами солёностями относительно данной характеристики проб воды, из которых были выделены штаммы. Однако в ходе исследований закономерной связи между солёностью субстрата культивирования данных штаммов и степенью снижения ими минерального фосфора в среде отмечено не было.

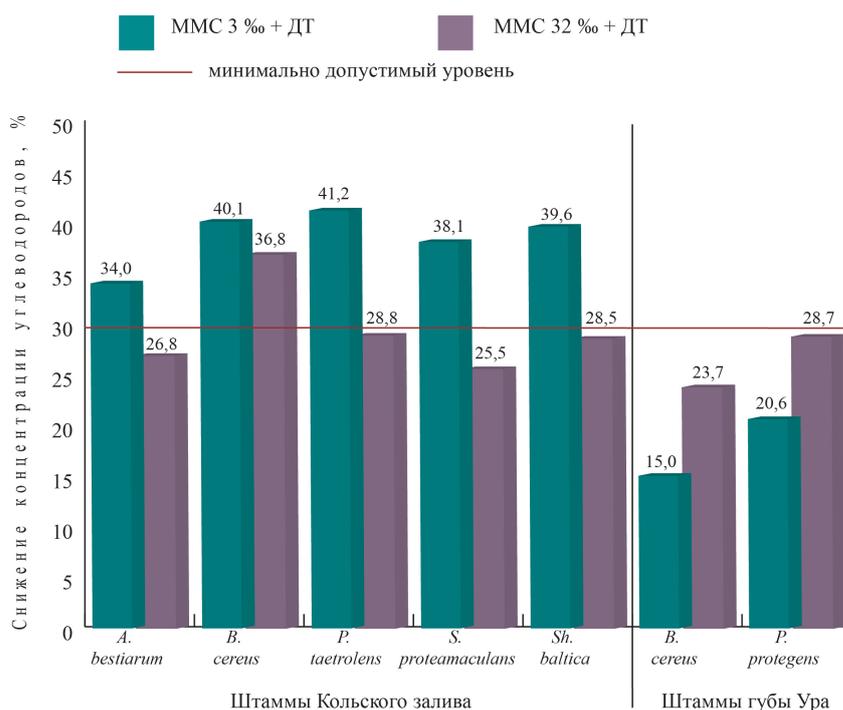
Помимо способности извлекать из МПС фосфорсодержащие вещества при их высокой концентрации, штаммы тестировались на предмет флокулирующей активности в условиях повышенного содержания солей ортофосфорной кислоты и различной концентрации хлорида натрия. При этом чем выше процент флокулирующей активности, тем, очевидно, эффективнее происходит процесс флокулообразования в жидких средах и осаждения не усвоенного из среды и вышедшего обратно фосфора. Результаты данного этапа экспериментов в изучении биотрансформирующего потенциала целевых штаммов представлены на рисунке 3.



**Рис. 3.** Динамика изменения флокулирующей активности исследуемых штаммов при культивировании в среде с неорганическим фосфором

В результате серии исследований было установлено, что все анализируемые штаммы демонстрировали в той или иной мере способность осаждать каолин в форме односуточных культуральных агентов. Наиболее эффективные флокулообразователи, чьи культуральные жидкости флокулировали каолиновую глину с активностью около 50 %, были выделены из проб воды Кольского залива (*Sh. baltica* и *B. cereus*). Все изоляты, выделенные из проб воды на различных станциях, в ходе эксперимента проявляли свою максимальную флокулирующую активность при росте на средах с солёностью 3 ‰. При повышении солёности сред до 32 ‰ данная активность снижалась в среднем в 2 раза. Соли морских экосистем не только обеспечивают микроскопических гидробионтов необходимым уровнем солей для поддержания осмотического давления, но и являются источником микроэлементов, необходимых как для роста и развития бактерий, так и для эффективного синтеза внеклеточных полимеров. Согласно опубликованным данным, при культивировании «морских» биофлокулянт-продуцирующих микроорганизмов в питательных средах с целью получения наибольшего выхода биофлокулянта оптимальное значение концентрации соли составляет диапазон от 30 до 40 г/л [Chen et al., 2017]. В случае с тестируемыми штаммами концентрация соли 32 г/л привела к значительному снижению флокулирующей активности, что может быть связано подавлением активности микроорганизмов условиями повышенной засоленности. Таким образом, можно предположить, что в рамках данного эксперимента все исследуемые нами штаммы не способны проявлять высокую флокулирующую активность в условиях, имитирующих морские экосистемы.

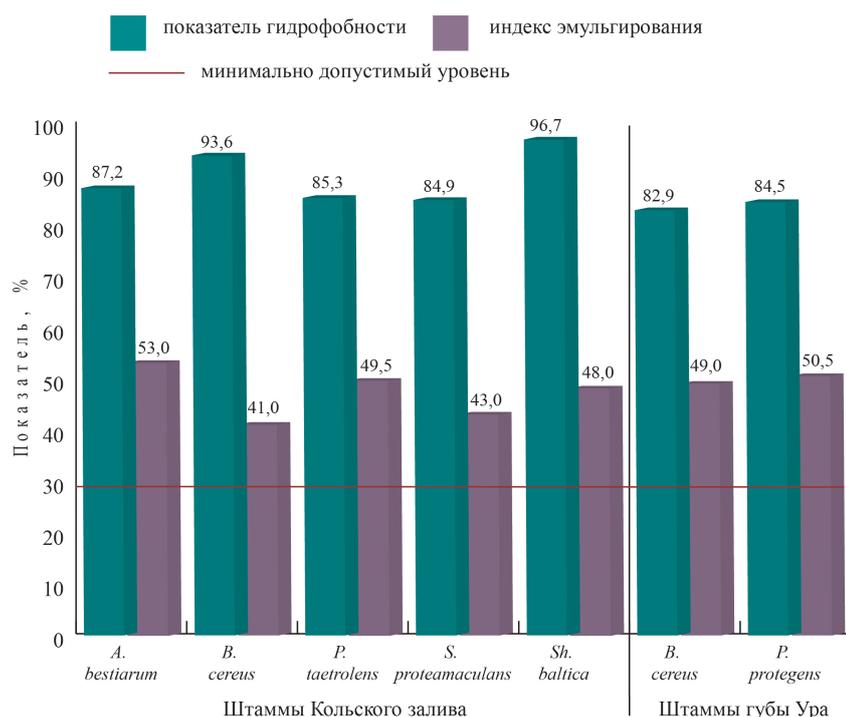
Перспективность бактерий в качестве углеводородокисляющих агентов определяется набором его физиолого-биохимических свойств. И прежде всего это способность интенсивно утилизировать углеводороды, широкая сырьевая база, высокая гидрофобность, а также некоторые другие свойства. Оценка способности исследуемых культур окислять нефтепродукты в питательных субстратах с различными уровнями солёности показала, что все целевые штаммы способны к биодеструкции дизельного топлива и могут быть использованы для дальнейшего анализа их метаболической активности. Как видно из рисунка 4, окислительная способность микроорганизмов, выделенных из проб воды Кольского залива и губы Ура, колебалась в пределах от 15 до 41 %.



**Рис. 4.** Уровень биодеструкции ДТ штаммами микроорганизмов при различных показателях солёности среды

Если рассматривать культуры с учётом их происхождения, можно увидеть, что выделенные из вод Кольского залива штаммы в модельном эксперименте с ДТ в целом характеризовались более высокой углеводородокисляющей способностью. При этом данная способность была максимальной при внесении бактерий в МПС с концентрацией хлорида натрия, соответствующей опреснённой морской воде, из которой они, собственно, и были изолированы. Для штаммов губы Ура наблюдалась обратная закономерность. В целом отмечено повышение процента углеводородокисляющей способности (в среднем на 10 %) штаммов при культивировании на субстратах с уровнями солёности, соответствующими условиям среды обитания тестируемых бактерий.

В процессе отбора компонентов для углеводородокисляющих биопрепаратов также немало внимания уделяется способности кандидатов активно синтезировать различного типа биосурфактанты. При значении показателя гидрофобности более 20 % культуры бактерий отбирают как продуцентов биосурфактантов [Серебрякова и др., 2002]. Данные, представленные на рисунке 5, показывают, что все исследуемые штаммы демонстрировали высокую способность удерживаться на поверхности гидрофобной фракции субстрата. Показатель гидрофобности для всех без исключения культур составил не менее 80 %, что характеризует достаточно высокий уровень активности в отношении используемого в МПС дизельного топлива.



**Рис. 5.** Уровень метаболической активности штаммов по отношению к углеводородным компонентам среды

Помимо важности определения гидрофобно-гидрофильной природы поверхности бактериальных клеток, деструкционная по отношению к нефтепродуктам активность микроорганизмов также связана с их способностью к синтезу поверхностно-активных веществ (ПАВ), увеличивающих доступность углеводородов для клеток бактерий. Способность микроорганизмов к продукции ПАВ оценивается по индексу эмульгирования, который основывается на свойстве ПАВ образовывать эмульсию при встряхивании культуральной жидкости микроорганизмов с углеводородом. Согласно опубликованным данным перспективными продуцентами ПАВ являются штаммы бактерий, индекс эмульгирования которых составляет свыше 50 % [Коронелли, Комарова, Игнатченко, 1983]. В ходе анализа эмульгирующей активности штаммов обнаружено, что по показателю индекса эмульгирования нефтепродуктов все исследуемые изоляты относились к культурам со средним уровнем активности, поскольку данный показатель составлял от 40 до 50 % (рис. 5). Средний уровень эмульгирования означает достаточную доступность нефтепродуктов как источника питательных веществ для бактериальных клеток.

При расчёте комплексной оценки биотрансформирующего потенциала культур целесообразно использовать по каждому из показателей максимальные значения, полученные в рамках данного эксперимента, для каждого штамма. Результаты комплексной оценки биотрансформирующего потенциала северных штаммов микроорганизмов по пяти показателям представлены в таблице 3.

В модельном эксперименте, проведённом в условиях, соответствующих как пресным, так и морским водоёмам, в результате исследования способностей семи культур микроорганизмов определено, что 3 изолята характеризовались как штаммы со средним биотрансформирующим потенциалом (на границе 45 % от максимально возможного) при условии их функционирования в опреснённых морских водоёмах. К ним относились культуры *B. cereus* шт. № 1, *S. proteamaculans* и *Sh. baltica*, выделенные из проб воды Кольского залива. Также установлено, что в условиях, соответствующих водной среде морских экосистем, биотрансформирующий потенциал у большинства культур отсутствовал. Исключение составили два штамма, выделенные на станции 2,

расположенной в прибрежной зоне Кольского залива. При этом для штамма *A. bestiarum* отметка в 1 балл, вероятнее всего, расценивается как значение в пределах погрешности. Что касается культуры *B. cereus* шт. № 1, значение комплексного коэффициента в ММС с концентрацией хлорида натрия 32 г/л характеризовало средний уровень активности штамма (31 %) в отношении экспериментальных манипуляций. Таким образом, можно предположить, что в не нагруженных высокими концентрациями морских солей средах тестируемые штаммы вне зависимости от биотопа проявляют в той или степени способность к трансформации фосфорсодержащих и углеводородных соединений. Представитель микробиоценоза морских экосистем (*B. cereus* шт. № 1) показал относительную адаптационную возможность к трансформации поллютантов в различных условиях культивирования, что характерно для спорообразующих представителей рода *Bacillus*.

Таблица 3

Комплексная оценка биоэкологического потенциала штаммов

Штаммы микроорганизмов	Местообитание штаммов	Значение комплексного коэффициента (K) из 8 максимально возможных, баллы	
		ММС 3 ‰	ММС 32 ‰
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Кольский залив	2,5	1
<i>Bacillus cereus</i> шт. № 1		3,5	2,5
<i>Pseudomonas taetrolens</i>		2,5	0
<i>Serratia proteamaculans</i>		3,5	0
<i>Shewanella baltica</i>		3,5	0
<i>Bacillus cereus</i> шт. № 2	губа Ура	2,0	0
<i>Pseudomonas protegens</i>		2,0	0

## Выводы

В результате проведённых исследований по изучению биотрансформирующего потенциала выделенных из Баренцева моря штаммов микроорганизмов, в рамках данных экспериментов, установлено следующее:

1. Микроорганизмы, выделенные из проб воды на различных станциях Баренцева моря, проявляли способность снижать посредством мобилизации концентрацию минерального фосфора в МПС в пределах 12–25 %. Связь между солёностью субстрата культивирования и степенью снижения фосфора в среде не отмечалась.

2. Исследуемые культуры проявляли максимальную флокулирующую активность (в среднем на уровне 40 %) при росте на средах с солёностью 3 ‰. При повышении солёности до 32 ‰ флокулирующая активность культур снижалась в среднем в 2 раза, что свидетельствовало о низкой способности данных штаммов к агрегированной седиментации в условиях, имитирующих морские экосистемы.

3. Тестируемые штаммы характеризовались более высокой углеводородокисляющей способностью при внесении изолятов в субстраты, соответствующие естественной среде их обитания. Все исследуемые культуры характеризовались высоким показателем гидрофобности клеток и средним уровнем индекса эмульгирования дизельного топлива.

4. Из семи протестированных культур микроорганизмов 3 штамма показали биотрансформирующий потенциал среднего уровня (43 % от максимально возможного) в условиях функционирования в модельных средах, имитирующих морские экосистемы с пониженной концентрацией морских солей (3 г/л). Данными бактериями стали штаммы *Bacillus cereus* шт. № 1, *Serratia proteamaculans* и *Shewanella baltica*, выделенные из проб воды Кольского залива.

### Список литературы

1. Аксенов А. Ф. Авиационные топлива, смазочные материалы и специальные жидкости. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : Транспорт, 1970. – 255 с.
2. Бабикова Н. Д., Герасимова Л. В., Орлова О. П. Экологическая химия / Арханг. гос. техн. ун-т. – Архангельск : Изд-во АГТУ, 2003. – 87 с.
3. Багаева Т. В., Зинцова Е. Е. Поиск новых перспективных форм биофлокулянтов // Учёные записки Казанского государственного университета. Сер.: Естественные науки. – 2008. – Т. 150, № 2. – С. 8–21.
4. Белоусова Н. И., Шкидченко А. Н. Деструкция нефтепродуктов различной степени конденсации микроорганизмами при пониженных температурах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 3. – С. 312–316.
5. Богданова О. Ю. Общая микробиология / Мурман. гос. техн. ун-т. – Мурманск : Изд-во МГТУ, 2014. – 294 с.
6. Васильев Б. В., Мишуков Б. Г., Иваненко И. И., Соловьева Е. А. Технологии биологического удаления азота и фосфора на станциях аэрации // Водоснабжение и санитарная техника. – 2001. – № 5. – С. 22–25.
7. Голубовская Э. К. Биологические основы очистки воды. – Москва : Высш. шк., 1978. – 271 с.
8. ГОСТ 17.1.5.04–81. Охрана природы. Гидросфера. Приборы и устройства для отбора, первичной обработки и хранения проб природных вод. Общие технические условия / разработ. и внесен Гос. ком. СССР по гидрометеорологии и контролю природ. среды. – Москва : Из-во стандартов, 2003. – 6 с.
9. ГОСТ 31861–2012. Вода. Общие требования к отбору проб / подгот. ООО «Протектор» совместно с ЗАО «Центр исследования и контроля воды». – Москва : Стандартиформ, 2013. – 32 с.
10. ГОСТ 31942–2012. Вода. Отбор проб для микробиологического анализа / подгот. ООО «Протектор» совместно с ФГБУ «НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина» и ЗАО «Роса». – Москва : Стандартиформ, 2013. – 24 с.
11. ГОСТ 32511–2013. Топливо дизельное евро. Технические условия / разработ. ОАО «Всерос. науч.-исслед. ин-т по переработке нефти». – Москва : Стандартиформ, 2013. – 15 с.
12. Денисов А. А., Дамиров И. И., Евдокимова Н. Г., Семижон А. В. Процессы флокулирования микроорганизмов при биологической очистке сточных вод // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов : тез. докл. V Всерос. конф., 14–17 мая 1996 г. / Всерос. науч.-исслед. и технол. ин-т биол. пром-сти. – Щёлково : ВНИТИБП, 1996. – С. 256–257.
13. Денисов А. А., Павлинова И. И., Климова Е. В. Удаление фосфорсодержащих загрязнений из сточных вод агропромышленных предприятий // Достижения науки и техники АПК. – 2006. – № 11. – С. 48–49.
14. Дермичева С. Г. Анализ нефтеокисляющей и гетеротрофной микрофлоры прибрежных вод Восточного Мурмана // Биология моря. – 1985. – № 3. – С. 32.
15. Дзюба И. П., Маркевич Р. М., Сигиневич Т. М. Исследование процесса накопления фосфора фосфатаккумулялирующими бактериями // Труды Белорусского государственного технологического университета. – 2011. – № 4. – С. 182–184.

