

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 78 • № 1 • 2023 • ЯНВАРЬ — МАРТ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные исследования

- Васильев А.Н., Крючкова А.Г., Маковская А.Е. Повышенная чувствительность пространственных фильтров при совмещении магнитного и электрического компонентов сенсомоторного кортикального бета-ритма 3
- Воробьева Н.В. Участие нерцепторных тирозинкиназ Src-семейства в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек 11
- Егорова Д.О., Санников П.Ю., Хотяновская Ю.В., Бузмаков С.А. Состав бактериальных сообществ нефтезагрязненных донных отложений реки Каменка 17
- Коваленко М.И., Георгиева М.Л., Козловский В.В., Максимова И.А., Качалкин А.В., Бубнова Е.Н. Микобиота красной водоросли *Palmaria palmata* в Кандалакшском заливе Белого моря 25
- Столяров А.П. Особенности видовой, пространственной и трофической структуры макробентоса в лагунной экосистеме Никольской губы (Кандалакшский залив, Белое море). 35

Краткие сообщения

- Осмоловский А.А., Домбек И., Хауке С., Орехова А.В., Крейер В.Г. Сравнение антикоагулянтного действия *in vitro* протеаз, секретируемых микромицетом *Aspergillus ochraceus* и содержащихся в яде змей 43

© Издательство Московского университета,
“Вестник Московского университета”, 2023

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 78 • No. 1 • 2023 • JANUARY – MARCH

Quarterly

Moscow University Press

CONTENTS

Research articles

Vasilyev A.N., Kryuchkova A.G., Makovskaya A.E. Increased sensitivity of spatial filters by combining the magnetic and electrical components of the sensorimotor cortical beta rhythm. 3

Vorobjeva N.V. Participation of non-receptor Src family tyrosine kinases in the formation of neutrophil extracellular traps. 11

Egorova D.O., Sannikov P.Y., Khotyanovskaya Y.V., Buzmakov S.A. Composition of bacterial communities in oil-contaminated bottom sediments of the Kamenka River. 17

Kovalenko M.I., Georgieva M.L., Kozlovsky V.V., Maximova I.A., Kachalkin A.V., Bubnova E.N. Mycobiota of the red algae *Palmaria palmata* in the Kandalaksha Bay of the White Sea 25

Stolyarov A.P. Features of the species, spatial and trophic structure of macrobenthos in the lagoon ecosystem of the Nikolskaya Bay (Kandalaksha Bay, White Sea) 35

Short communications

Osmolovskiy A.A., Dombeck I., Hauke S., Orekhova A.V., Kreyer V.G. Comparison of the *in vitro* anticoagulant action of proteases secreted by the micromycete *Aspergillus ochraceus* and contained in snake venom. 43

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 612.821.6+612.821.2+612.825.5

Повышенная чувствительность пространственных фильтров при совмещении магнитного и электрического компонентов сенсомоторного кортикального бета-ритма**А.Н. Васильев^{1, 2, *} , А.Г. Крючкова², А.Е. Маковская¹**¹*Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Научно-образовательный центр нейрокогнитивных исследований (МЭГ-центр), Московский государственный психолого-педагогический университет, Россия, 123290, г. Москва, Шелепихинская набережная, д. 2а, стр. 2***e-mail: a.vasilyev@anymail.com*

Модуляция магнитного или электрического сенсомоторных ритмов человека при представлении движений широко используется в фундаментальных и прикладных нейрофизиологических исследованиях. К настоящему времени имеются доказательства лучшей чувствительности сенсоров магнитного поля к модуляции бета-ритма, однако потенциальный синергический эффект от объединения двух модальностей еще не был исследован. В этом исследовании одновременная регистрация электроэнцефалограммы (ЭЭГ) и магнитоэнцефалограммы (МЭГ) проведена у восьми здоровых испытуемых-добровольцев при выполнении ими произвольных и воображаемых движений, а также при электрической стимуляции медианного нерва. У всех испытуемых удалось идентифицировать десинхронизацию (подавление) мю- и бета-ритмов при выполнении сенсомоторных заданий, а также бета-синхронизацию после окончания движения или стимуляции. С использованием общих проекций ковариационных матриц сигналов электрической, магнитной и объединенной («МЭЭГ») модальностей были вычислены наиболее чувствительные индивидуальные пространственные фильтры отдельно для каждого из типов реакций. По сравнению с предстимульным контролем выраженность изменений амплитуды компонентов сенсомоторного ритма оказалась наибольшей в объединенной МЭЭГ-модальности. При этом для мю-десинхронизации МЭЭГ оказалась значимо лучше МЭГ, а для бета-десинхронизации МЭЭГ оказалась существенно лучше как МЭГ, так и ЭЭГ. Для бета-синхронизации показано смещение положения источников во фронтотемпоральном направлении, а значимых различий в амплитуде между модальностями не было. Также было показано, что для бета-десинхронизации у большинства испытуемых выделялись МЭГ-источники с одинаковыми ЭЭГ-проекциями или без выраженных ЭЭГ-проекций, что свидетельствует о наличии нескольких малых тангенциально расположенных кортикальных диполей, участвующих в десинхронизации бета-ритма. Полученные результаты позволяют полагать, что в исследованиях модуляции компонентов сенсомоторного ритма, в особенности бета-десинхронизации, совмещение МЭГ и ЭЭГ приводит к повышению чувствительности метода. Мультифокальность магнитного бета-ритма и его различная выраженность в ЭЭГ-источниках указывают на наличие независимых регуляторных контуров корково-таламического или внутрикортикального происхождения.

Ключевые слова: сенсомоторный ритм, бета-ритм, десинхронизация, бета-отскок, МЭГ/ЭЭГ-корегистрация, пространственный фильтр, представление движений

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-1-1

Анализ динамической регуляции ритмической активности головного мозга является востребованным инструментом исследования сенсомоторных функций. Связанная с событиями синхронизация (увеличение мощности) и десинхронизация (уменьшение) ритмических колебаний, регистрируемых вблизи центральной борозды коры головного мозга на электроэнцефалограмме

(ЭЭГ) и магнитоэнцефалограмме (МЭГ) широко используется в оценке соматосенсорной реактивности как в задачах с сенсорной стимуляцией, так и в исследованиях произвольных движений и сложных перцептивно-моторных состояний: представления движений, телесных иллюзий, имитационного поведения [1]. Несмотря на то, что большинство исследователей сходится в об-

ших вопросах происхождения и функциональной значимости альфа-/мю-компонента (~10 Гц) как ритма холостого хода («idling»), активная дискуссия ведется относительно функциональной роли и происхождения сенсомоторных бета-волн (~20 Гц) [2]. В частности, возникающая в процессе возбуждения или растормаживания сенсомоторной коры одновременно мю- и бета-десинхронизация [3] часто сменяется повышенной бета-синхронизацией, получившей название «бета-отскок» («beta-rebound»), понимаемой часто как гиперкомпенсация ранее подавленного бета-ритма. Однако с распространением более точных способов оценки спектральной мощности и энцефалографии высокой плотности сенсоров исследователи стали замечать, что «отскок» происходит на более низких частотах [4, 5] и в прецентральных областях коры [6, 7], а также имеет иную фармакологическую чувствительность [8, 9], что указывает на обособленную природу синхронизирующегося после события бета-ритма. Таким образом, возникла альтернативная гипотеза о наличии двух источников бета-ритмики: фронтального с антикинетической функцией активного торможения и постцентрального с растормаживающей функцией, связанной с вниманием и антиципаторным поведением [10]. Регистрация различных компонентов сенсомоторного ритма используется не только в фундаментальных исследованиях, но и в ряде практических направлений, таких как клиническая диагностика, нейрокогнитивные тренажеры и интерфейсы мозг-компьютер [11, 12], для которых существенным фактором является точная количественная оценка величин реакций модуляции ЭЭГ-ритмов.