16. Донияров Н. А., Тагаев И. А., Асроров А. А., Хуррамов Н. И., Каршиева М. С., Эргашева Ю. О. Основные механизмы микробиологического превращения природных соединений фосфора // Вестник науки и образования. – 2020. – № 9, ч. 3. – С. 9–14.
17. Ежегодные доклады о состоянии и об охране окружающей среды Мурманской области // Министерство природных ресурсов, экологии и рыбного хозяйства Мурманской области : [офиц. сайт]. – 2018–2022. – URL: [https://mpr.gov-murman.ru/activities/napravleniya/okhrana-okruzhayushchey-sredy/00.condition/index.php?sphrase\\_id=6309438](https://mpr.gov-murman.ru/activities/napravleniya/okhrana-okruzhayushchey-sredy/00.condition/index.php?sphrase_id=6309438) (дата обращения: 15.02.2022). – из содерж.: Доклад о ... 2017 г.; Доклад о ... 2018 г.; Доклад о ... 2019 г.; Доклад о ... 2020 г.; Доклад о ... 2021 г.
18. Зеркалов Д. В. Экономия нефтепродуктов. – Москва : Недра, 1990. – 190 с.
19. Ильинский В. В. Гетеротрофный бактериопланктон: экология и роль в процессах естественного очищения среды от нефтяных загрязнений : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.18. – Москва, 2000. – 603 с.
20. Ильинский В. В., Измайлов В. В. Процессы естественного очищения арктических вод и льдов от нефтяных углеводородов и роль в них микроорганизмов: годовой цикл натурных наблюдений // Труды Государственного океанографического института. – 1992. – Вып. 203. – С. 91–101.
21. Ильинский В. В., Коронелли Т. В., Семенов М. Н. Микроорганизмы и нефтяное загрязнение арктических вод // Океанографические аспекты охраны морей и океанов от химических загрязнений : Материалы всесоюз. науч. симп., Одесса, 3–6 окт. 1988 г. / под ред. А. И. Симонова. – Москва : Гидрометеиздат, 1990. – С. 208–212.
22. Кисленко В. Н., Кольчев Н. М., Госманов Р. Г. Ветеринарная микробиология и иммунология / под ред. В. Н. Кисленко. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 746 с.
23. Коронелли Т. В., Дермичева С. Г., Ильинский В. В., Комарова Т. И., Поршнев О. В. Видовая структура углеводородокисляющих бактериоценозов водных экосистем разных климатических зон // Микробиология. – 1994. – Т. 63, № 5. – С. 917–923.
24. Коронелли Т. В., Комарова Т. И., Игнатченко А. В. Роль эмульгирования в процессе поглощения углеводородов клетками *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. – 1983. – Т. 52, № 1. – С. 94–97.
25. Литвинова М. Ю. Гетеротрофный бактериопланктон среднего и северного колен Кольского залива и его участие в процессах их естественного очищения от нефтяных углеводородов : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.10. – Москва, 2013. – 173 с.
26. Льюнг Т. М., Нечаева И. А., Понаморева О. Н. Методы скрининга биосурфактант-продуцирующих бактерий (миниобзор) // Известия Тульского государственного университета. Сер.: Естественные науки. – 2019. – Вып. 4. – С. 98–111.
27. Материалы Международной научной конференции XXII Докучаевские молодежные чтения, посвящ. ... Д. И. Менделеева «Почва как система функциональных связей в природе», 25 февр. – 2 марта 2019 г., Санкт-Петербург / Санкт-Петерб. гос. ун-т [и др.]. – Санкт-Петербург : [б. и.], 2019. – 376 с.
28. Миндубаев А. З., Акосах Й. А., Алимова Ф. К., Афордоаны Д. М., Болормаа Ч., Кагиров Р. М., Минзанова С. Т., Миронова Л. Г., Яхваров Д. Г. О разложении белого фосфора осадком сточных вод // Ученые записки Казанского университета. Сер.: Естественные науки. – 2011. – Т. 153, кн. 2. – С. 110–119.

29. Очистка производственных сточных вод / С. В. Яковлев, Я. А. Карелин, Ю. М. Ласков, Ю. В. Воронов ; под ред. С. В. Яковлева. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : Стройиздат, 1985. – 335 с.
30. Павлова А. Г. Взаимодействие микроорганизмов с фосфором // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа. – 2009. – № 20. – С. 334–345.
31. Перетрухина И. В., Ильинский В. В., Литвинова М. Ю. Определение скоростей биodeградации нефтяных углеводородов в воде литорали Кольского залива // Вестник Магнитогорского государственного технического университета им. Г. И. Носова. – 2006. – Т. 9, № 5. – С. 828–832.
32. Практическая гидробиология. Пресноводные экосистемы / В. Д. Федоров, В. В. Ильинский, Е. Ф. Исакова [и др.] ; под ред. В. Д. Федорова, В. И. Капкова. – Москва : ПИМ, 2006. – 367 с.
33. Пуговкин Д. В. Эпифитные бактериоценозы *Fucus vesiculosus* L. Баренцева моря и их роль в деградации нефтяных загрязнений : дис. ... канд. биол. наук : 25.00.28. – Мурманск, 2016. – 146 с.
34. РД 52.10.243-92. Руководство по химическому анализу морских вод / Федер. служба России по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды ; разработ.: С. Г. Орадовский [и др.]. – Санкт-Петербург : Гидрометеоздат, 1993. – 264 с.
35. РД 52.24.420-2019. Биохимическое потребление кислорода в водах. Методика измерений титриметрическим и амперометрическим методами / разработ. ФГБУ «Гидрохим. ин-т». – Ростов-на-Дону, 2020. – 31 с.
36. РД 52.24.496-2018. Методика измерений температуры, прозрачности и определение запаха воды / разработ. ФГБУ «Гидрохим. ин-т». – Ростов-на-Дону, 2018. – 14 с.
37. Серебрякова Е. В., Дармов И. В., Медведев Н. П., Алексеев С. А., Рыбак С. И. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 2. – С. 237–239.
38. Сироткин А. С., Шагинурова Г. И., Ипполитов К. Г. Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биоплёнки, микробные гранулы. – Казань : Фэн, 2007. – 157 с.
39. Шеломков А. С., Захватаева Н. В. Очистка сточных вод от фосфатов // Вода. – 2008. – № 10. – С. 5–7.
40. Шигаева М. Х., Мукашева Т. Д., Бержанова Р. Ж., Сыдыкбекова Р. К. Разнообразие микроорганизмов – продуцентов поверхностно-активных веществ // Materialy VI Mezinárodní vědecko-praktická conference «Vědecký pokrok na rozmezí tisíciletí – 2010», 27.05.2010–05.06.2010 / šéfred. Z. Černák. – Praha : Education and science, 2010. – URL: [https://www.rusnauka.com/14\\_NPRT\\_2010/Biologia/67157.doc.htm](https://www.rusnauka.com/14_NPRT_2010/Biologia/67157.doc.htm) (дата обращения: 15.02.2022).
41. Экологический мониторинг: шаг за шагом / Веницианов Е. В., Виниченко В. Н., Гусева Т. В. [и др.] ; ред. Заика Е. А. – Москва : РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2003. – 252 с.
42. Яскович Г. А. Роль гидрофобности клеточной поверхности в адсорбционной иммобилизации штаммов бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. – 1998. – Т. 34, № 4. – С. 410–413.
43. Benitez-Nelson C. R. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems // Earth-Science Reviews. – 2000. – Vol. 51, iss. 1/4. – P. 109–135. – [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(00\)00018-0](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(00)00018-0)

44. Bergey's manual of systematic bacteriology. In 5 vol. Vol. 2, pt B. The Gammaproteobacteria / D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley (eds). – 2nd ed. – New-York : Springer, 2005. – 1106 p.
45. *Carman R., Edlund G., Damberg C.* Distribution of organic and inorganic phosphorus compounds in marine and lacustrine sediments: a <sup>31</sup>P NMR study // *Chemical Geology*. – 2000. – Vol. 163, iss. 1/4. – P. 101–114. – [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(99\)00098-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(99)00098-4)
46. *Chen Z., Li Z., Liu P., Liu Yu, Wang Ya., Li Q., He N.* Characterization of a novel bioflocculant from a marine bacterium and its application in dye wastewater treatment // *BMC Biotechnology*. – 2017. – Vol. 17. – Art. nr 84. – <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0404-z>
47. *Cooper D. G., Goldenberg B. G.* Surface-active agents from two *Bacillus* species // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1987. – Vol. 53, № 2. – P. 224–229. – <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>
48. *Environmental phosphorus handbook* / ed. by E. J. Griffith [et al.]. – New York [et al.] : John Wiley & Sons, 1973. – 767 p.
49. *Gao J., Bao H., Xin M., Liu Yu., Li Q., Zhang Ya.* Characterization of a bioflocculant from a newly isolated *Vagococcus sp.* W31 // *Journal of Zhejiang University. Science B (Biomedicine & Biotechnology)*. – 2006. – Vol. 7, iss. 3. – P. 186–192. – <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0186>
50. *Head I. M., Jones D. M., Roling W. F. M.* Marine microorganisms make a meal of oil // *Nature Reviews. Microbiology*. – 2006. – Vol. 4, iss. 3. – P. 173–182. – <https://doi.org/10.1038/nrmicro1348>
51. *Hupfer M., Gloess S., Grossart H.-P.* Polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2007. – Vol. 47, nr 3. – P. 299–311. – <https://doi.org/10.3354/ame047299>
52. *Hupfer M., Rütibe B., Schmieder P.* Origin and diagenesis of polyphosphate in lake sediments: a <sup>31</sup>P NMR study // *Limnology and Oceanography*. – 2004. – Vol. 49, iss. 1. – P. 1–10. – <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.1.0001>
53. *Janssen P. M. J., Meinema K., van der Roest H. F.* Biological phosphorus removal: manual for design and operation. – [S. l.] : Intern. water assoc. publ., 2002. – 224 p.
54. *Kurane R., Takeda K., Suzuki T.* Screening for and characteristics of microbial flocculants // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1986. – Vol. 50, iss. 9. – P. 2301–2307. – <https://doi.org/10.1271/BBB1961.50.2301>
55. *Lo Giudice A., Bruni V., De Domenico M., Michaud L.* Psychrophiles – cold adapted hydrocarbon-degrading microorganisms // *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* / ed. by K. N. Timmis. – Berlin [et al.] : Springer, 2010. – P. 1897–1921. – [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_139](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_139)
56. *Mills A. I., Breuil C., Colwell R. R.* Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probably number method // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1978. – Vol. 24, iss. 5. – P. 552–557. – <https://doi.org/10.1139/m78-089>
57. *Paytan A., McLaughlin K.* The oceanic phosphorus cycle // *Chemical Reviews*. – 2007. – Vol. 107, iss. 2. – P. 563–576. – <https://doi.org/10.1021/CR0503613>
58. *Zhang Y., Miller R. M.* Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1995. – Vol. 61, nr 6. – P. 2247–2251. – <https://doi.org/10.1128/aem.61.6.2247-2251.1995>

## BIOTRANSFORMING POTENTIAL OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE BARENTS SEA

Kozhukhova E. V., Makarevich E. V., Litvinova M. Yu., Balachina E. S.

Murmansk Arctical University, Murmansk, Russian Federation,

e-mail: [kozhukhovaev@mstu.edu.ru](mailto:kozhukhovaev@mstu.edu.ru)

**Abstract:** Application of active biotransforming microorganisms isolated directly from natural hydroecosystems, for bioremediation of the Barents Sea water area, appears to be feasible, as such microbial isolates possess specific enzymatic complexes adapted to environmental factors, being at the same time non-genetically modified and non-toxic for the rest of hydrobionts in the ecosystem. This work estimates the potential of heterotrophic microorganisms isolated from various areas of the Barents Sea, for transformation of phosphorus- and hydrocarbon containing compounds, according to a set of indicators (phosphate accumulation and hydrocarbon oxidation, flocculation activity of biodestructors, hydrophobicity level of bacterial cell surface and emulsifying activity index for oil products). Test cultures demonstrated the ability to utilize the pollutants in the range of 25–44 %, under conditions imitating the composition of desalinated marine ecosystems. However, only three cultures out of seven tested strains, namely *B. cereus*, *S. proteamaculans* and *Sh. baltica*, demonstrated the medium level of biotransforming activity reaching 43 % in model experiments.

**Keywords:** heterotrophic bacteria, Barents Sea, phosphorus, hydrocarbons, microbial transformation, bioflocculation.

### Сведения об авторах

Кожухова Екатерина Вячеславовна	старший преподаватель кафедры микробиологии и биохимии, ФГАОУ ВО «Мурманский арктический университет», г. Мурманск, Российская Федерация, ул. Капитана Егорова, д. 16, <a href="mailto:kozhukhovaev@mstu.edu.ru">kozhukhovaev@mstu.edu.ru</a>
Макаревич Елена Викторовна	кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой микробиологии и биохимии, ФГАОУ ВО «Мурманский арктический университет», г. Мурманск, Российская Федерация, ул. Капитана Егорова, д. 16, <a href="mailto:makarevichev@mstu.edu.ru">makarevichev@mstu.edu.ru</a>
Литвинова Марина Юрьевна	кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и биохимии, ФГАОУ ВО «Мурманский арктический университет», г. Мурманск, Российская Федерация, ул. Капитана Егорова, д. 16, <a href="mailto:litvinovamyu@mstu.edu.ru">litvinovamyu@mstu.edu.ru</a>
Балачина Екатерина Сергеевна	кандидат естественных наук, доцент кафедры микробиологии и биохимии, ФГАОУ ВО «Мурманский арктический университет», г. Мурманск, Российская Федерация, ул. Капитана Егорова, д. 16, <a href="mailto:mishchenkoes@mstu.edu.ru">mishchenkoes@mstu.edu.ru</a>

Поступила в редакцию 26.10.2023 г.

Принята к публикации 27.02.2024 г.

## РОЛЬ БЕТА-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ И АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ ГЕМОЦИТОВ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ МИДИИ (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*) К ГИПООСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ \*

Ткачук А. А., Кладченко Е. С., Андреева А. Ю.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,

г. Севастополь, Российская Федерация,

e-mail: [aatkachuk86@gmail.com](mailto:aatkachuk86@gmail.com)

**Аннотация:** Осмотический гомеостаз является одной из фундаментальных основ выживания гидробионтов, обитающих в прибрежных экосистемах Мирового океана. У двустворчатых моллюсков стресс, вызванный колебанием солёности воды, может индуцировать секрецию нейромедиаторов, включая катехоламины. Гемоциты, циркулирующие в гемолимфе двустворчатых моллюсков, имеют на поверхности клеточной мембраны адренорецепторы, но фундаментальные знания о воздействии катехоламинов на функции клеток гемолимфы, а также механизмы их осморегуляции изучены слабо. В настоящей работе было исследовано влияние эпинефрина и активатора растворимой аденилатциклазы — форсколина на осмотическую стойкость гемоцитов промыслового двустворчатого моллюска средиземноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis*). Также изучено влияние этих веществ на способность клеток гемолимфы мидий к регуляторному снижению объёма в ответ на гипоосмотический стресс. В условиях эксперимента *in vitro* показано, что стимуляция гемоцитов мидий эпинефрином (25 мкМ) и форсколином (20 мкМ) не оказывала влияния на данный параметр осмотической стойкости гемоцитов средиземноморской мидии. Установлено, что стимуляция форсколином не влияет на скорость и интенсивность регуляторного снижения объёма гемоцитов в ответ на гипоосмотическое набухание, в то время как инкубация с эпинефрином ингибировала способность клеток гемолимфы мидий восстанавливать объём в гипоосмотических условиях. Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что аденилатцикласный сигнальный путь задействован в регуляции процессов восстановления объёма гемоцитов мидий в ответ на гипоосмотический стресс.

**Ключевые слова:** солёностный стресс, средиземноморская мидия, эпинефрин, форсколин, осморегуляция

### Введение

Прибрежные воды Мирового океана подвержены резким колебаниям абиотических факторов среды [Lange, Klingbeil, Burchard, 2020]. Солёность является одним из ключевых факторов, определяющих выживание гидробионтов в водных экосистемах [Evans, Kültz, 2020; Tian et al., 2020]. На уровень солёности большое влияние оказывают штормы, приливно-отливные процессы, особенности гидрологического режима рек и др. Вышеуказанные факторы приводят к циклическим и резким изменениям солёности воды. В наибольшей степени колебаниям солёности прибрежных вод подвержены организмы литоральной зоны, в частности двустворчатые моллюски [Lange, Klingbeil, Burchard, 2020; Pourmozaffar et al., 2020].

\*Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 22-26-00165 «Функциональный и иммунный статус двустворчатых моллюсков — объектов мариккультуры в условиях действия факторов глобальных изменений климата» и частично в рамках государственного задания №1023033000140-3-1.6.16 (FNNZ-2024-0035) «Механизмы функционирования иммунной системы двустворчатых моллюсков и физиологические основы её адаптации к абиотическим, биотическим и антропогенным факторам окружающей среды».

Двустворчатые моллюски являются осмоконформерами, т. е. осмолярность гемолимфы изменяется в соответствии с колебаниями внешней солёности [Pourmozaffar et al., 2020; Tan et al., 2022; Medeiros, Faria, Souza, 2020]. Выживание, рост и размножение двустворчатых моллюсков в условиях солёностного стресса, в отличие от позвоночных, обеспечивается за счёт внутриклеточных осморегуляторных механизмов [Pourmozaffar et al., 2020]. Свободно циркулирующие клетки гемолимфы (гемоциты) играют ключевую роль в иммунной системе, восстановлении тканей и раковины, пищеварении, дыхании и др. [Ballina et al., 2022]. Колебания осмолярности гемолимфы в условиях солёностного стресса приводят к изменениям объёма гемоцитов за счёт перемещения молекул воды и осмолитов через их клеточную мембрану [Wu et al., 2020; Pérez-Velasco, Manzano-Sarabia, Hurtado-Oliva, 2022]. Показано, что гемоциты некоторых двустворчатых моллюсков (*Mytilus galloprovincialis* [Torre et al., 2013], *M. edulis* [Maar et al., 2015], *Magallana gigas* [Naceur et al., 2016], *Crassostrea angulata*, *C. virginica* [Pourmozaffar et al., 2020], *Anadara kagoshimensis* [Kladchenko et al., 2022]) обладают механизмами регуляции объёма для поддержания функций в условиях солёностного стресса. Процессы, ответственные за восстановление клеточного объёма после осмотического набухания или сжатия, называются, соответственно, регуляторным уменьшением объёма (regulatory volume decrease, RVD) и регуляторным увеличением объёма (regulatory volume increase, RVI) [Larsen, Hoffmann, 2020]. Предыдущие исследования показали, что солёность влияет на функции гемоцитов двустворчатых моллюсков, что приводит к нарушению иммунного статуса организма [Pourmozaffar et al., 2020]. Так, в работе Жозейна и коллег [Jauzein, Donaghy, Volety, 2013] показано, что пониженная солёность вызвала у моллюска *Macrocallista nimbosa* увеличение объёма клеток и лизосомальных компартментов, снижение способности к фагоцитозу, развитие окислительного стресса и гибель гемоцитов. Также гипоосмотический стресс ингибировал фагоцитарную активность, приводил к угнетению активности внутриклеточных эстераз и снижению жизнеспособности гемоцитов у тихоокеанской устрицы *M. gigas* [Gagnaire et al., 2006]. Бассел с коллегами в работе [Bussell et al., 2008] обнаружили, что солёностный стресс может привести к значительному снижению числа эозинофильных гемоцитов и ингибированию фагоцитарной способности у мидии *M. edulis*.

Резкое изменение солёности среды сопряжено с развитием классической стресс-реакции в организме двустворчатого моллюска, что стимулирует выброс нейромедиаторов стресса [Wei et al., 2022; Coates, Söderhäll, 2021]. Важную роль в регуляции физиологической активности и повышении индивидуальной адаптивности моллюсков к окружающей среде играют механизмы реакции на стресс, модулируемые нейроэндокринной системой. Гемоциты имеют специфические рецепторы к высвобождаемым нейроэндокринной системой нейромедиаторам, в частности катехоламинам. Исследования Лакоста и его коллег [Lacoste et al., 2001] показали, что норадреналин (наиболее важный катехоламин у моллюсков) синтезируется гемоцитами двустворчатых моллюсков и высвобождается в гемолимфу во время реакции физиологического стресса. Известно, что у большинства видов животных передача сигнала через  $\beta$ -адренорецепторы осуществляется путём активации цАМФ-зависимой протеинкиназы А, однако внутриклеточные сигнальные пути в гемоцитах двустворчатых моллюсков исследованы крайне слабо. Неизвестно также, влияет ли выброс катехоламинов на механические свойства клеточной мембраны гемоцитов, в частности их осмотическую стойкость. Исследования на низших позвоночных свидетельствуют, что осмотическая стойкость эритроцитов может меняться под воздействием адреналина, а также активаторов протеинкиназы А [Andreyeva et al., 2021].

Таким образом, цель настоящей работы заключается в исследовании влияния катехоламинов и активатора растворимой аденилатциклазы форсколина на осмотическую стойкость и динамику регуляторного снижения объёма (RVD) в ответ на гипоосмотический стресс у клеток гемолимфы двустворчатого моллюска *M. galloprovincialis*.

## Материалы и методы

Средиземноморские мидии *M. galloprovincialis* (размер  $(84,7 \pm 1,5)$  мм, вес  $(31,2 \pm 2,8)$  г,  $n = 70$ ) были получены на марикультурной ферме в районе г. Севастополя (ООО «Марикультура»). Для адаптации к лабораторным условиям (концентрация кислорода  $7-8$  мг·л<sup>-1</sup>, рН = 8,2, температура  $18-20$  °С) моллюсков содержали в пластиковых аквариумах ёмкостью  $50-70$  л, оборудованных системой аэрации и фильтрации воды, в течение недели. Далее из синуса заднего мускула-замыкателя раковины у моллюсков стерильным шприцем отбирали пробу гемолимфы ( $0,5-2,0$  мл). Клетки гемолимфы трижды отмывали в стерильной морской воде на рефрижераторной центрифуге Eppendorf 5430R (500 g, 5 мин). После первой отмывки брали пробу надосадочной жидкости (100 мкл) для оценки осмолярности гемолимфы на осмометре OsmoSpecial 1 (Astori, Италия). По окончании отмывки гемоциты ресуспендировали в стерильной морской воде (концентрация клеток от  $2 \cdot 10^6$  до  $4 \cdot 10^6$  кл·мл<sup>-1</sup>) для анализа методом лазерной дифракции.

Регистрация процесса лизиса гемоцитов и изменений их объёма при осмотической стимуляции проводилась в измерительной кювете лазерного анализатора Ласка-ТМ («Биомедсистемс», Россия) при температуре  $13$  °С. Осмотический тест гемоцитов проводили путём серийных разведений суспензий гемоцитов в стерильной морской воде (1 мл) дистиллированной водой (по  $1-2$  мл) с постепенным снижением осмолярности суспензии и добавлением соответствующего объёма гемоцитов для поддержания постоянной концентрации клеток. За физиологическую осмолярность принимали осмолярность гемолимфы моллюсков (солёность  $18$  ‰, осмолярность  $(460,0 \pm 2,0)$  мОсм·л<sup>-1</sup>). Осмотический тест проводился в диапазоне осмолярности от  $460$  до  $20$  мОсм·л<sup>-1</sup>. Для количественного анализа кривой осмотической стойкости (регистрация в течение  $30$  мин) на программном обеспечении лазерного анализатора «Ласка-ТМ» проводили анализ параметров H10, H50 и H90, соответствующих величине осмолярности среды, при которой происходил лизис  $10$ ,  $50$  и  $90$  % клеток в суспензии соответственно [Kladchenko et al., 2022; Kladchenko et al., 2023; Makhro et al., 2016].

Для определения способности гемоцитов мидий регулировать свой объём после осмотического набухания в условиях *in vitro* проводили моделирование гипоосмотического стресса. Анализ кинетики регуляторных изменений объёма гемоцитов в условиях осмотического стресса проводили при помощи метода лазерной дифракции. Инициация реакции RVD в ответ на гипоосмотическое набухание осуществлялась следующим образом: осмолярность среды в  $1$  мл суспензии гемоцитов моллюсков (концентрация клеток от  $2 \cdot 10^6$  до  $4 \cdot 10^6$  кл·мл<sup>-1</sup>, осмолярность  $(460,0 \pm 2,0)$  мОсм·л<sup>-1</sup>) резко снижали до  $(216,0 \pm 4,0)$  мОсм·л<sup>-1</sup> путём добавления дистиллированной воды (1 мл) и эквивалентного количества клеток (для сохранения постоянства их концентрации в измерительной кювете). Далее изменения объёма клеток в суспензии контролировали в течение  $60$  мин.

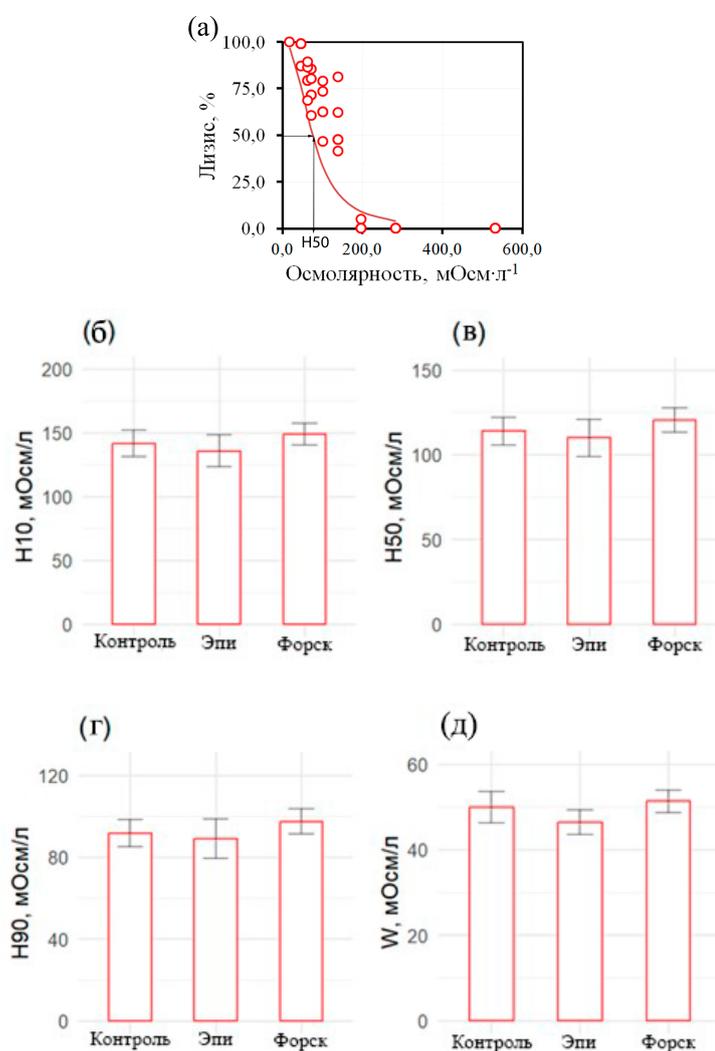
Для определения роли аденилатциклазного сигнального пути в регуляции осмотически зависимых изменений объёма гемоцитов применяли стимуляцию гемоцитов мидий (*in vitro*) эпинефрином (финальная концентрация в пробе  $25$  мкМ [Andreyeva et al., 2021]) и форсколином (финальная концентрация в пробе  $20$  мкМ [Andreyeva et al., 2021]).

Расчёт объёма гемоцитов и доли лизированных клеток в суспензии проводили с использованием программного обеспечения лазерного анализатора LaSca\_32.

Различия между контрольной и экспериментальной группами оценивались с помощью непараметрического U-критерия Манна — Уитни. Данные были представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Результаты считались статистически значимыми, если вероятность ошибки первого рода (P) была меньше  $0,05$ .

## Результаты

Осмолярность гемолимфы мидий соответствовала осмолярности морской воды при 18 ‰ и составила  $(460,0 \pm 2,0)$  мОсм·л<sup>-1</sup>. Постепенное снижение осмолярности среды приводило к набуханию гемоцитов. Лизис гемоцитов начинался при среднем уровне осмолярности среды  $(141,9 \pm 10,4)$  мОсм·л<sup>-1</sup>, когда лизировало 10 % гемоцитов мидий (параметр Н10), достигнув максимального объёма набухания клеток (рисунок 1, а, б). Лизис 50 % клеток в суспензии (рисунок 1, а, в) наблюдался при средней осмолярности в  $(114,7 \pm 8,8)$  мОсм·л<sup>-1</sup>. Полный лизис гемоцитов (параметр Н90), соответствующий лизису 90 % клеток в суспензии (рисунок 1, а, г), наступал при осмолярности среды  $(92,7 \pm 7,5)$  мОсм·л<sup>-1</sup>. Стимуляция гемоцитов мидий эпинефрином (25 мкМ) и форсколином (20 мкМ) не оказывала достоверного влияния на параметры их осмотической стойкости по сравнению с контрольной группой, а также не влияла на ширину распределения кривой осмотической стойкости (параметр W) (рисунок 1, д).