На данный момент существует огромный объем фундаментальных и прикладных исследований магнитного и электрического компонента сенсомоторного ритма, однако встречаются лишь единичные работы, в которых для этого применяют одновременную совместную регистрацию МЭГ и ЭЭГ [13]. Помимо относительного небольшого числа МЭГ-установок, значимым фактором отсутствия подобного рода исследований является распространенное представление о преимуществе МЭГ в точности локализации и чувствительности к мелким поверхностным тангенциально ориентированным диполям, представляющим большой интерес для нейрофизиологических, клинических исследований и нейровизуализации [14]. Действительно, в работах, напрямую сравнивающих сенсомоторные ритмы МЭГ и ЭЭГ [13], демонстрируется большая чувствительность магнитных градиометров для оценки величин десинхронизации и синхронизации. Тем не менее, попыток объединения информации двух модальностей для количественной оценки сенсомоторных ритмов на данный момент не предпринималось.

В отличие от классического подхода к моделированию корковых источников при регистрации МЭГ и ЭЭГ путем объединения физических моделей распространения электрических и магнитных полей [15], в настоящее время набирает популярность сигнал-ориентированный подход [16, 17], позволяющий вычислять оптимальные пространственные проекции для ожидаемой динамики сигнала на основе полученных в исследовании многомерных данных. Такие подходы позволяют в полной мере использовать преимущества больших размерностей данных без снижения статистической мощности, невосприимчивы к шуму и артефактам отдельных сенсоров/модальностей и позволяют получать физиологически интерпретируемые результаты, что отличает их от схожих по назначению подходов, опирающихся на нейросетевые архитектуры. Однако на данный момент нет достаточного количества примеров их применения на сигналах разной физической природы.

Таким образом, основными задачами нашего исследования были выявление возможности корректного вычисления интерпретируемых пространственных фильтров для оценки модуляции сенсомоторного ритма магнитоэлектроэнцефалограммы (МЭЭГ) и проверка наличия преимуществ использования комбинированной модальности по сравнению с 306-канальной МЭГ и 64-канальной ЭЭГ.

Методика

Испытуемые и регламент исследования.

В эксперименте приняли участие восемь здоровых испытуемых-добровольцев (средний возраст — 24 года, 4 женщины). Семеро испытуемых были правшами и один — левша. Все испытуемые дали свое информированное согласие на участие в исследовании. Процедуры исследования были одобрены этическим комитетом Московского государственного психолого-педагогического университета.

В исследовании применялись три способа модуляции сенсомоторных ритмов: (1) стимуляция медианного нерва с пороговой для мышечного сокращения силой тока (стимулятор постоянного тока Digitimer DS7A (Digitimer Ltd., Великобритания), прямоугольные импульсы, длительность — 200 мкс, максимальная амплитуда — 250 В, сила тока — 3,5–4,5 мА, межстимульный интервал — 2 с); (2) произвольные однократные движения большого пальца правой руки в ответ на зрительный стимул; (3) мысленное кинестетическое представление таких же движений (интервал между попытками — 5 с). В качестве контрольного состояния использовалась задача на зрительный счет элементов абстрактной картинки. Количество проб для каждого испытуемого составляло: 50 — для токовых стимулов и 40 — для представления или выполнения дви-

жений. Испытуемые были заранее обучены технике представления движений и принимали участие в аналогичных исследованиях [18].

Сбор данных. Энцефалограмма регистрировалась одновременно при помощи 306-канального магнитноэнцефалографа Neuromag Vector View (Elekta Oy, Финляндия) и электроэнцефалографа NVX-136 (ООО «МКС», Россия) с немагнитным шлемом с 64 пассивными Ag/AgCl-электродами, расположенными по международной системе «10-10». Регистрация проводилась в магнитоэкранированной камере «Ak3B» (Vacuumschmelze GmbH, Германия) в положении сидя. Дополнительно регистрировалась электроокулограмма (используемая для синхронизации сигналов МЭГ- и ЭЭГ-усилителей), электрокардиограмма, миограмма с брюшка короткой мышцы, отводящей большой палец правой кисти (*m. abductor pollicis brevis*). Дополнительно при помощи специальных катушек во время записей регистрировалось положение головы испытуемого в МЭГ-шлеме. Кожно-электродный импеданс для всех электродов энцефалограммы не превышал 15 кОм. Все сигналы оцифровывались с частотой 1000 Гц.

Анализ данных. Предварительная обработка МЭГ-сигнала проводилась в программе Maxfilter v.2.2.10 (Elekta Oy, Финляндия) по стандартному для данного оборудования алгоритму, включающему пространственно-временную фильтрацию «tSSS» (временная константа 10 с и предельная корреляция 0,8), компенсацию микродвижений головы в шлеме и приведение сигнала стандартному положению головы по осям ОХ и ОУ [19]. Дальнейший анализ проводился в программе MATLAB 2022b (Mathworks, США) с использованием авторских скриптов и пакетов FieldTrip и EEGLAB [20] для загрузки и визуализации данных.

Перед дальнейшей обработкой сигналы всех модальностей синхронизировались во времени и подвергались фильтрации фильтром низких частот по частоте среза 90 Гц и скользящему медианному фильтру с ядром 3 с для устранения временного дрейфа и других медленных колебаний сигналов.

Для устранения различий в единицах измерений различных сенсоров (ЭЭГ — мкВ, магнитометры — фТ, планарные градиометры — фТ/см) все сигналы каждого типа сенсоров стандартизовались: делились на значение их общей (по всем каналам) дисперсии, робастно оцениваемой с помощью медианного абсолютного отклонения [16]. Для эффективного использования данных высокой размерности вычислялись пространственные фильтры, оптимизируемые индивидуально для каждого испытуемого и отдельно для каждой из частотно-временных реакций (десинхронизация в альфа- (8–14 Гц) и бета- (14–30 Гц) диапазонах и синхронизация в бета-диапазоне). Пространственные фильтры вычислялись как общие соб-

ственные векторы (W^T) ковариационных матриц сигналов в экспериментальном (предполагающем наличие интересующей реакции) и контрольном (зрительный счет) условиях:

$$\Lambda = \operatorname{argmax} \left\{ \frac{W^T \cdot C_{exp} \cdot W}{W^T \cdot C_{ctrl} \cdot W} \right\},$$

где W^T — матрица собственных векторов (фильтров), Λ — собственные числа, а C_{exp} и C_{ctrl} — ковариационные матрицы в экспериментальном и контрольном условиях соответственно.

Векторы w^T с наименьшими собственными числами соответствуют пространственным проекциям с наименьшим соотношением дисперсий в двух условиях

$$\frac{C_{exp}}{C_{ctrl}},$$

что при неравенстве $[C_{exp} < C_{ctrl}]$ означает десинхронизацию сигналов энцефалограммы в экспериментальном условии. Векторы с наибольшими собственными числами при $[C_{exp} > C_{ctrl}]$ — синхронизацию сигналов энцефалограммы. Алгоритм вычисления собственных векторов предполагает сортировку столбцов W^T (векторов w^T) в соответствии с величиной собственных чисел. Среди всех полученных фильтров w^T отбирался один с наименьшим (для десинхронизации) или наибольшим (для синхронизации) собственным числом, для которого соответствующий пространственный паттерн (вычисляемый по формуле $A = W^{-T}$ [21]) приходился на проекционные зоны контралатеральной сенсомоторной коры — лобные, центральные и теменные сенсоры [18, 22] — и имел пространственное ограниченную дипольную структуру. На практике это означало, что отбирались компоненты, соответствующие одному из трех крайних вектор-столбцов матрицы W^T . В случае наличия нескольких выраженных контралатеральных компонентов, предпочтение отдавалось компоненту с более экстремальным собственным числом. Дополнительным критерием отбора фильтров для ЭЭГ и МЭГ было соответствие пространственных проекций в этих модальностях для МЭЭГ-сигнала, что позволяло более корректное их прямое сравнение.

Фильтры вычислялись трижды: для ЭЭГ, МЭГ и комбинированных данных МЭГ + ЭЭГ. Для МЭГ перед вычислением собственных векторов проводилось понижение размерности сигнала с помощью метода главных компонент (до 70–80 компонентов), поскольку после процедуры «tSSS» ранг данных понижался.