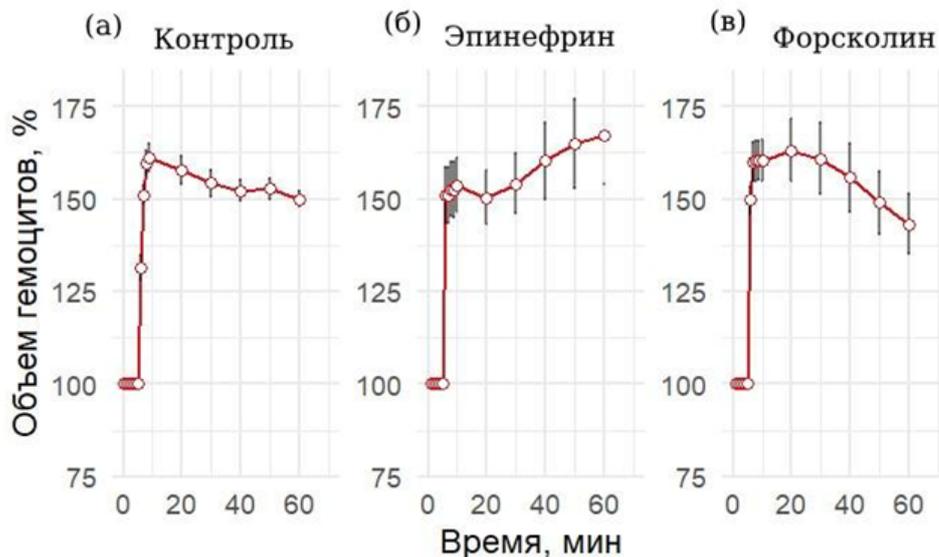


**Рис. 1.** Стимуляция гемоцитов средиземноморской мидии эпинефрином (25 мкМ) и форсколином (20 мкМ) не влияет на их осмотическую стойкость: (а) — кривая осмотической стойкости контрольной группы (отсутствие стимуляции клеток), (б) — лизис 10 % клеток (параметр Н10), (в) — лизис 50 % клеток (параметр Н50), (г) — лизис 90 % клеток (параметр Н90), (д) — ширина распределения кривой осмотической стойкости (параметр W). Различия между контрольной и экспериментальной группами оценивались с помощью непараметрического U-критерия Манна — Уитни. Данные были представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка ( $n = 10$ )

При моделировании реакции RVD в ответ на гипоосмотическое набухание снижение осмолярности среды с  $(460,0 \pm 2,0)$  до  $(216,0 \pm 4,0)$  мОсм·л<sup>-1</sup> приводило к резкому (в течение 1–2 мин) набуханию гемоцитов мидий — средний объём клеток составлял  $(161,95 \pm 4,25)$  % относительно их исходного объёма ( $p < 0,05$ ). Спустя 4 минуты набухания объём гемоцитов начинал постепенно снижаться и по истечении периода записи (60 мин) составлял  $(149,9 \pm 2,0)$  % относительно исходного объёма (рисунок 2, а). Таким образом, хотя объём гемоцитов не восстановился до исходных значений (до набухания), он достоверно снизился ( $p < 0,05$ ). Это свидетельствует о наличии у гемоцитов мидий способности к RVD, что является классическим ответом на гипоосмотический стресс, присущим клеткам животных.

В условиях стимуляции эпинефрином (концентрация в пробе 25 мкМ) гипоосмотический стресс также приводил к резкому (в течение 2 мин) росту объёма гемоцитов мидий на  $(150,8 \pm 7,5)$  % относительно исходного объёма клеток (рисунок 2, б). Далее объём гемоцитов достоверно не снижался и в конце экспериментального периода (60 мин) составлял  $(167,2 \pm 13,3)$  % относительно исходного объёма.

Стимуляция гемоцитов мидий форсколином не влияла на динамику процесса RVD у гемоцитов мидий (рисунок 2, в). В течение первых двух минут после снижения осмолярности до  $(210,3 \pm 6,2)$  мОсм·л<sup>-1</sup> клетки гемолимфы резко увеличились в объёме до  $(160,0 \pm 5,2)$  % относительно уровня нормальной осмолярности. Затем объём гемоцитов начинал постепенно снижаться и в конце 60-минутной записи составлял  $(143,2 \pm 8,3)$  % ( $p < 0,05$ ). Таким образом, показатели динамики процесса восстановления объёма гемоцитов мидий не отличались от контрольных параметров.



**Рис. 2.** Эпинефрин блокирует способность гемоцитов к регуляторному снижению объёма (RVD) при гипоосмотическом стрессе: (а) — контрольная динамика RVD, (б) — RVD при стимуляции клеток эпинефрином (25 мкМ), (в) — RVD при стимуляции клеток форсколином (20 мкМ). Различия между контрольной и экспериментальной группами оценивались с помощью непараметрического U-критерия Манна — Уитни. Данные были представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка ( $n = 10$ )

## Обсуждение

Широкий диапазон солёностной толерантности двустворчатых моллюсков обеспечивается преимущественно клеточными механизмами адаптации [Velez et al., 2016; Carregosa et al., 2014; Pourmozaffar et al., 2020]. В нашем предыдущем исследовании мы показали, что гемоциты анадары (*Anadara kagoshimensis*) более устойчивы к гипоосмотическому стресс-тесту в сравнении с эритроцитами низших позвоночных [Kladchenko et al., 2023]. В настоящей работе параметры кривой осмотической стойкости мидий были выше по значениям, чем у позвоночных животных [Andreyeva et al., 2021], однако отличались меньшей стабильностью в сравнении с анадарой. В контрольной группе лизис 50 % гемоцитов наступал при снижении осмолярности среды в 4–5 раз, в то время как 50 % гемоцитов анадары подвергалось лизису при снижении осмолярности среды в 10–12 раз [Kladchenko et al., 2023]. С другой стороны, для эритроцитов водных позвоночных H50 наблюдался при снижении осмолярности примерно в 4 раза [Andreyeva et al., 2018; Demanche, 1980; Andreyeva et al., 2019]. Следовательно, хотя средиземноморская мидия имеет схожий с анадарой солёностный ареал, гемоциты мидии обладают меньшей осмотической стойкостью по сравнению с гемоцитами анадары. Это, вероятно, может свидетельствовать о более высокой чувствительности данного вида двустворчатых моллюсков к кратковременным колебаниям солёности среды.

В ответ на изменения солёности двустворчатые моллюски демонстрируют классический стресс-ответ, который включает также изменение концентрации катехоламинов в гемолимфе [Pankhurst, 2011]. Вместе с тем роль эpineфрина в регуляции механических свойств мембран гемоцитов, т. е. стабильности, эластичности, текучести, изучена относительно слабо. У позвоночных воздействие эpineфрина на эритроциты инициируется его связыванием с  $\beta$ -адренорецепторами с последующей активацией аденилатциклазы [Pretini et al., 2019]. Мы обнаружили, что стимуляция эpineфрином и форсколином не влияла на осмотическую стабильность гемоцитов мидий. В то время как у карася (*Carassius carassius*) аналогичная инкубация эритроцитов с эpineфрином и форсколином приводила к изменению их осмотической стабильности [Andreyeva et al., 2021]. Роль катехоламин-зависимой передачи сигналов в регуляции свойств мембран эритроцитов была также показана у млекопитающих, где воздействие агонистов  $\beta$ -адренорецепторов вызывало существенные сдвиги в текучести и эластичности мембран [Tuvia et al., 1999; Muravyov et al., 2011]. В настоящей работе мы обнаружили, что осмотическая стабильность гемоцитов мидии не зависит от активации протеинкиназы А, поскольку клетки, обработанные форсколином и эpineфрином, не демонстрировали существенных изменений по всем четырём параметрам кривой осмотической стабильности (H10, H50, H90 и W) по сравнению с контрольной группой.

Мы также показали, что объём гемоцитов мидий в гипоосмотических условиях достоверно снижался, однако полного восстановления исходных размеров клеток в период эксперимента не произошло. Спустя 60 мин реализации ответа RVD объём гемоцитов снизился на 10–12 %. Степень восстановления объёма после гипоосмотического набухания гемоцитов мидий в ответ на гипоосмотический стресс была наименее выраженной в сравнении с гемоглобинсодержащими гемоцитами двустворчатых моллюсков [Kladchenko et al., 2022] и низшими позвоночными [Andreyeva et al., 2019; Andreyeva et al., 2018]. Вместе с тем наибольшее снижение объёма, как и в случае с эритроцитами низших позвоночных, происходило в течение первых 15–20 мин после гипоосмотического набухания, а в дальнейшем процесс замедлялся [Andreyeva et al., 2019; Andreyeva et al., 2018]. Механизмы, лежащие в основе реакции RVD у моллюсков, до конца неясны. Бреганте с соавторами предположили, что процесс RVD в гемоцитах *M. galloprovincialis* может осуществляться так же, как и в эритроцитах низших позвоночных, — за счёт активации  $K^+Cl^-$  котранспортера [Bregante et al., 2016].

Хотя добавление эпинефрина и форсколина не повлияло на осмотическую стабильность гемоцитов мидий, некоторые клеточные реакции осморегуляции, в частности регуляторное снижение объёма в ответ на гипоосмотический стресс, по всей видимости, чувствительны к катехоламинам. Форсколин не оказывал значимого влияния на динамику и продолжительность реакции RVD, в то время как эпинефрин ингибировал реакцию RVD в гемоцитах мидий. Эти различия, вероятно, связаны с тем фактом, что эпинефрин активирует только рецепторсвязывающие аденилатциклазы, в то время как форсколин, в свою очередь, способствует активации всех клеточных аденилатциклаз. Интересно, что у *C. carassius* реакция RVD эритроцитов в гипоосмотической среде не зависела ни от наличия эпинефрина, ни форсколина в среде [Andreyeva et al., 2021]. Дифференцированный ответ гемоцитов мидий при стимуляции эпинефрином и форсколином свидетельствует о том, что внутриклеточная регуляция процессов восстановления объёма клеток гемолимфы в гипоосмотических условиях имеет также другие пути активации и ингибирования. Однако для точного их определения необходимы дальнейшие исследования.

### Выводы

Таким образом, результаты проведенной серии экспериментов позволили сделать вывод, что аденилатциклазный сигнальный путь задействован в регуляции процессов восстановления объёма гемоцитов мидий в ответ на гипоосмотический стресс, однако не влияет на их осмотическую стойкость. Стимуляция клеток гемолимфы моллюсков эпинефрином останавливала процесс RVD. Дальнейшее исследование механизмов нейроэндокринной регуляции функций в организме двустворчатых моллюсков и роли этого пути в адаптации их к колебаниям солёности может помочь в развитии аквакультуры двустворчатых моллюсков, поскольку расположение ферм в прибрежной зоне предполагает возможность резких колебаний условий и сопряжённое с этим возникновение стресса у посадочного материала.

### Список литературы

1. Andreyeva A. Yu., Kladchenko E. S., Sudnitsyna J. S., Krivchenko A. I., Mindukshev I. V., Gambaryan S. Protein kinase A activity and NO are involved in the regulation of crucian carp (*Carassius carassius*) red blood cell osmotic fragility // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 2021. – Vol. 47, iss. 4. – P. 1105–1117. – <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00971-4>
2. Andreyeva A. Yu., Skverchinskaya E. A., Gambaryan S., Soldatov A. A., Mindukshev I. V. Hypoxia inhibits the regulatory volume decrease in red blood cells of common frog (*Rana temporaria*) // *Comparative Biochemistry and Physiology. Pt. A: Molecular & Integrative Physiology*. – 2018. – Vol. 219/220. – P. 44–47. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.02.016>
3. Andreyeva A. Yu., Soldatov A. A., Krivchenko A. I., Mindukshev I. V., Gambaryan S. Hemoglobin deoxygenation and methemoglobinemia prevent regulatory volume decrease in crucian carp (*Carassius carassius*) red blood cells // *Fish physiology and biochemistry*. – 2019. – Vol. 45, iss. 6. – P. 1933–1940. – <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00689-4>
4. Ballina N. R., Maresca F., Cao A., Villalba A. Bivalve haemocyte subpopulations: a review // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – Art. 826255. – <https://doi.org/10.3389%2Ffimmu.2022.826255>
5. Bregante M., Carpaneto A., Piazza V., Sbrana F., Vassalli M., Faimali M., Gambale F. Osmoregulated chloride currents in hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* // *Plos One*. – 2016. – Vol. 11, iss. 12. – Art. e0167972. – <https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0167972>
6. Bussell J. A., Gidman E. A., Causton D. R., Gwynn-Jones D., Malham S. K., Jones M. L. M., Reynolds B., Seed R. Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. – 2008. – Vol. 358, iss. 1. – P. 78–85. – <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.01.018>

7. Carregosa V., Velez C., Soares A. M., Figueira E., Freitas R. Physiological and biochemical responses of three *Veneridae* clams exposed to salinity changes // *Comparative Biochemistry and Physiology Pt. B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2014. – Vol. 177/178. – P. 1–9. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.08.001>
8. Coates C. J., Söderhäll K. The stress – immunity axis in shellfish // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2021. – Vol. 186. – Art. 107492. – <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107492>
9. Demanche R. The osmotic fragility of red blood cells of marine animals: a comparative study : diss. : theses. – [Williamsburg, USA], 1980. – <https://dx.doi.org/doi:10.21220/s2-1jmc-wk51>
10. Evans T. G., Kültz D. The cellular stress response in fish exposed to salinity fluctuations // *Journal of Experimental Zoology Pt. A: Ecological and Integrative Physiology*. – 2020. – Vol. 333, iss. 6. – P. 421–435. – <https://doi.org/10.1002/jez.2350>
11. Gagnaire B., Frouin H., Moreau K., Thomas-Guyon H., Renault T. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2006. – Vol. 20, iss. 4. – P. 536–547. – <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.07.003>
12. Jauzein C., Donaghy L., Volety A. K. Flow cytometric characterization of hemocytes of the sunray venus clam *Macrocallista nimbosa* and influence of salinity variation // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2013. – Vol. 35, iss. 3. – P. 716–724. – <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.003>
13. Kladchenko E. S., Andreyeva A. Y., Mindukshev I. V., Gambaryan S. Cellular osmoregulation of the ark clam (*Anadara kagoshimensis*) hemocytes to hyposmotic media // *Journal of Experimental Zoology. Pt. A: Ecological and Integrative Physiology*. – 2022. – Vol. 337, iss. 5. – P. 434–439. – <https://doi.org/10.1002/jez.2578>
14. Kladchenko E. S., Gostyukhina O. L., Soldatov A. A., Rychkova V. N., Andreyeva A. Yu. Functional changes in hemocytes and antioxidant activity in gills of the ark clam *Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae) induced by salinity fluctuations // *Comparative Biochemistry and Physiology Pt. B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2023. – Vol. 264. – Art. 110810. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2022.110810>
15. Lacoste A., Malham S. K., Cueff A., Poulet S. A. Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via a  $\beta$ -adrenergic receptor – cAMP signaling pathway // *General and Comparative Endocrinology*. – 2001. – Vol. 122, iss. 3. – P. 252–259. – <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7643>
16. Lange X., Klingbeil K., Burchard H. Inversions of estuarine circulation are frequent in a weakly tidal estuary with variable wind forcing and seaward salinity fluctuations // *Journal of Geophysical Research: Oceans*. – 2020. – Vol. 125, iss. 9. – Art. e2019JC015789. – <https://doi.org/10.1029/2019JC015789>
17. Larsen E. H., Hoffmann E. K. Volume regulation in epithelia // *Basic Epithelial Ion Transport Principles and Function* / eds: K. L. Hamilton, D. C. Devor. – Second ed. – [Switzerland] : Springer, 2020. – Vol. 1. – P. 395–460. – [https://doi.org/10.1007/978-3-030-52780-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-52780-8_11)
18. Maar M., Saurel C., Landes A., Dolmer P., Petersen J. K. Growth potential of blue mussels (*M. edulis*) exposed to different salinities evaluated by a Dynamic Energy Budget model // *Journal of Marine Systems*. – 2015. – Vol. 148. – P. 48–55. – <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2015.02.003>
19. Makhro A., Huisjes R., Verhagen L. P., Del Mar Mañu-Pereira M., Llaudet-Planas E., Petkova-Kirova P., Wang J., Eichler H., Bogdanova A., Van Wijk R., Vives-Corrons J.-L., Kaestner L. Red cell properties after different modes of blood transportation // *Frontiers in Physiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 288. – <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00288>
20. Medeiros I. P. M., Faria S. C., Souza M. M. Osmoionic homeostasis in bivalve mollusks from different osmotic niches: physiological patterns and evolutionary perspectives // *Comparative Biochemistry and Physiology. Pt. A: Molecular & Integrative Physiology*. – 2020. – Vol. 240. – Art. 110582. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.110582>

21. Muravyov A. V., Koshelev V. B., Fadukova O. E., Tikhomirova I. A., Maimistova A. A., Bulaeva S. V. The role of red blood cell adenylyl cyclase activation in changes of erythrocyte membrane microrheological properties // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology*. – 2011. – Vol. 5, iss. 2. – P. 128–134. – <https://doi.org/10.1134/S1990747811020036>
22. Naceur C. B., Maxime V., Mansour H. B., Le Tilly V., Sire O. Oyster's cells regulatory volume decrease: a new tool for evaluating the toxicity of low concentration hydrocarbons in marine waters // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2016. – Vol. 133. – P. 327–333. – <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.030>
23. Pankhurst N. W. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective // *General and Comparative Endocrinology*. – 2011. – Vol. 170, iss. 2. – P. 265–275. – <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.017>
24. Pérez-Velasco R., Manzano-Sarabia M., Hurtado-Oliva M. Á. Effect of hypo- and hypersaline stress conditions on physiological, metabolic, and immune responses in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae) // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2022. – Vol. 120. – P. 252–260. – <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.11.033>
25. Pourmozaffar S., Tamadoni Jahromi S., Rameshi H., Sadeghi A., Bagheri T., Behzadi S., Gozari M., Reza Zahedi M., Abrari Lazarjani S. The role of salinity in physiological responses of bivalves // *Reviews in Aquaculture*. – 2020. – Vol. 12, iss. 3. – P. 1548–1566. – <https://doi.org/10.1111/raq.12397>
26. Pretini V., Koenen M. H., Kaestner L., Fens M. H. A. N., Schiffelers R. M., Bartels M., Van Wijk R. Red blood cells: chasing interactions // *Frontiers in Physiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 945. – <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945>
27. Tan K., Fu W., Zhang H., Ma H., Li S., Zheng H. Intraspecific hybridization as a mitigation strategy of low salinity in marine bivalve noble scallop *Chlamys nobilis* // *Aquaculture*. – 2022. – Vol. 552. – Art. 738037. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738037>
28. Tian L., Tan P., Yang L., Zhu W., Xu D. Effects of salinity on the growth, plasma ion concentrations, osmoregulation, non-specific immunity, and intestinal microbiota of the yellow drum (*Nibea albiflora*) // *Aquaculture*. – 2020. – Vol. 528. – Art. 735470. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735470>
29. Torre A., Trischitta F., Corsaro C., Mallamace D., Faggio C. Digestive cells from *Mytilus galloprovincialis* show a partial regulatory volume decrease following acute hypotonic stress through mechanisms involving inorganic ions // *Cell Biochemistry and Function*. – 2013. – Vol. 31, iss. 6. – P. 489–495. – <https://doi.org/10.1002/cbf.2925>
30. Tuvia S., Moses A., Gulayev N., Levin S., Korenstein R.  $\beta$ -Adrenergic agonists regulate cell membrane fluctuations of human erythrocytes // *The Journal of Physiology*. – 1999. – Vol. 516, iss. 3. – P. 781–792. – <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0781u.x>
31. Velez C., Figueira E., Soares A. M. V. M., Freitas R. Combined effects of seawater acidification and salinity changes in *Ruditapes philippinarum* // *Aquatic Toxicology*. – 2016. – Vol. 176. – P. 141–150. – <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.016>
32. Wei H., Chen M., Deng Z., Zhao W., Li Y., Fang W., Ma Z., Wang Yu, Yu G. Immune and antioxidant responses of pearl oyster *Pinctada maxima* exposed to acute salinity stress // *Aquaculture Research*. – 2022. – Vol. 53, iss. 6. – P. 2439–2447. – <https://doi.org/10.1111/are.15761>
33. Wu F., Falfushynska H., Dellwig O., Piontkivska H., Sokolova I. M. Interactive effects of salinity variation and exposure to ZnO nanoparticles on the innate immune system of a sentinel marine bivalve, *Mytilus edulis* // *Science of the Total Environment*. – 2020. – Vol. 712. – Art. 136473. – <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136473>

**THE ROLE OF THE ADENYLATE CYCLASE SIGNALING PATHWAY  
IN THE ADAPTATION OF THE MEDITERRANEAN MUSSEL (*MYTILUS  
GALLOPROVINCIALIS*) HEMOCYTES TO HYPOOSMOTIC STRESS**

**Tkachuk A. A., Kladchenko E. S., Andreyeva A. Yu.**

*A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation,  
e-mail: aatkachuk86@gmail.com*

**Abstract:** Osmotic homeostasis is one of the fundamental bases for the survival of hydrobionts living in coastal ecosystems of the world ocean. In bivalves, stress induced by fluctuations in water salinity can induce the secretion of neurotransmitters, including catecholamines. Hemocytes circulating in the hemolymph of bivalves have adrenoreceptors on the cell membrane surface, but the basic knowledge of the effects of catecholamines on hemolymph cell functions as well as their osmoregulatory mechanisms is poorly understood. In the present study, the effects of epinephrine and the soluble adenylate cyclase activator forskolin on the osmotic resistance of hemocytes from the commercial bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* were investigated. The effect of these substances on the ability of bivalve hemolymph cells to undergo a regulatory volume reduction in response to hypoosmotic stress was also studied. It was shown in vitro that stimulation of mussel hemocytes with epinephrine (25  $\mu$ M) and forskolin (20  $\mu$ M) had no effect on this parameter of osmotic resistance of Mediterranean mussel hemocytes. It was found that forskolin stimulation did not affect the rate and intensity of the regulatory decrease in hemocyte volume in response to hypoosmotic swelling, whereas incubation with epinephrine inhibited the ability of mussel hemolymph cells to restore volume under hypoosmotic conditions. The results of the present work indicate that the adenylate cyclase signaling pathway is involved in the regulation of mussel hemocyte volume restoration in response to hypoosmotic stress.

**Keywords:** salt stress, Mediterranean mussel, epinephrine, forskolin, osmoregulation

Сведения об авторах

Ткачук Анастасия Александровна	младший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, aatkachuk86@gmail.com
Кладченко Екатерина Сергеевна	кандидат биологических наук, научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, kladchenko_ekaterina@bk.ru
Андреева Александра Юрьевна	кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, andreevaal@gmail.com

*Поступила в редакцию 21.07.2023 г.  
Принята к публикации 26.01.2024 г.*

## ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ МОНАДНЫХ ФОРМ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ \*

Рылькова О. А., Боровков А. Б., Ханайченко А. Н., Харчук И. А.,  
Гудвиллович И. Н., Лишаев В. Н.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,  
г. Севастополь, Российская Федерация,  
e-mail: [ol.rylkova@yandex.ru](mailto:ol.rylkova@yandex.ru)

**Аннотация:** С целью оптимизации пробоподготовки монадных форм микроводорослей для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) проанализированы отечественные и зарубежные руководства. Для отработки методики использовали зелёную микроводоросль *Dunaliella salina* Teodoresco (штамм IBSS-2 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» ФИЦ ИнБЮМ), апробация протокола проведена на криптофитовых водорослях Чёрного моря (Севастопольская бухта). Показано, что при фиксации материала целесообразно снижать конечную концентрацию (к. к.) глутарового альдегида (глутаральдегида, ГА) в пробе до 1 % (для *D. salina*) или использовать ступенчатую фиксацию раствором Люголя (для криптофитовых водорослей). При концентрировании микроводорослей, имеющих жгутики, необходимо использовать максимально мягкую фильтрацию (разрежение менее 0,2 атм), промывку пробы проводить только при необходимости, дальнейшую дегидратацию целесообразно осуществлять в бюксе или пластиковом планшете. К хорошему результату приводило использование стёкол, покрытых поли-L-лизином. Показано, что не существует значительной разницы между «этанольной» и «этанольно-ацетоновой» дегидратацией, однако первый способ занимает меньше времени и не требует работы в вытяжном шкафу. Сушка «в критической точке» (2,5–3 ч) и напыление (Au/Pd; 0,5–1,0 мин) соответствовали режимам, обычно рекомендуемым в современных руководствах по пробоподготовке. При невозможности осуществления всех этапов пробоподготовки в один день или в экспедиционных условиях возможно хранение образцов до двух недель в растворе фиксатора или в 75%-ном растворе этанола (в процессе дегидратации). Предложенный протокол предмикроскопной пробоподготовки для исследований с помощью СЭМ может быть использован для изучения поверхностных структур и детализации морфологических характеристик одноклеточных водорослей, имеющих жгутики, и успешно применён при таксономических и биотехнологических исследованиях.

**Ключевые слова:** микроводоросли, монадные формы, сканирующая электронная микроскопия, пробоподготовка.

### Введение

В альгологических исследованиях всё чаще находит применение интегративный таксономический подход, основанный на комплексном анализе, включающем молекулярно-филогенетические, морфофизиологические и микроскопические (световая и электронная) характеристики культивируемых микроводорослей. Световая микроскопия (СМ), наиболее простая в методическом аспекте, позволяет видеть картину целиком, наблюдать за живыми клетками, проводить

\*Работа выполнена в рамках тем госзаданий Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН»: «Комплексное исследование экологических и физиолого-биохимических особенностей микроводорослей различных таксономических групп при адаптации к меняющимся условиям среды» (№ гос. регистрации 1023121900003-0-1.6.16), «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации № 121030300149-0).

их количественный учёт, но с её помощью не всегда удаётся окончательно установить таксономическую принадлежность микроводорослей. Для детального морфологического описания поверхностных ультраструктур клеток успешно применяется сканирующая электронная микроскопия [Морозова, 2013].

Возможности электронной микроскопии почти целиком зависят от методов предмикроскопной обработки проб, поэтому получение качественных микрофотографий с хорошей сохранностью поверхностных структур клетки с помощью СЭМ требует тщательного осмысления всех этапов пробоподготовки образцов. Методы электронной микроскопии находятся в постоянном развитии, детали обработки могут отличаться, поэтому каждому исследователю приходится подбирать и адаптировать протоколы обработки проб в зависимости от свойств объектов и целей исследования [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019].

Например, для микроводорослей, имеющих крепкий панцирь (диатомовые, панцирные динофитовые, золотистые и др.), главной проблемой при подготовке образца является удаление органических веществ, маскирующих детали поверхностных структур. Обычно клетки обрабатывают кислотами или перекисью водорода, концентрируют на фильтре или наносят на стекло, высушивают на воздухе и перед визуализацией напыляют металлами. Более сложной задачей является подготовка объектов, не имеющих жёсткой клеточной оболочки (например, беспанцирные динофитовые, криптофитовые, некоторые зелёные и др.). Для таких организмов основными этапами пробоподготовки являются: химическая фиксация, иногда постфиксация образца, концентрирование клеток, обезвоживание, высушивание и обеспечение электропроводности [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019].

Химическая фиксация организмов необходима для остановки посмертных изменений и сохранения клетки, максимально близкой к прижизненному состоянию. Все авторы придерживаются мнения, что именно этап фиксирования материала является основным в пробоподготовке образцов для электронной микроскопии [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019].

При фиксировании микроводорослей для световой микроскопии традиционно используют формальдегид. Однако клетки, не имеющие ригидных стенок, в его присутствии могут сильно деформироваться или совсем разрушаться. Наиболее часто в электронной микроскопии (для этих групп организмов) используется более «мягкий» фиксатор — глутаровый альдегид. Этот реагент «сшивает» аминокислоты в макромолекулах белка, что позволяет лучше сохранить исходную форму и размеры клеток [Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016]. Известно о применении в качестве фиксатора раствора Люголя [Bistricki, Munawar, 1978; Cerino, Zingone, 2006]. Многими авторами рекомендуется использовать осмиевую кислоту (четырёхоксид осмия) [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019], она не сжимает клетку при фиксации, сохраняя её в состоянии, близком к прижизненному, вызывает наименьшие, едва заметные изменения в структуре ядра и цитоплазмы. Кроме того, четырёхоксид осмия — один из немногих фиксаторов, используемых для изучения митохондрий, сохраняющих как жиры, так и липиды [Cerino, Zingone, 2006]. В виде паров осмиевая кислота используется для фиксации наиболее «нежных» объектов, в частности изолированных клеток криптофитовых; в виде 2%-го водного раствора тетраоксид осмия используется только в сочетании с другими веществами для дофиксации, однако следует учитывать его высокую стоимость и чрезвычайную токсичность [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019]. Часто исследователи используют несколько реактивов (смеси фиксаторов Карновского, МакДауэлла, Трампа и др.), что является авторскими разработками лабораторий [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019].

Для морских проб и альгокультур растворы фиксаторов готовят на морской воде или буферных растворах (с молярностью 0,01–1,0), что позволяет поддерживать pH (7,0–7,4), также необходимо учитывать осмолярность образца. Наиболее часто для электронной микроскопии

используют фосфатный (близкий к цитоплазматической среде большинства биологических образцов, имеет невысокую стоимость и безопасный при использовании) и какодилатный (его формула содержит мышьяк, что требует осторожности при использовании, имеет более высокую стоимость) буферы [Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016].

Кроме этого, важным моментом пробоподготовки является концентрирование микроводорослей. Для этого рекомендуется осаждение фильтрацией на поликарбонатные фильтры или центрифугирование. Известно об успешном использовании стёкол, покрытых поли-L-лизином, что обеспечивает хорошую адсорбцию клеток водорослей на покровное стекло. В этом случае удаётся избежать физических воздействий на клетку [Анисимова, 2014; Šťastný, Kouwets, 2012; Kaufnerova, Eliaš, 2013].