Отобранные фильтры применялись к сырому сигналу, после чего проводилась оценка амплитуд исследуемых частотных компонентов путем свертки сигналов с вейвлет-функциями с вариабельным числом циклов с последующим объединением

результатов в виде геометрического среднего [23]. Полученные в результате свертки спектрограммы усреднялись для попыток каждого испытуемого, нормировались на значения предстимульного интервала $[-1...0]$ с и конвертировались в децибелы. Средние значения для ритмических компонентов в частотно-временных секторах (рис. 1), соответствующих максимуму изучаемых реакций, сравнивались с помощью ANOVA с факторами «испытуемый» и «модальность». По фактору «модальность» проводился анализ *post hoc* с поправкой Тьюки.

Результаты и обсуждение

Репрезентативная спектрограмма и пространственные компоненты для всех типов сенсоров для испытуемого №8 показаны на рис. 1. У всех испытуемых была обнаружена десинхронизация в частотных мю- (~ 10 Гц) и бета- (~ 20 Гц) диапазонах, типично развивавшаяся через 500 мс после подачи стимула к движению/представлению и спустя ~ 200 мс после электрической стимуляции медианного нерва, а также типично прекращавшаяся в течение 1–1,5 с. Бета-синхронизация

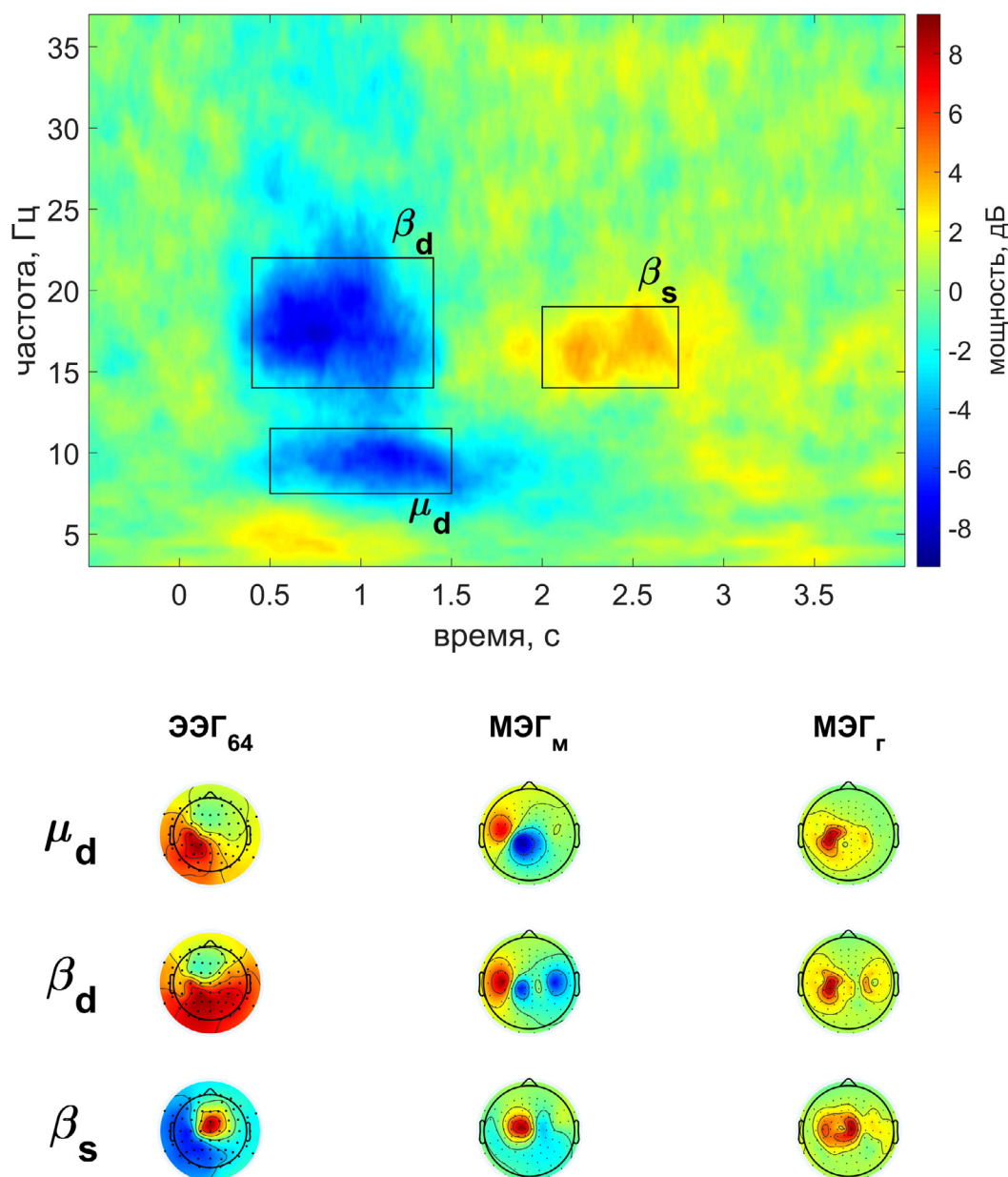


Рис. 1. Частотно-временные и пространственные паттерны модуляции сенсомоторных ритмов. Верхняя панель — усредненная спектрограмма МЭЭГ-сигнала контралатерального источника сенсомоторного ритма у испытуемого №8 в состоянии выполнения движения большим пальцем (время — относительно подачи визуального стимула к движению). Нижняя панель — соответствующие верхней спектрограмме пространственные паттерны для реакций трех типов (μ_d — десинхронизация мю-, β_d — десинхронизация бета-, и β_s — синхронизация бета-ритмов) для трех типов сенсоров (ЭЭГ₆₄ — 64-канальная электроэнцефалограмма, МЭГ_м — 102 магнитометра, МЭГ_г — среднеквадратичное планарных градиометров); цветом показаны весовые коэффициенты отдельных сенсоров.

у разных испытуемых развивалась с задержкой от 2 до 4 с от подачи команды к движению или электрическому стимулу (средний интервал — от 2,6 до 3,8 с). Межиндивидуальная вариабельность в латентности бета-синхронизации могла являться следствием таких факторов, как способы выполнения движения (плавно или с принудительной остановкой), различия в мысленной обработке последствий выполненного движения или полученного стимула, индивидуальные свойства стереотипии работы сенсомоторной системы. С учетом потенциально большей вариабельности латентности бета-синхронизации между отдельными попытками, усреднение спектрограмм по попыткам могло занижать абсолютные значения амплитуды синхронизации, но для целей настоящего исследования это не являлось ограничением. Мю-десинхронизация у всех испытуемых укладывалась в диапазон от 9 до 14 Гц, а бета-десинхронизация возникала типично на значениях частоты удвоенного мю-диапазона (от 19 до 28 Гц). В то же время бета-синхронизация после движения возникала на более низких частотах бета-диапазона (от 15 до 24 Гц), что согласуется с результатами, ранее полученными нашей научной группой [24], а также другими исследователями [4].