Известно, что все живые организмы содержат значительное количество воды, поэтому, во избежание деформации клеточных стенок, при последующих этапах обработки пробы необходимо выполнить дегидратацию образца (постепенно заменить воду в клетке этанолом или ацетоном) и затем окончательно его высушить. Обезвоживание проводят постепенно, обрабатывая материал водными растворами этанола возрастающей концентрации, заканчивают дегидратацию обычно «абсолютными» (безводными) этанолом или ацетоном.

Методы сушки в первую очередь разработаны для того, чтобы избежать влияния силы поверхностного натяжения — основной причины разрушения поверхностных структур клеток. Известны три наиболее распространённых метода подготовки образцов для СЭМ: сушка на воздухе, сушка «в критической точке» и сублимационная сушка. Воздушная сушка с использованием HMDS (hexamethyldisilazane) или TMS (tetramethylsilane) не требует специального оборудования и является новейшей технологией, набирающей в последние годы всё большую популярность. Сушка «в критической точке» с использованием жидкой двуокиси углерода (один из самых традиционных подходов в альгологии, позволяет при необходимости выполнить отмывку образца в буфере и спиртовых растворах) и сушка вымораживанием (сублимационная сушка, обеспечивает минимальный физический контакт образца с любым реагентом среды, за исключением жидкого азота) требуют специального оборудования [Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016].

И наконец, чтобы усилить проводимость и добавить механической прочности образцу, а также локализовать сигнал на поверхности образца, его напыляют тонким (от 1 нм) слоем металла, например золота, платины, палладия или вольфрама [Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016].

Целью данного исследования стало изучение и анализ общеизвестных в альгологии способов пробоподготовки микроводорослей для исследования с помощью сканирующего электронного микроскопа, разработка оптимизированного протокола для монадных форм на примере зелёной микроводоросли *Dunaliella salina*, не имеющей плотной целлюлозной оболочки, и апробация полученной методики при изучении криптофитовых водорослей Чёрного моря.

## Материалы и методы

**Растительный материал.** В работе использовали микроводоросль *Dunaliella salina* Teodoresco (штамм IBSS-2 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» ФИЦ ИнБЮМ), выращенную на модифицированной среде Ven-Amotz (с добавлением морской соли до концентрации 120 г·дм<sup>3</sup> (ПК «Галит», Крым)) [Shaish, Avron, Ben-Amotz, 1990].

Моновидовые культуры штаммов криптофитовых водорослей были получены из нативных проб воды (после изоляции и длительной последовательной очистки клеток путём чередования методов микропипетирования и разбавлений), отобранных в разных биотопах поверхностных прибрежных вод акватории Севастопольской бухты Чёрного моря (44°37'00" с. ш., 33°31'18" в. д., солёность 18 ‰). Чистые штаммы черноморских криптофитовых содержались

в коллекции культур морских водорослей (ССМА) ФИЦ ИнБЮМ при слабом естественном освещении. В работе использовали культуры в экспоненциальной фазе, выращенные в полунепрерывной неаксеничной культуре на среде Уолна, разбавляемой на 30 % каждые 3–4 дня [Algal Culturing ... , 2005].

**Фиксирование образцов.** В качестве фиксирующих растворов были выбраны раствор Люголя (как реактив, имеющий наименьшую стоимость) и глутаральдегид (как наиболее часто рекомендуемый в руководствах по пробоподготовке образцов для СЭМ, а также менее токсичный и более экономичный по стоимости по сравнению с тетраоксидом осмия). При подготовке образцов для сканирующего электронного микроскопа суспензию клеток микроводорослей (от 1 до 3 мл) фиксировали 15–60 мин, в темноте, при комнатной температуре, раствором Люголя из расчёта 3 капли на 1 мл пробы или 25%-ным раствором глутарового альдегида при 4 °С (конечная концентрация фиксатора в пробе составляла от 1 до 2,5 %) [Bistricki, Munawar, 1978; Pomroy, 1989; Cerino, Zingone, 2006]. При невозможности дальнейшей обработки образца сразу же после фиксирования материала возможно его хранение до двух недель [Bratbak, 1993] в соответствующих для фиксатора условиях (4 °С — для ГА; в темноте, при комнатной температуре — для раствора Люголя). Это так называемый первый этап накопления серии проб.

Перед подготовкой образцов для СЭМ пробы просматривали в световом микроскопе (Carl Zeiss Axiostar plus, Германия), снабжённом камерой (Cannon a 620, Япония), при увеличении от  $\times 200$  до  $\times 630$ .

**Подготовка образцов на фильтрах.** После фиксирования пробу осаждали при разрежении не более 0,2 атм в фильтровальной воронке (Sartorius производства Германии) или в шприце с насадкой на поликарбонатный фильтр с диаметром пор 3,0 мкм (производства ОИЯИ, г. Дубна, Россия), для более равномерного распределения клеток на фильтре его помещали на влажную подложку из фильтровальной бумаги, предварительно подписанную карандашом. Наличие смоченной подложки не позволяет фильтру с осевшими микроводорослями пересыхать, а маркировка остаётся при дальнейшей дегидратации образцов. При необходимости фильтр дважды промывали 1 или 2 мл раствора 0,01-молярного фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,2) или стерильной морской водой.

Сразу после фильтрации и промывки (при необходимости) образца фильтр с подложкой переносили в 16-луночный планшет или (в случае дегидратации с ацетоном) в стеклянные бюксы объёмом 50 мл. Смену растворов проводили с помощью пластиковой пипетки Пастера или дозатора. При «этанольной» дегидратации образцы выдерживали последовательно в растворах этанола восходящей концентрации. Режим экспозиции: в 20-, 30-, 50%-ных растворах — по 5 мин; в 75-, 96%-ных — по 10 мин; в 100%-ном — дважды по 10 мин. В случае «этанольно-ацетонового» обезвоживания режим был следующим: в 20-, 30-, 50%-ных растворах этанола выдерживали по 5 мин; в 75%-ном этаноле — 10 мин; в 96%-ном этаноле — дважды по 15 мин; в смеси 96%-ного этанола и 100%-ного ацетона (в соотношении 1 : 1) — 2 часа; в 100%-ном ацетоне — дважды по 15 мин [Анисимова, 2014]. При невозможности дальнейших этапов обработки в этот же день образцы (до двух недель) хранили в 75%-ном растворе этанола (так называемый второй этап накопления серии проб).

Два этапа накопления проб (хранение в фиксаторе или в 75%-ном этаноле до двух недель) может быть весьма полезным, например, в полевых условиях экспедиций [Bratbak, 1993].

**Приготовление препаратов на «лизиновых» стёклах.** На обезжиренные покровные стёкла размером (24 × 24 мм) наносили 2,4 мкл раствора поли-L-лизина в концентрации 1 мг мл<sup>-1</sup> (MC biomedical LCC) и распределяли по всей поверхности стекла с помощью препаровальной иглы. Стёкла размещали на нагревательном столике (около 50 °С) и давали им полностью высохнуть, процедуру нанесения пробы и сушки повторяли трижды. Подготовленные

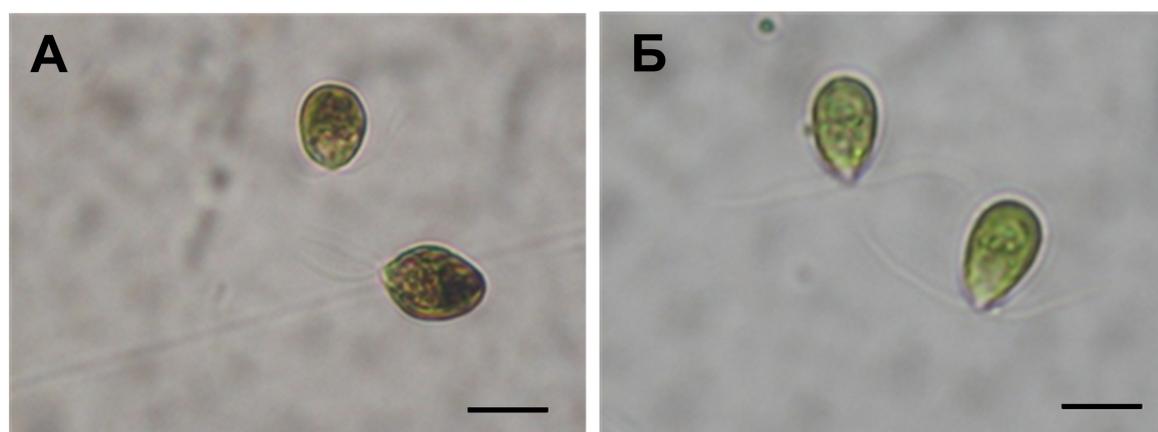
«лизиновые» стёкла хранили в конвертах из фольги, в холодильнике, в закупоренных склянках или вакуумных пакетах. Для приготовления препарата фиксированную (раствором Люголя или ГА) суспензию микроводорослей наносили небольшими отдельными каплями на «лизиновые» стёкла (важно учитывать, что материал «прилипает» к стеклу в момент прикосновения, а не после оседания в капле). После нанесения материала капле давали немного подсохнуть, чтобы жидкость не текла, но не пересушивали. Остатки жидкости оттягивали фильтровальной бумагой [Анисимова, 2014; Šťastný, Kouwets, 2012; Kaufnerova, Eliaš, 2013]. После этого стёкла сразу помещали на фильтровальную бумагу в 12-луночный пластиковый планшет, где проводили «этанольную» дегидратацию.

**Сушка «в критической точке» и напыление образцов.** Фильтры с образцами помещали в сушилку (Leica EM SPD300, Германия). В случае использования «лизиновых» стёкол их аккуратно устанавливали в специальную «расчёску». Время сушки составляло 2,5–3 часа. При напылении (Au/Pd; 0,5–1,0 мин) фрагмент фильтра или стекло приклеивали с помощью скотча на алюминиевый столик и помещали в прибор Leica EM ACE200 (Германия). Просматривали образцы с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU3500 (Япония) при увеличении от  $\times 500$  до  $\times 20000$ .

### Результаты и обсуждение

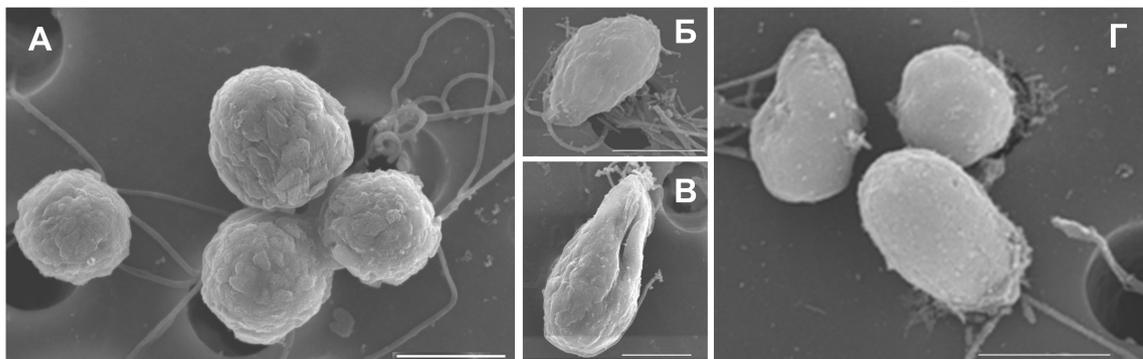
Для отработки методики выбор *D. salina* в качестве тест-объекта не был случайным. Отсутствие у микроводорослей жёсткой клеточной стенки позволило нам в деталях отработать основные этапы пробоподготовки: подбор фиксатора, его концентрацию, время обработки материала, а также способы концентрирования и обезвоживания клеток. Режимы сушки и напыления оставались всегда постоянными.

С учётом особенностей клеточных покровов *D. salina*, изначально была выбрана кратковременная (15 мин) обработка суспензии клеток раствором Люголя или глутаральдегидом. По данным световой микроскопии, при таком режиме фиксации *D. salina* теряла подвижность. Однако при использовании раствора Люголя значительная часть клеток округлялась (рисунок 1А), тогда как при фиксировании глутаральдегидом в к. к. 2,5 % клетки в основном сохраняли грушевидную форму (рисунок 1Б).



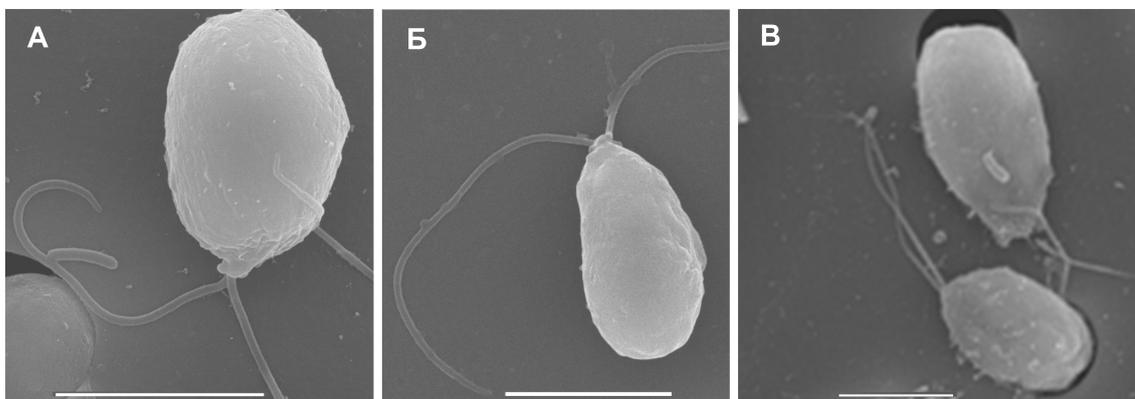
**Рис. 1.** Морфологические изменения клеток *D. salina* после 15-минутного фиксирования (по данным световой микроскопии): А — раствором Люголя, Б — глутаральдегидом в к. к. 2,5 %. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

Однако при просмотре препаратов в СЭМ, при 15-минутной фиксации как раствором Люголя, так глутаральдегидом в к. к. в пробе 2,5 %, наблюдались значительные изменения формы клеток (округление) (рисунок 2А) и деформация клеточной поверхности *D. salina* (рисунок 2Б, 2В), что, вероятно, было связано с последующими этапами пробоподготовки (дегидратация и сушка клеток).



**Рис. 2.** Электронные микрофотографии деформированных клеток *D. salina* после 15-минутного фиксирования: А — раствор Люголя; Б, В, Г — глутаровый альдегид, к. к. в пробе 2,5 %. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

При увеличении времени обработки как ГА, так и раствором Люголя до 60 мин наблюдали значительное снижение деформации поверхности клеток, особенно при обработке ГА.