Для сравнения амплитуд десинхронизации между тремя модальностями регистрации энцефалограммы (ЭЭГ, МЭГ и их объединения — МЭЭГ) были отобраны по одному фильтру с хорошо сопоставимыми пространственными проекциями активации в проекции всех модальностей. Однако при расчете фильтров для бета-компонента у шести испытуемых из восьми было выделено несколько источников (де-)синхронизации бета-ритма с общей проекцией в модальности «МЭЭГ», но с различающейся полярностью для магнитометров и градиометров. На рис. 2 представлен пример данных для испытуемого 7, у которого одновременно есть два компонента с единой ЭЭГ-проекцией, но инвертированными диполями в МЭГ, а третий источник — с повернутой на 90 градусов полярностью в МЭГ без проекции в ЭЭГ. Похожие результаты уже были показаны [17] для фронтального тета-ритма с применением аналогичного алгоритма обработки данных МЭЭГ. По всей видимости, это объясняется наличием нескольких бета-компонентов, связанных с таламическим мю-ритмом, а также независимого от мю-ритма внутрикортикального компонента. Этот результат согласуется с современными гипотезами о проис-

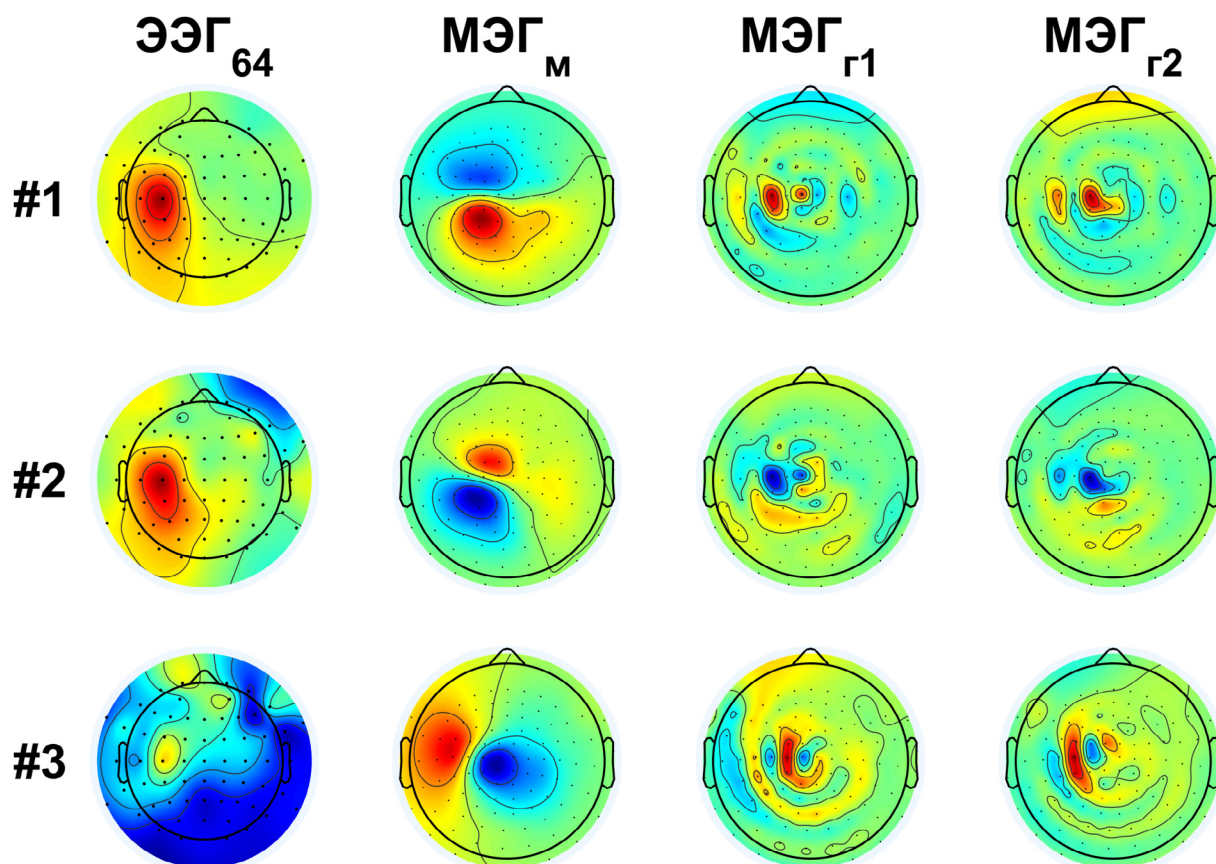


Рис. 2. Пространственные фильтры для десинхронизации бета-ритма у испытуемого №7. Цветом показаны весовые коэффициенты сенсоров всех модальностей (ЭЭГ₆₄ — 64-канальная электроэнцефалограмма, МЭГ_м — 102 магнитометра, МЭГ_{г1} и МЭГ_{г2} — 102 пары планарных градиометров). Строки — три лучших пространственных фильтра, вычисленных для объединенной МЭЭГ-модальности.

Таблица

Средние значения амплитуды модуляции компонентов сенсомоторного ритма

Тип реакции	МЭЭГ	МЭГ	ЭЭГ
Мю-десинхронизация	$-9,34 \pm 1,74$	$-7,53 \pm 2,11$ *	$-8,74 \pm 2,34$
Бета-десинхронизация	$-9,40 \pm 1,38$	$-7,27 \pm 1,97$ **	$-6,72 \pm 1,92$ **
Бета-синхронизация	$5,07 \pm 2,43$	$4,90 \pm 2,6$	$4,74 \pm 2,72$

Примечание: Приведены средние значения в децибелах \pm стандартное отклонение. * – статистически значимое отличие от «МЭЭГ», $p < 0,05$; ** то же для – $p < 0,0001$. Парный t-тест, поправка Тьюки.

хождении бета-ритмов [25] как наложения входных колебаний ~ 10 Гц таламокортикальных проекций и возвратных проекций ~ 10 Гц корково-таламических или внутрикортикальных связей. Тем не менее, от МЭГ-модальности отбиралась только одна проекция, поскольку использование сразу всех контралатеральных магнитных источников сделало бы некорректным сравнение их с ЭЭГ, для которой характерно наличие одного обширного пространственно-сглаженного диполя – вероятно, из-за эффекта объемной проводимости электрических потенциалов. Это обстоятельство несколько ограничивает возможности корректного сравнения МЭГ и ЭЭГ, ввиду наличия отдельных и потенциально независимых источников осцилляторной активности. Для установления степени функциональной и временной связности активности пространственно близких источников различной ориентации требуется проведение дополнительного исследования, включающего анатомическую локализацию находимых диполей.

При анализе различий в источниках бета-синхронизации было обнаружено, что для всех испытуемых с выраженной кратковременной синхронизацией характерно положение источника активности кпереди и медиальное – от источника бета-десинхронизации. Это также согласуется с данными немногочисленных исследований, отмечающих подобную диссоциацию в локализации [7]. Полученные результаты противоречат гипотезе о так называемом «бета-отскоке», понимающей синхронизацию после движения как гиперкомпенсацию ранее подавленного бета-ритма.

Количественное сравнение десинхронизации и синхронизации проводилось для спектрограмм, нормированных на значения предстимульного интервала $[-1000\ 0]$ с. Средние значения для трех типов модуляции ритма и трех модальностей регистрации представлены в таблице. Для всех типов модуляции объединенная модальность МЭЭГ давала наибольший по амплитуде эффект, различия были незначимы для бета-синхронизации ($F(2, 38) = 0,4599$; $p = 0,8437$), значимы для мю-десинхронизации ($F(2, 38) = 13,6506$; $p = 0,0126$) и бета-десинхронизации ($F(2, 38) = 31,9386$; $p = 3,246 \cdot 10^{-6}$).

Парные сравнения с поправкой Тьюки выявили значимые различия между МЭЭГ и ЭЭГ для мю-десинхронизации ($p = 0,0106$) и в парах МЭЭГ–ЭЭГ, МЭЭГ–МЭГ для бета-десинхронизации ($p = 1,823 \cdot 10^{-4}$ и $p = 4,654 \cdot 10^{-4}$ соответственно). Таким образом, впервые показано существенное преимущество использования объединенной модальности МЭЭГ перед использованием отдельно МЭГ и ЭЭГ, которые достоверно не отличались друг от друга. В отличие от исследования Иллман и коллег [13], мы не наблюдали значимого увеличения чувствительности в оценках бета-синхронизации, что может объясняться различиями в типах используемых задач: в их работе применялась исключительно сенсорная стимуляция, для которой характерна послестимульная синхронизация, тогда как в нашей работе большую роль играло представление движения, после которого у ряда испытуемых она вовсе не возникает [26]. Вероятно, что при обобщении модальностей (МЭЭГ) в упоминаемом исследовании [13] также бы наблюдался синергичный эффект от объединения модальностей из-за наличия уникальной информации в МЭГ и ЭЭГ, что следует из приводимых авторами коэффициентов корреляции Спирмена: $\rho = 0,77$ для бета-синхронизации и $\rho = 0,69$ для десинхронизации. При объединении этих результатов с нашими можно предположить, что бета-синхронизация достаточно хорошо представлена и в МЭГ, и в ЭЭГ, тогда как источники бета-десинхронизации по-разному проявляются на магнитных и электрических датчиках.