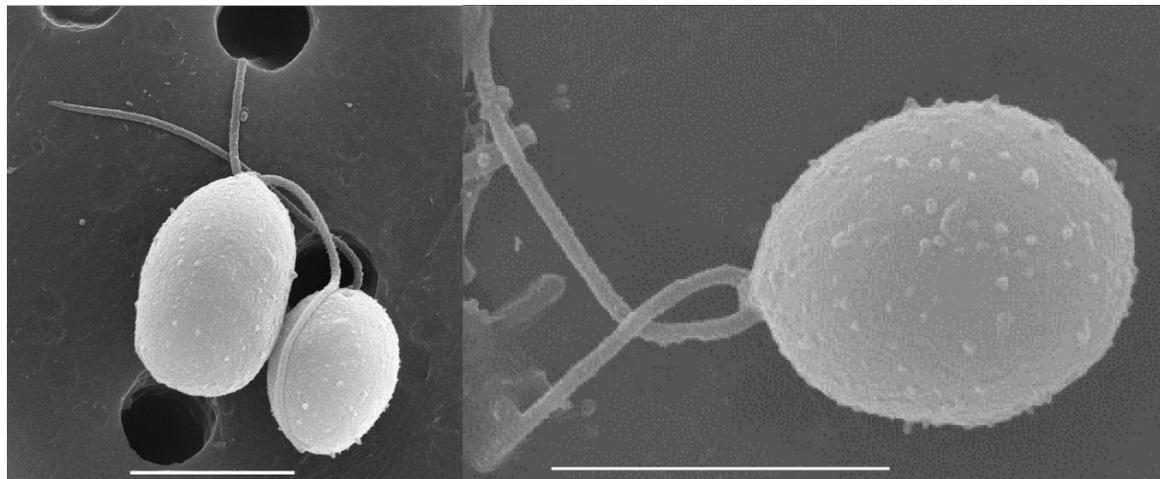


**Рис. 3.** Электронные микрофотографии клеток *D. salina* при увеличении времени фиксирования до 60 мин: А, Б — глутаральдегид, к. к. в пробе 2,5 %; В — раствор Люголя. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

Таким образом, «правило», известное при работе с большинством фиксаторов, используемых в электронной микроскопии (проникновение реагента в образец происходит со скоростью 1 мм ч<sup>-1</sup>) [Hayat, 1989], не работает в отношении *D. salina*. Несмотря на то что толщина клеток микроводорослей составляет несколько микрометров, нами показано, что кратковременное фиксирование материала (от 15 до 30 мин) было недостаточным и вызывало сильную деформацию клеточной поверхности при дальнейших этапах обработки (рисунок 2).

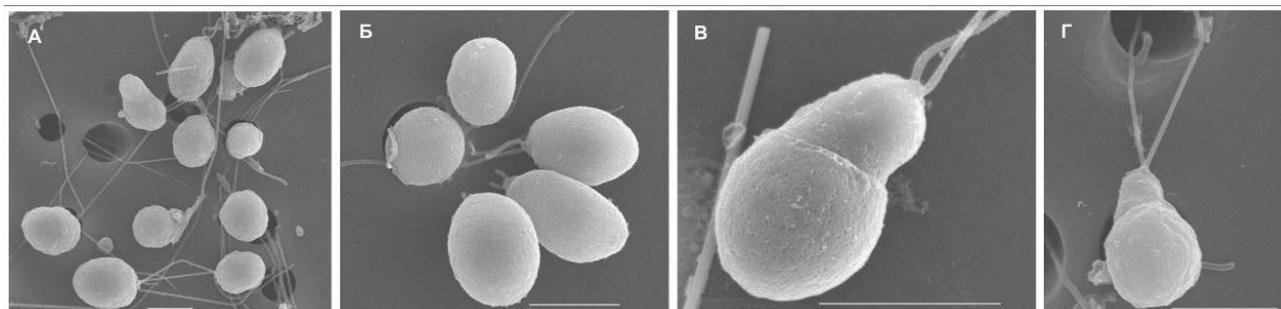
Подтверждено, что оптимальное время обработки материала фиксирующим реагентом составляет не менее 60 мин (с соблюдением температурных режимов: комнатной температуры для раствора Люголя, 4 °С для ГА), как и указывается в литературе [Bistricki, Munawar, 1978; Pomroy, 1989; Cerino, Zingone, 2006] (рисунок 3).

Однако не всегда рекомендуемая в руководствах конечная концентрация фиксаторов в пробе (для ГА — 2,5 %), а также способ фиксирования материала были идеальными для исследуемых нами водорослей. Оптимальным для *Dunaliella salina* оказалось снижение конечной концентрации ГА в пробе до 1 % (рисунок 4).



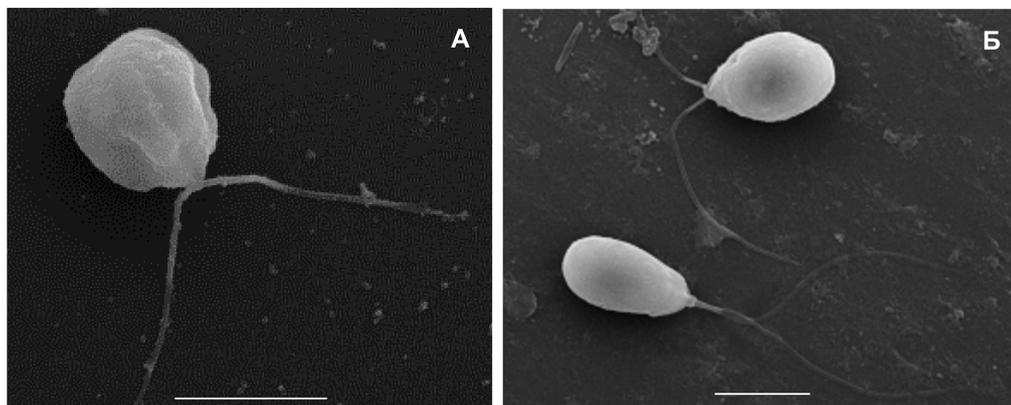
**Рис. 4.** Электронные микрофотографии, полученные после фиксирования клеток *D. salina* в течение 60 мин глутаровым альдегидом, к. к. в пробе 1 %. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

Ещё одним важным моментом оказался этап концентрирования организмов на поликарбонатные фильтры — с помощью шприца-насадки или в фильтровальной воронке. Оказалось, что при чрезмерном разрежении происходило неравномерное их распределение на фильтре (рисунок 5А), затягивание жгутиков в поры фильтра и максимальное концентрирование клеток вокруг пор (рисунок 5Б), кроме того, наблюдали физическую деформацию клеток (рисунок 5В, 5Г). Поэтому для таких «нежных» объектов, особенно снабжённых жгутиками, необходима максимально мягкая фильтрация (разрежение менее 0,2 атм) или даже кратковременное использование вакуума (в случае плотной культуры) и частичный слив излишков пробы. Кроме того, дальнейшую дегидратацию целесообразно проводить не в воронке, а в бюксе или пластиковом планшете (о чём подробно будет сказано далее).



**Рис. 5.** Клетки *Dunaliella salina* после фильтрации с разрежением более 0,2 атм (фиксация глутаральдегидом 60 мин, к. к. в пробе 1 %, «этанольная» дегидратация): А — неравномерное распределение на фильтре с концентрированием вокруг пор фильтра; Б — затягивание жгутиков в поры фильтра; В, Г — деформация клеток вследствие избыточного разрежения при фильтрации. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

При использовании для концентрирования микроводорослей стёкол, покрытых поли-L-лизинном, клетки легко визуализировались, имели необорванные жгутики, однако поверхность клеток выглядела несколько деформированной при использовании раствора Люголя (рисунок 6А), тогда как при фиксировании ГА в к. к. 1 % поверхность была сохранной (рисунок 6Б).



**Рис. 6.** Электронные микрофотографии *D. salina*, полученные на «лизиновых» стёклах (время фиксирования 60 мин, «этанольная» дегидратация): А — раствор Люголя; Б — глутаровый альдегид, к. к. в пробе 1 %. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

Таким образом, при фиксировании *Dunaliella salina* раствором глутаральдегида до конечной концентрации в пробе 2,5 % и особенно при обработке суспензии раствором Люголя при любых способах концентрирования (фильтрация или использование поли-L-лизина) наблюдалась деформация клеточной поверхности. Снижение конечной концентрации ГА в пробе до 1 % оказалось наиболее оптимальным.

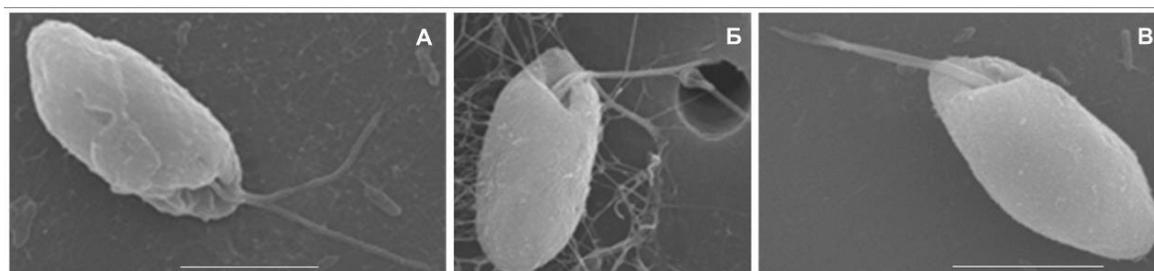
Также нами детально был проработан вопрос о способах дегидратации образцов. Оказалось, что достаточно успешным было использование как этанольной проводки в растворах восходящей концентрации, так и их смешанного, «этанольно-ацетонового», обезвоживания. Во втором случае, когда дегидратация заканчивается этанольно-ацетоновой смесью и 100%-ным ацетоном, весь процесс занимает больше времени и проводить его желательно в вытяжном шкафу, используя только стеклянные бюксы. Пипетками Пастера или дозаторами проводится смена растворов.

Полученный протокол (фиксирование в течение 60 мин раствором ГА в к. к. 1 %, разрежение в процессе фильтрации менее 0,2 атм или использование «лизиновых» стёкол) на втором этапе исследований был апробирован на морских криптофитовых одноклеточных водорослях (Cryptophyta) Чёрного моря размером от 7 до 20 мкм.

Рядом исследователей показано, что эти организмы играют важную роль в трансформации неорганического и органического вещества, а также вносят значительный вклад в формирование первичной продукции в водоёмах. Морфологические особенности криптофитовых значительно варьируют в зависимости от комплекса условий в разных местах обитания. Из-за хрупкости клеточных структур при фиксации проб фитопланктона часто происходит разрушение клеток, в результате чего численность и видовое разнообразие криптофитовых недоучитывается. Представители этой группы обладают очень специфическими, характерными покровами, представленными специфическим перипластом, который состоит из плазмалеммы и двух слоёв белкового материала. Под плазмалеммой располагаются четырёх- или шестигранные чешуйки, связанные с интегральными белками плазмалеммы. Именно образуемый чешуйками рельеф на поверхности стенки хорошо виден с помощью СЭМ. Для криптофитовых характерно присутствие на поверхности выстреливающих клеток: крупные эжектосомы располагаются вдоль глоточной выемки,

а мелкие разбросаны по всей поверхности клетки. Каждая эжектосома в интакном состоянии окружена мембраной и содержит две скрученные в цилиндры ленты, которые при выстреливании разворачиваются в длину, а затем сворачиваются продольно, образуя длинные трубки [Clay, Kugrens, Lee, 1999; Cerino, Zingone, 2006; Khanaychenko et al., 2022].

Оказалось, что использование в качестве фиксирующего реагента ГА в конечной концентрации от 1 до 2,5 % было менее успешным для этой группы организмов (рисунок 7А). Лучшая сохранность поверхности клеток наблюдалась в случае использования раствора Люголя при ступенчатой фиксации с разницей от двух до четырёх часов. Причём данная тенденция сохранялась как при осаждении клеток на фильтр, так и в случае использования поли-L-лизина (рисунок 7Б, 7В).



**Рис. 7.** Электронные микрофотографии Cryptophyta (Чёрное море), (время фиксации 60 мин, «этанольная» дегидратация): А — фиксирование ГА, к. к. в пробе 1 %; Б — ступенчатая фиксация раствором Люголя, осаждение на фильтр; В — ступенчатая фиксация раствором Люголя, осаждение на стекло, покрытое поли-L-лизином. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

Использование подобной предмикроскопной подготовки позволило выявить особенности морфологии и поверхностной структуры клеток криптофитовых водорослей: форма асимметричной клетки, длина и локализация субэквалентных жгутиков, расположение и строение вестибулума, строение поверхности перипласта, пор, образованных эжектосомами. Эти результаты указывают на высокую информативность СЭМ для идентификации видов со структурированной клеточной стенкой [Bistricki, Munawar, 1978; Cerino, Zingone, 2006; Khanaychenko et al., 2022].

Таким образом, нами подтверждено, что разнообразные методы подготовки проб для СЭМ, описанные к настоящему моменту в литературе [Морозова, 2013; Nayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019], имеют свои ограничения и преимущества, поэтому неудивительно, что каждому исследователю приходится подбирать индивидуальный протокол в зависимости от вида исследуемого образца.

Для монадных форм микроводорослей при концентрировании материала нами подтверждена успешность фильтрации через трековые мембраны при условии строгого соблюдения режима разрежения (не более 0,2 атм). В случае использования шприца с насадкой необходимо помнить, что фильтрация должна быть очень «нежной», практически капельной. Кроме того, перед смесью растворов (промывочных и/или спиртов восходящей концентрации) необходимо каждый раз перед извлечением поршня из шприца откручивать насадку (в противном случае произойдёт разрыв фильтра с осевшими организмами), затем опять прикручивать насадку с фильтром, наливать раствор и вставлять поршень. Все манипуляции необходимо делать быстро, чтобы не допустить пересыхания образца. Последующую промывку (при необходимости) и дегидратацию образца для монадных форм микроводорослей целесообразнее проводить не в воронке или шприце, а в планшете или бюксе. В таком случае можно избежать травмирующего эффекта фильтрации, а возможный смыв клеток в этом случае не столь критичен, если речь идёт о плотных культурах. Для культур микроводорослей с более прочной клеточной стенкой, а также не столь

«плотных» природных проб концентрирование, промывку и дегидратацию целесообразно осуществлять непосредственно в воронке или шприце во избежание потери организмов.

К неплохому результату приводит использование стёкол, покрытых поли-L-лизинном [Анисимова, 2014; Šťastný, Kouwets, 2012; Kaufnerova, Eliaš, 2013]. Благодаря его адгезивной способности происходит «приклеивание» клеток к поверхности стекла. Данный способ, несомненно, является весьма перспективным при сгущении клеток культур микроводорослей, снабжённых жгутиками, так как позволяет не использовать вакуум в процессе фильтрации или избежать травматического эффекта, наблюдаемого при центрифугировании. Однако многое зависит от плотности культуры, правильности нанесения поли-L-лизина на стекло, правильности хранения готовых стёкол и рабочих растворов, а также последующего аккуратного нанесения образца и деликатности проведения последующих этапов пробоподготовки.

Мы не получили значительной разницы при «этанольной» или «этанольно-ацетоновой» дегидратации, однако первый способ занимает меньше времени и не требует работы в вытяжном шкафу (как в случае окончания обезвоживания 100%-ным ацетоном). Кроме того, во втором случае мы наблюдали сворачивание некоторых типов фильтров (например, Poretics, США), тогда как трековые мембраны производства Объединенного института ядерных исследований (г. Дубна, Россия) не деформировались (к тому же они намного дешевле импортных аналогов).