Таким образом, полученные результаты указывают на синергический эффект повышения чувствительности к модуляторным изменениям амплитуды компонентов сенсомоторного ритма и, в частности, бета-десинхронизации. Наличие множественных источников магнитного бета-ритма и их различная сопряженность с электрическими источниками указывают на наличие независимых кортикальных центров с тангенциальным положением проекционных волокон. Полученные данные также подтверждают гипотезу о пространственной и функциональной обособленности источника бета-синхронизации. Выводы исследования подчеркивают перспективность использования совместной регистрации МЭГ и ЭЭГ для

расширения фундаментального понимания функциональной роли отдельных компонентов кортикальных ритмов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-315-60011. Исследование выполнялось на

Уникальной научной установке «Центр нейрокогнитивных исследований (МЭГ-центр)» ФГБОУ ВО МГППУ. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с испытуемыми-добровольцами и одобрены Этическим комитетом МГППУ (протокол №13 от 12.04.2022). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cheyne D.O. MEG studies of sensorimotor rhythms: a review // *Exp. Neurol.* 2013. Vol. 245. P. 27–39.
2. Barone J., Rossiter H.E. Understanding the role of sensorimotor beta oscillations // *Front. Syst. Neurosci.* 2021. Vol. 15: 655886.
3. Salmelin R., Hari R. Spatiotemporal characteristics of sensorimotor neuromagnetic rhythms related to thumb movement // *Neuroscience.* 1994. Vol. 60. N 2. P. 537–550.
4. Pfurtscheller G., Stancak A., Jr., Edlinger G. On the existence of different types of central beta rhythms below 30 Hz // *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1997. Vol. 102. N 4. P. 316–325.
5. Kopell N., Whittington M.A., Kramer M.A. Neuronal assembly dynamics in the beta frequency range permits short-term memory // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. Vol. 108. N 9. P. 3779–3784.
6. Bardouille T., Bailey L., Cam C.A.N.G. Evidence for age-related changes in sensorimotor neuromagnetic responses during cued button pressing in a large open-access dataset // *Neuroimage.* 2019. Vol. 193. P. 25–34.
7. Jurkiewicz M.T., Gaetz W.C., Bostan A.C., Cheyne D. Post-movement beta rebound is generated in motor cortex: evidence from neuromagnetic recordings // *Neuroimage.* 2006. Vol. 32. N 3. P. 1281–1289.
8. Hall S.D., Stanford I.M., Yamawaki N., McAllister C.J., Ronnqvist K.C., Woodhall G.L., Furlong P.L. The role of GABAergic modulation in motor function related neuronal network activity // *Neuroimage.* 2011. Vol. 56. N 3. P. 1506–1510.
9. Muthukumaraswamy S.D., Myers J.F., Wilson S.J., Nutt D.J., Lingford-Hughes A., Singh K.D., Hamandi K. The effects of elevated endogenous GABA levels on movement-related network oscillations // *Neuroimage.* 2013. Vol. 66. P. 36–41.
10. Chandrasekaran C., Bray I.E., Shenoy K.V. Frequency shifts and depth dependence of premotor beta band activity during perceptual decision-making // *J. Neurosci.* 2019. Vol. 39. N 8. P. 1420–1435.
11. He B., Baxter B., Edelman B. J., Cline C.C., Ye W. Noninvasive brain-computer interfaces based on sensorimotor rhythms // *Proc. IEEE Inst. Electr. Electron. Eng.* 2015. Vol. 103. N 6. P. 907–925.
12. Bernier R., Dawson G., Webb S., Murias M. EEG mu rhythm and imitation impairments in individuals with autism spectrum disorder // *Brain Cogn.* 2007. Vol. 64. N 3. P. 228–237.
13. Illman M., Laaksonen K., Liljestrom M., Jousmaki V., Piitulainen H., Forss N. Comparing MEG and EEG in detecting the ~20-Hz rhythm modulation to tactile and proprioceptive stimulation // *Neuroimage.* 2020. Vol. 215: P. 116804.
14. Burgess R. C. MEG for greater sensitivity and more precise localization in epilepsy // *Neuroimaging Clin. N. Am.* 2020. Vol. 30. N 2. P. 145–158.
15. Baillet S., Garnero L., Marin G., Hugonin J.P. Combined MEG and EEG source imaging by minimization of mutual information // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1999. Vol. 46. N 5. P. 522–534.
16. Cohen M.X. A tutorial on generalized eigendecomposition for denoising, contrast enhancement, and dimension reduction in multichannel electrophysiology // *Neuroimage.* 2022. Vol. 247: 118809.
17. Zuure M.B., Hinkley L.B., Tiesinga P.H.E., Nagarajan S.S., Cohen M.X. Multiple midfrontal thetas revealed by source separation of simultaneous MEG and EEG // *J. Neurosci.* 2020. Vol. 40. N 40. P. 7702–7713.
18. Vasilyev A.N., Nuzhdin Y.O., Kaplan A.Y. Does real-time feedback affect sensorimotor EEG patterns in routine motor imagery practice? // *Brain Sci.* 2021. Vol. 11. N 9: 1234.
19. Taulu S., Simola J. Spatiotemporal signal space separation method for rejecting nearby interference in MEG measurements // *Phys. Med. Biol.* 2006. Vol. 51. N 7. P. 1759–1768.
20. Delorme A., Makeig S. EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis // *J. Neurosci. Methods.* 2004. Vol. 134. N 1. P. 9–21.
21. Haufe S., Meinecke F., Gorgen K., Dahne S., Haynes J.D., Blankertz B., Biessmann F. On the interpretation of weight vectors of linear models in multivariate neuroimaging // *Neuroimage.* 2014. Vol. 87. P. 96–110.
22. Muralidharan V., Yu X., Cohen M.X., Aron A.R. Preparing to stop action increases beta band power in contralateral sensorimotor cortex // *J. Cogn. Neurosci.* 2019. Vol. 31. N 5. P. 657–668.
23. Moca V.V., Barzan H., Nagy-Dabacan A., Muresan R.C. Time-frequency super-resolution with superlets // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12. N 1: 337.
24. Syrov N.V., Vasilyev A.N., Solovieva A.A., Kaplan A.Y. Effects of the mirror box illusion on EEG sensorimotor rhythms in voluntary and involuntary finger movements // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2022. Vol. 52. N 6. P. 936–946.
25. Jones S.R., Pritchett D.L., Sikora M.A., Stufflebeam S.M., Hamalainen M., Moore C.I. Quantitative analysis and biophysically realistic neural modeling of the MEG mu rhythm: rhythmogenesis and modulation of sensory-evoked responses // *J. Neurophysiol.* 2009. Vol. 102. N 6. P. 3554–3572.
26. Pfurtscheller G., Neuper C., Brunner C., da Silva F.L. Beta rebound after different types of motor imagery in man // *Neurosci. Lett.* 2005. Vol. 378. N 3. P. 156–159.

Поступила в редакцию 01.12.2022

После доработки 18.01.2023

Принята в печать 31.01.2023

RESEARCH ARTICLE

Increased sensitivity of spatial filters by combining the magnetic and electrical components of the sensorimotor cortical beta rhythm

A.N. Vasilyev^{1, 2, *} , A.G. Kryuchkova², A.E. Makovskaya¹

¹Department of Human and Animal Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²MEG Center, Moscow State University of Psychology and Education, Shelepikhinskaya Naberezhnaya, 2A 2, 123290 Moscow, 123290, Russia;

*e-mail: a.vasilyev@anvmail.com

Modulation of human magnetic or electrical sensorimotor rhythms during motor imagery is widely used in fundamental and applied neurophysiological research. To date, there is evidence of a better sensitivity of magnetic field sensors to beta-rhythm modulation, however, the potential synergistic effect of combining the two modalities has not yet been investigated. In this study, simultaneous registration of electroencephalogram (EEG) and magnetoencephalogram (MEG) was carried out in eight healthy volunteers during voluntary and imaginary movements, as well as during electrical stimulation of the median nerve. In all subjects, it was possible to identify desynchronization (suppression) of mu and beta rhythms during the performance of sensorimotor tasks, as well as beta synchronization after the end of movement or stimulation. Using the common projections of the covariance matrices of signals of the electric, magnetic, and combined (“MEEG”) modalities, the most sensitive individual spatial filters were calculated separately for each type of reaction. Relative to the pre-stimulus control, the changes in the amplitude of the sensorimotor rhythm components turned out to be the largest in the combined MEEG modality. At the same time, for mu-desynchronization, MEEG turned out to be significantly better than MEG, and for beta-desynchronization, MEEG turned out to be significantly better than both MEG and EEG. For beta synchronization, a shift in the position of sources in the fronto-medial direction was shown, and there were no significant differences in amplitude between modalities. It was also shown that for beta desynchronization, most subjects identified MEG sources with identical EEG projections or without pronounced EEG projections, which indicates the presence of several small tangentially located cortical dipoles involved in beta rhythm desynchronization. The results obtained indicate that in studies of modulation of sensorimotor rhythm components, in particular beta desynchronization, the combination of MEG and EEG leads to greater sensitivity. The multifocal nature of the magnetic beta rhythm and its varying severity in EEG sources indicate the presence of independent regulatory circuits of cortical-thalamic or intracortical origin.

Keywords: *sensorimotor rhythm, beta-rhythm, desynchronization, beta-rebound, MEG-EEG coregistration, spatial filter, motor imagery*

Funding: The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research (RFBR), project number 19-315-60011. The study was conducted at the unique research facility “Center for Neurocognitive Research (MEG-Center)” of MSUPE.

Сведения об авторах

Васильев Анатолий Николаевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, ст. науч. сотр. Научно-образовательного центра нейрокognитивных исследований (МЭГ-центра) Московского психолого-педагогического университета. Тел.: 8-499-256-45-13; e-mail: a.vasilyev@anvmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1573-0730>

Крючкова Анна Геннадьевна — мл. науч. сотр. Научно-образовательного центра нейрокognитивных исследований (МЭГ-центра) Московского психолого-педагогического университета. Тел.: 8-499-256-45-13; e-mail: kruchkovaag@mgppu.ru

Маковская Анна Евгеньевна — студент магистратуры кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-73; e-mail: anmakovska@gmail.com

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 571.27

**Участие нерецепторных тирозинкиназ Src-семейства
в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек****Н.В. Воробьева*** *Кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: nvvorobjeva@mail.ru*

Нейтрофилы высвобождают деконденсированный ядерный хроматин или нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET, от Neutrophil Extracellular Trap) в ответ на большое количество разнообразных физиологических и фармакологических стимулов. Однако, кроме участия в защите хозяина от инфекции, NET играют важную роль в патогенезе аутоиммунных, воспалительных и злокачественных заболеваний. В этой связи понимание молекулярных механизмов образования NET, ведущее, как правило, к гибели нейтрофилов (NETоз), крайне важно для обеспечения контроля возможного aberrантного или избыточного выброса хроматина. Киназы Src-семейства (Src-киназы) представляют собой нерецепторные тирозиновые киназы, участвующие в разнообразных функциях организма человека. Однако их роль в NETозе и окислительном взрыве изучена недостаточно. У нейтрофилов человека описано три представителя Src-киназ (Hck, Fgr и Lyn), и в нашей работе был изучен их вклад в NETоз и окислительный взрыв с использованием ингибиторного анализа. Мы показали, что Src-киназы участвуют в окислительном взрыве и NETозе, индуцированных кальциевым ионофором A23187, но не участвуют в этих эффекторных функциях при стимуляции нейтрофилов миметиком диацилглицерола форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА).

Ключевые слова: нейтрофилы человека, нейтрофильные внеклеточные ловушки, NET, окислительный взрыв, Src-киназы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-1-2

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET, от Neutrophil Extracellular Trap) представляют собой паутиноподобные структуры, состоящие из остова деконденсированного ядерного хроматина, покрытого гистонами, противомикробными белками гранул и цитозольными белками [1, 2]. Впервые NET были описаны и всесторонне изучены в лаборатории Артуро Циклински, а в 2004 г. появилась первая публикация [1], в которой их образование было представлено как новая эффекторная функция нейтрофилов, направленная на уничтожение и ограничение распространения патогенов в очаге воспаления. Было также установлено, что процесс образования NET сопровождается гибелью нейтрофила, и эта форма программируемой клеточной смерти была названа NETозом [3].

Впоследствии обнаружили, что, помимо защитной функции, NET играют существенную роль в патогенезе аутоиммунных, воспалительных и онкологических заболеваний [4–7]. В связи с этим понимание сигнальных путей, ведущих к образованию нейтрофильных ловушек, крайне важно для обеспечения контроля последствий их нерегулируемого или избыточного образования.

Классический, или «суицидальный», NETоз представляет собой многостадийный процесс, включающий активацию, образование активных форм кислорода (АФК) ферментным комплексом НАДФН-оксидазой, диссоциацию под действием АФК азуром — белковых комплексов, расположенных в мембранах азурофильных гранул [8], выход из азуром сериновых протеаз (нейтрофильной эластазы — НЭ, катепсина G и азуроцидина) и миелопероксидазы (МПО) в цитоплазму, а затем их миграцию в ядро. В ядре при участии НЭ и МПО, а также пептидил-аргининдеиминазы 4, цитруллинирующей гистоны, происходят деконденсация ядерного хроматина и его последующий выброс за пределы клетки, или NETоз [1]. Помимо перечисленных ключевых факторов NETоза, в сигнальных путях передачи информации от первичного акцептора сигнала и до образования NET принимает участие большое количество других ферментов, например, протеинкиназа C [9], циклин-зависимые киназы 4 и 6 [10], сигнальный каскад Raf-MEK-ERK, а также нерецепторные тирозиновые киназы Src-семейства (Src-киназы).

У человека было обнаружено 9 представителей тирозиновых Src-киназ: Src, Yes, Fgr, Fyn, Lyn, Hck, Lck, Blk и Frk, а также сходные с ними по структуре Src-подобные киназы: Brk, Srm, Frk и Bsk. Все эти киназы контролируют в организме множество функций, например, иммунный ответ, клеточную адгезию, хемотаксис, ремоделирование цитоскелета, апоптоз, генную экспрессию и др. [11, 12]. В нейтрофилах человека в настоящее время описана экспрессия трех представителей Src-киназ — Hck, Fgr и Lyn. С использованием мышей, нокаутных по генам, кодирующим киназы Hck и Fgr, было показано их участие в контроле экзоцитоза гранул [13]. Кроме того, с использованием трансгенных мышей установлено участие Hck и Fgr в регуляции окислительного взрыва через фосфорилирование фактора обмена гуаниновых нуклеотидов малых ГТФаз, Vav1, участвующего в активации Rac1 и Rac2 [14]. Вместе с тем, было показано, что ингибитор ГТФазы Rac, NSC23766, не оказывает подавляющего действия на форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА)- и fMLP (*N*-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)-индуцированный окислительный взрыв, несмотря на значительное снижение экспрессии Rac в нейтрофилах [15]. Эти факты свидетельствуют о том, что сборка и активация НАДФН-оксидазы может происходить и без ГТФ-связанных форм белка Rac.