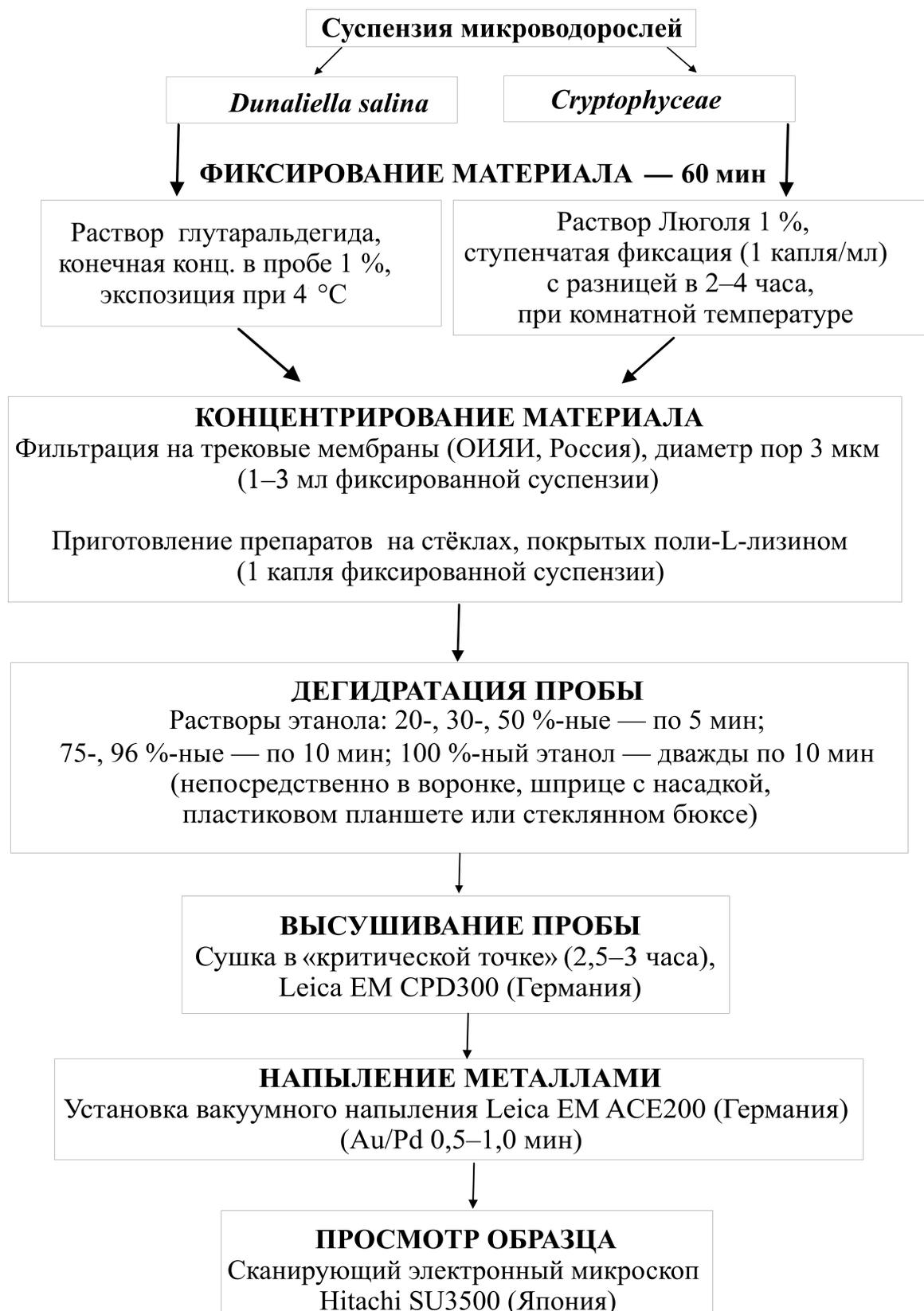
Необходимо отметить, что при невозможности осуществления всех этапов пробоподготовки в один день возможно хранение образцов до двух недель в растворе фиксатора или в 75%-ном растворе этанола (в процессе дегидратации). Это позволяет накопить пробы, чтобы одновременно просушивать и напылять серию образцов.

Сушка «в критической точке» в наиболее мягком режиме (от 2,5 до 3 часов) и напыление (от 1,5 до 2 мин) соответствовали режимам, обычно рекомендуемым в современных руководствах и публикациях [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019].

Предложенный протокол предмикроскопной пробоподготовки монадных форм микроводорослей для исследований с помощью сканирующего электронного микроскопа представлен на рисунке 8. Он может быть полезен для изучения поверхностных структур и детализации морфологических характеристик одноклеточных водорослей, не имеющих жёсткой клеточной стенки, и успешно применён при таксономических и биотехнологических исследованиях.

## Выводы

Предложено при фиксации микроводорослей, не имеющих жёстких клеточных стенок и снабжённых жгутиками, снижать концентрацию глутаральдегида до 1 % (для *D. salina*) или использовать ступенчатую фиксацию раствором Люголя (для криптофитовых водорослей). При концентрировании монадных форм целесообразна максимально мягкая фильтрация (разрежение менее 0,2 атм), промывку пробы необходимо выполнять только при необходимости, также возможно использование стёкол, покрытых поли-L-лизинном. Дальнейшую дегидратацию необходимо проводить в бюксе или пластиковом планшете, а не в фильтровальной воронке. Показано, что не существует значительной разницы между «этанольной» и «этанольно-ацетоновой» дегидратацией, однако первый способ занимает меньше времени и не требует работы в вытяжном шкафу. Сушка «в критической точке» и напыление соответствовали режимам, обычно рекомендуемым в современных руководствах. При невозможности осуществления всех этапов пробоподготовки в один день или в экспедиционных условиях возможно хранение образцов до двух недель в растворе фиксатора или в 75%-ном растворе этанола (в процессе дегидратации). Предложенный протокол предмикроскопной пробоподготовки монадных форм микроводорослей для исследования с помощью СЭМ может быть полезен при изучении их поверхностных структур, а также детализации морфологических характеристик и успешно применён при таксономических и биотехнологических исследованиях.



**Рис. 8.** Оптимизированная схема предмикроскопной пробоподготовки монадных форм микроводорослей для исследования с помощью сканирующего электронного микроскопа

### Список литературы

1. Анисимова О. В. Методы подготовки десмидиевых водорослей (Desmidiaceae, Charophyta) для изучения в сканирующий электронный микроскоп // Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге : Материалы III междунар. науч. конф., 24–29 авг. 2014 г., Борок / Рос. акад. наук, Ин-т биологии внутр. вод им. И. Д. Папанина. – Ярославль : Филигрань, 2014. – С. 8–10.
2. Морозова К. Н. Электронная микроскопия в цитологических исследованиях : метод. пособие. – Новосибирск : Изд-во Новосиб. гос. ун-та, 2013. – 85 с.
3. Algal Culturing Techniques / ed. by R. A. Andersen. – Boston : Elsevier [et al.], 2005. – 578 p.
4. Bistricki T., Munawar M. A rapid preparation method for scanning electron microscopy of Lugol preserved algae // Journal of Microscopy. – 1978. – Vol. 114, iss. 2. – P. 215–218. – <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1978.tb00131.x>
5. Bratbak G. Microscope methods for measuring bacterial biovolume: epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy // Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology / ed. by P. F. Kemp [et al.]. – Boca Raton [et al.] : Lewis Publ., 1993. – P. 309–316. – <https://doi.org/10.1201/9780203752746-37>
6. Cerino F., Zingone A. A survey of cryptomonad diversity and seasonality at a coastal Mediterranean site // European Journal of Phycology. – 2006. – Vol. 41, iss. 4. – P. 363–378. – <https://doi.org/10.1080/09670260600839450>
7. Clay B. L., Kugrens P., Lee R. E. A revised classification of Cryptophyta // Botanical Journal of the Linnean Society. – 1999. – Vol. 131, iss. 2. – P. 131–151. – <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1999.tb01845.x>
8. Dolgin A., Adolf J. Scanning electron microscopy of phytoplankton: achieving high quality images through the use of safer alternative chemical fixatives // Journal of Young Investigators. – URL: <https://www.jyi.org/2019-july/2019/7/1/scanning-electron-microscopy-of-phytoplankton-achieving-high-quality-images-through-the-use-of-safer-alternative-chemical-fixatives>. – Publ. date: July 1, 2019.
9. Hayat M. A. Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications. – 3rd ed. – [Boca Raton, Florida] : CRC Press, 1989. – 469 p.
10. Kaufnerova V., Eliaš M. The demise of the genus Scotiellopsis Vinatzer (Chlorophyta) // Nova Hedwigia. – 2013. – Bd. 97, h. 3/4. – P. 415–428. – <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2013/0116>
11. Khanaychenko A. N., Popova O. V., Rylkova O. A., Aleoshin V. V., Aganesova L. O., Saburova M. *Rhodomonas storeatuloformis* sp. nov. (Cryptophyceae, Pyrenomonadaceae), a new cryptomonad from the Black Sea: morphology versus molecular phylogeny // Fottea. – 2022. – Vol. 22, iss. 1. – P. 122–136. – <https://doi.org/10.5507/fot.2021.019>
12. Murtey M. D., Ramasamy P. Sample preparations for scanning electron microscopy – life sciences // Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences / ed. by M. Janecek, R. Kral. – Croatia : InTeck, 2016. – Chap. 8. – P. 161–185.
13. Pomroy A. J. Scanning electron microscopy of *Heterocapsa minima* sp. nov. (Dinophyceae) and its seasonal distribution in the Celtic Sea // British Phycological Journal. – 1989. – Vol. 24, iss. 2. – P. 131–135. – <https://doi.org/10.1080/00071618900650121>
14. Shaish A., Avron M., Ben-Amotz A. Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella bardawil* // Plant and Cell Physiology. – 1990. – Vol. 31, iss. 5. – P. 689–696. – <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077964>
15. Šťastný J., Kouwets F. A. C. New and remarkable desmids (Zygnematophyceae, Streptophyta) from Europe: taxonomical notes based on LM and SEM observations // Fottea. – 2012. – Vol. 12, iss. 2. – P. 293–313. – <https://doi.org/10.5507/fot.2012.021>

## PECULIARITIES OF SAMPLE PREPARATION OF SAMPLES OF MONADIC FORMS OF MICROALGAE FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Rylkova O. A., Borovkov A. B., Khanaychenko A. N., Kharchuk I. A.,  
Gudvilovich I. N., Lishaev V. N.

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation,  
e-mail: [ol.rylkova@yandex.ru](mailto:ol.rylkova@yandex.ru)

**Abstract:** In order to optimize sample preparation of monadic forms of microalgae for scanning electron microscopy (SEM), domestic and foreign guidelines were analyzed. The green microalga *Dunaliella salina* Teodoresco (strain IBSS-2 from the Collection of Hydrobionts of the World Ocean, FIC IBSS) was used to develop the technique, and the protocol was tested on the Black Sea (from Collection of the Black Sea cryptophytes, BS-Cry, IBSS). It was shown that it is reasonable to reduce the final concentration (f. c.) of glutaric aldehyde (glutaraldehyde, GA) in the sample to 1 % (for *D. salina*) or to use stepwise fixation with Lugol's solution (for cryptophytic algae) when fixing the material. When concentrating microalgae equipped with flagella, the mildest possible filtration is necessary (vacuum less than 0.2 atm); the sample should be washed only if necessary; further dehydration should be carried out in a bucket or plastic plate. The use of glasses coated with poly-L-lysine led to good results. It has been shown that there is no particular difference between «ethanol» and «ethanol-acetone» dehydration, but that the former method takes less time and does not require operation in a fume cupboard. The «critical point» drying (2.5–3 h) and sputtering (Au/Pd, 0.5–1.0 min), followed the regimes usually recommended in modern manuals. If it is impossible to carry out all stages of sample preparation in one day or in expeditionary conditions, it is possible to store samples for up to two weeks in fixative solution or in 75 % ethanol solution (in the process of dehydration). The proposed protocol for pre-microscopic sample preparation for SEM studies can be useful for studying surface structures and detailing morphological characteristics of unicellular algae equipped with flagella and has been successfully applied in taxonomic and biotechnological studies.

**Keywords:** microalgae, monadic forms, scanning electron microscopy, sample preparation.

### Сведения об авторах

Рылькова Ольга Александровна	кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, <a href="mailto:ol.rylkova@yandex.ru">ol.rylkova@yandex.ru</a>
Боровков Андрей Борисович	кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель отдела биотехнологии и фиторесурсов, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, <a href="mailto:spirit2000sev@yandex.ru">spirit2000sev@yandex.ru</a>
Ханайченко Антонина Николаевна	кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, <a href="mailto:a.khanaychenko@gmail.com">a.khanaychenko@gmail.com</a>
Харчук Ирина Алексеевна	кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, <a href="mailto:seaferm@yandex.ru">seaferm@yandex.ru</a>
Гудвиллович Ирина Николаевна	кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, <a href="mailto:gudirina2008@yandex.ru">gudirina2008@yandex.ru</a>
Лишаев Вячеслав Николаевич	руководитель лаборатории микроскопии, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, <a href="mailto:me garafik@gmail.com">me garafik@gmail.com</a>

Поступила в редакцию 28.12.2023 г.  
Принята к публикации 01.02.2024 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр  
«ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ имени А.О. КОВАЛЕВСКОГО РАН»

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Федеральный исследовательский центр  
«СУБТРОПИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

## **БИОРАЗНООБРАЗИЕ И УСТОЙЧИВОЕ РАЗВИТИЕ**

Основан в мае 2016 г.

Основатель журнала –  
ФГБУН «Карадагская научная станция им. Т.И.Вяземского –  
природный заповедник РАН»

Научное издание

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи,  
информационных технологий и массовых коммуникаций

**Свидетельство о регистрации средства массовой информации  
Сер. ПИ № ФС77-76870 от 11 октября 2019 г.**

Рекомендовано к печати решением учёного совета Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Федерального исследовательского центра  
«Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»  
(протокол № 3 от 23.04.2024 г.).

Главный редактор: доктор геогр. наук Горбунов Р. В.  
Заместитель главного редактора: доктор биол. наук Довгаль И. В.  
Ответственный секретарь: Жукова Ю. В.  
Корректор: Уткина Е. Г.  
Компьютерная вёрстка: Майборода Д. И.  
Макет обложки: Келип М.-Е. А.

Фото на обложке: Клетки *Dunaliella salina* после фильтрации с разрежением более 0,2 атм  
(фиксация глутаральдегидом 60 мин, к. к. в пробе 1 %, «этанольная» дегидратация): затягивание  
жгутиков в поры фильтра.

Подписано к печати: 07.05.2024 г.

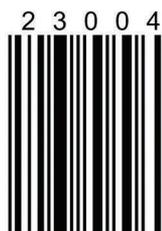
Дата выхода: 16.05.2024 г.

Формат 60x84/8 Усл. печ. л. 10,9 Тираж: 100 экз.

Отпечатано в типографии: ИП Ермолов М. П., ОГРНИП 314920436710081 от 26.12.2014;  
ул. Кулакова, д. 59, г. Севастополь, 299011;  
тел.: +7 978 70-45-111; e-mail: [print-e@yandex.ru](mailto:print-e@yandex.ru)

Распространяется бесплатно

ISSN 2949-4583



>