Участие Src-киназ в регуляции NETоза было исследовано в единственной работе [16], в которой продемонстрировали образование NET нейтрофилами человека в ответ на компонент клеточной стенки дрожжей β -глюкан и, параллельно, активацию экспрессии Src-киназ в сигнальном пути, предшествующем генерации АФК НАДФН-оксидазой. Однако данные об участии Src-киназ в окислительном взрыве и NETозе нейтрофилов человека, стимулированных другими физиологическими и фармакологическими стимулами, практически отсутствуют. В настоящей работе впервые было изучено влияние Src-киназ на окислительный взрыв и NETоз нейтрофилов человека, активированных ионофором кальция A23187 и форболовым эфиром ФМА.

Материалы и методы

Реагенты. ФМА, A23187, fMLP, 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3, 4-*d*] pyrimidine (PP2), диметилсульфоксид и люминол были приобретены в компании Sigma-Aldrich (США). Краситель SYBR Green и смола ProLong Gold были закуплены в Thermo Fisher Scientific (Invitrogen, США).

Выделение первичных нейтрофилов человека. Все исследования с кровью проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Образцы крови были полу-

чены с добровольного согласия доноров в отделении переливания крови Российской детской клинической больницы ФГБОУ ВО «Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова» Минздрава России. Периферическую кровь здоровых доноров или пациентов с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) забирали в утренние часы натощак в полипропиленовые пробирки с гепарином. Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Нугауе (плотность 1,077 г/см³) в течение 25 мин при 400g и комнатной температуре, как описано ранее [17]. Основную массу эритроцитов удаляли путем седиментации в декстрате. Оставшиеся эритроциты лизировали в гипотоническом растворе хлорида натрия (0,2%-ный NaCl) в течение 30 с и далее восстанавливали изотоничность путем добавления 1,6%-ного NaCl. Нейтрофилы ресуспендировали в полной культуральной среде (ПКС), включающей RPMI 1640, 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин и 1%-ную инактивированную эмбриональную телячью сыворотку. Полученные клетки были представлены на 98% гранулоцитами, а их жизнеспособность составляла не менее 99%, что определяли по исключению 0,1%-ного трипанового синего.

Оценка люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). ЛЗХЛ использовали для оценки суммарных АФК (внутри- и внеклеточных), как описано ранее [18]. Свежевыделенные нейтрофилы в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл ($4,5 \times 10^5$ клеток) инкубировали в присутствии ингибитора Src-киназ PP2 в возрастающих концентрациях в течение 30 мин в условиях 37°C и 5% CO₂ в ПКС. Далее ПКС заменяли на фосфатный буфер Кребса-Рингера (120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,7 мМ KH₂PO₄, 8,3 мМ Na₂HPO₄, 10 мМ глюкоза, 1 мМ CaCl₂, 1,5 мМ MgCl₂, pH 7,3). К 2×10^5 клеток добавляли 80 мкМ люминола и проводили стимуляцию окислительного взрыва 2 мкМ A23187, 30 нМ ФМА или 800 нМ fMLP. ЛЗХЛ анализировали сразу после стимуляции в течение 30 мин при 37°C в планшетном хемилюминометре Lucy 1 (Anthos Labtec, Австрия). Оценивали площадь, занимаемую кривыми ЛЗХЛ, и выражали степень окислительного взрыва в процентах от контроля (контроль: стимулированные нейтрофилы, 100%) в виде гистограмм.

Индукция и флуоресцентное окрашивание NET. Для обнаружения NET использовали флуоресцентную микроскопию. Свежевыделенные нейтрофилы (2×10^5 клеток/мл в 500 мкл ПКС), адгезированные на круглых покровных стеклах, находящиеся в лунках 24-луночного планшета, инкубировали с PP2 в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂. Образование NET индуцировали 30 нМ ФМА или 2 мкМ A23187 в течение 2 ч 40 мин и 4 ч соответственно. После стимуляции NETоза клет-

ки фиксировали в лунках в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 15 мин. Препараты окрашивали SYBR Green в течение 7 мин при комнатной температуре в темноте, далее погружали в смолу ProLong Gold. Клетки анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM LB (Leica Microsystems, Германия), а фотографирование проводили с помощью камеры Leica DC300F. Подсчитывали общее количество клеток и количество нетотических клеток в каждом поле зрения, затем оценивали процент NETоза в нескольких полях зрения.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, США). Сравнение между несколькими экспериментальными группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), сопровождаемого тестом множественного сравнения Бонферрони. Данные в тексте и на рисунках представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Чтобы выяснить, зависит ли NETоз нейтрофилов человека, активированных A23187 и ФМА, от Src-киназ, был применен специфический неселективный ингибитор PP2. Действие PP2 также оценивали на модели окислительного взрыва, индуцированного A23187, ФМА и хемоаттрактантом fMLP, методом регистрации ЛЗХЛ, как описано в разделе «Материалы и методы».

На рис. 1 можно видеть, что инкубация нейтрофилов с PP2 в возрастающих концентрациях приводила к значительному и дозозависимому подавлению окислительного взрыва, индуцированного A23187 (А) и fMLP (В), но не ФМА (Б). NETоз, стимулированный A23187, был также эффективно и дозозависимо подавлен PP2 (рис. 2А, В), что указывает на его зависимость от активации Src-киназ. Однако ФМА-индуцированный NETоз был нечувствителен к действию PP2 (рис. 2Б, В), что коррелировало с действием ингибитора в ответ на окислительный взрыв.

Мы предположили, что Src-киназы, помимо активации НАДФН-оксидазы (окислительный взрыв), являющейся неотъемлемым участником классического NETоза, могут активировать и другие субстраты, играющие важную роль в его активации. Для проверки этого предположения мы использовали нейтрофилы, выделенные из крови больных ХГБ, имеющие мутации субъединиц, полностью инактивирующие НАДФН-оксидазу. Такие нейтрофилы не способны генерировать оксидаза-зависимые АФК, а также не образуют NET в ответ на многие стимулы, включая ФМА, однако образуют NET в ответ на A23187 (рис. 2Г). Инкубация нейтрофилов больных ХГБ в присутствии

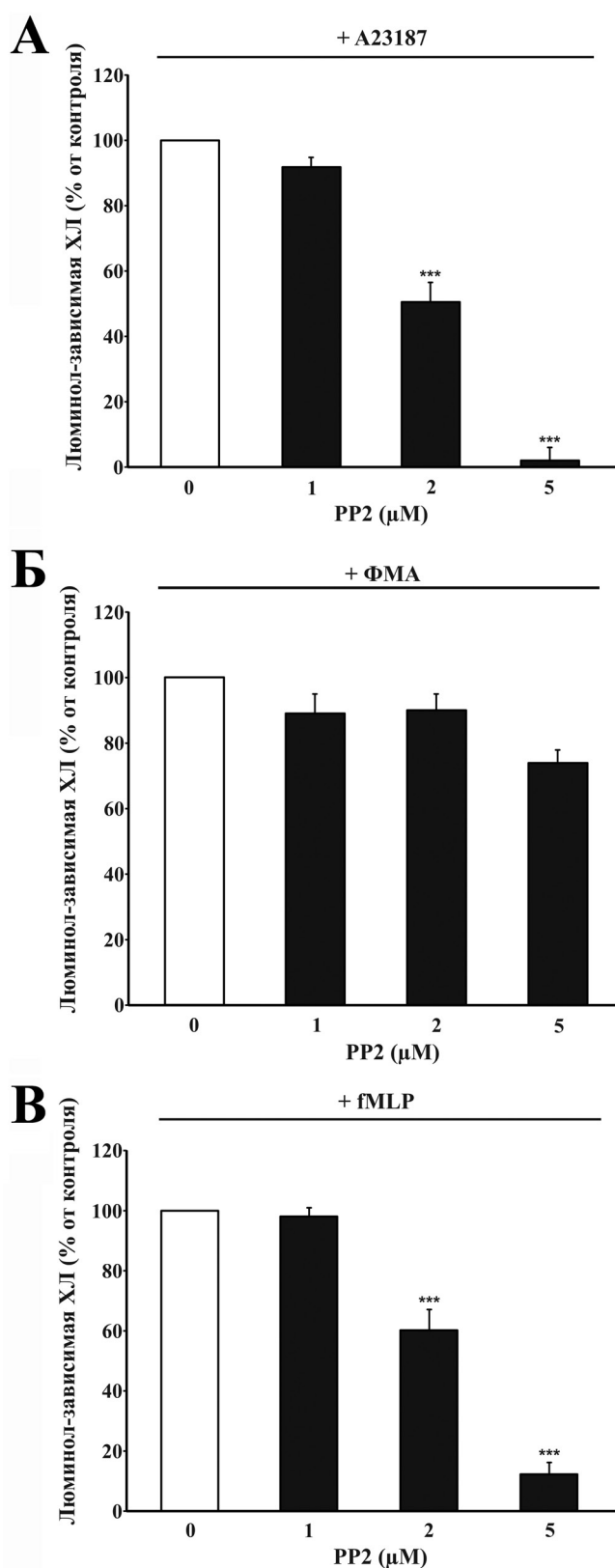


Рис. 1. Оценка участия нерецепторных тирозинкиназ Src-семейства в окислительном взрыве нейтрофилов человека. Нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в течение 30 мин в присутствии специфического ингибитора Src-киназ PP2. Окислительный взрыв индуцировали 2 мкМ A23187 (А), 30 нМ ФМА (Б) или 800 нМ fMLP (В) и регистрировали хемилюминесценцию в присутствии 80 мкМ люминола; $n = 3$; *** — $p < 0,001$.

Сокращения на графиках: ХЛ, хемилюминесценция.

PP2 в течение 30 мин не вызвала подавления NETоза, индуцированного A23187 (рис. 2Г). Это указывает на участие Src-киназ только в сигнальном пути активации окислительного взрыва как составляющего звена NETоза, который полностью отсутствует в нейтрофилах больных ХГБ.

Различное действие на NETоз и окислительный взрыв ингибитора Src-киназ PP2 в зависимости от характера стимула (ФМА или A23187) можно было бы объяснить неодинаковой чувствительностью НАДФН-оксидазы к отсутствию в своем составе ГТФ-связанной формы Rac2, активация которой зависит от Src-киназ [14]. Однако трудно

объяснить, почему при активации нейтрофилов ФМА отсутствие такой формы Rac2 не влияет на окислительный взрыв и NETоз, а при стимуляции нейтрофилов A23187 — оказывает сильное подавляющее действие.

Мы полагаем, что различная чувствительность к подавлению Src-киназ нейтрофилов человека, стимулированных различными активаторами, обусловлена неодинаковой регуляцией тока Ca^{2+} . Известно, что почти все иммунные реакции нейтрофилов, включая окислительный взрыв и NETоз, на определенной стадии требуют повышения уровня цитоплазматического Ca^{2+} . Ней-

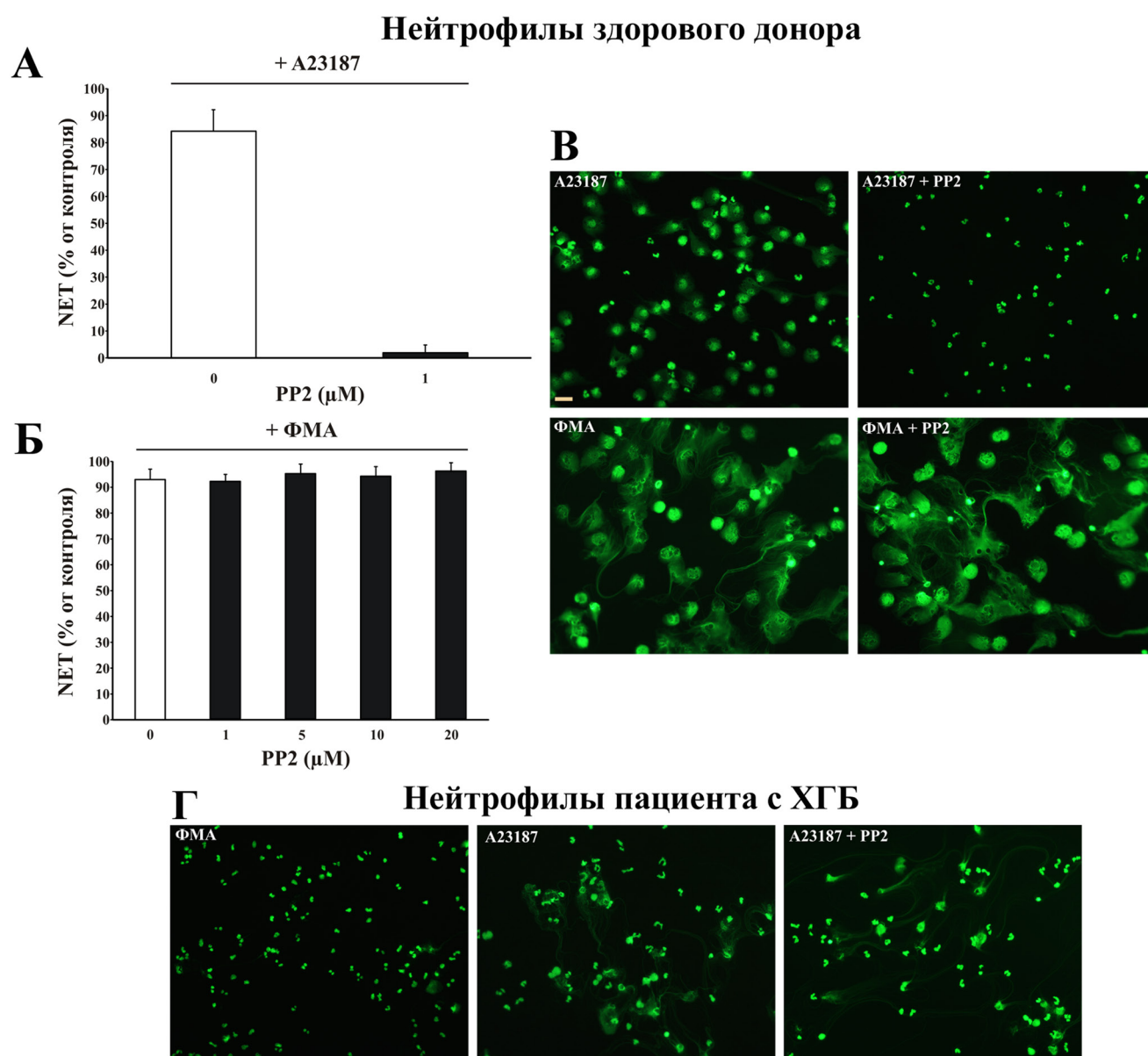


Рис. 2. Оценка участия тирозинкиназ Src-семейства в NETозе нейтрофилов человека.

Для оценки NETоза нейтрофилы здоровых доноров (А, Б, В) и больных хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) (Г), адгезированные на покровных стеклах, инкубировали с PP2 в течение 30 мин. Образование NET индуцировали 2 мкМ A23187 или 30 нМ ФМА в течение 4 ч и 2 ч 40 мин соответственно. Клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом и окрашивали SYBR Green для визуализации хроматина; $n = 3$, для нейтрофилов здоровых доноров и нейтрофилов ХГБ; *** — $p < 0,001$. Масштаб 25 мкм.

Дозы PP2 в A23187- и ФМА-индуцированных нейтрофилах составляют 1 мкМ и 5 мкМ соответственно (В и Г).

трофилы как невозбудимые клетки используют для генерации кальциевых сигналов депо-управляемые Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны [19], а сенсором, сигнализирующим об истощении Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме, являются расположенные в нем белки STIM (Stromal Interaction Molecule). Ранее было показано, что ФМА, в отличие от A23187 и fMLP, не активирует вход внеклеточного Ca^{2+} при активации и депо-управляемые Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны не задействованы [20]. Вместе с тем, на модели фибробластов мышей, трансгенных по тирозинкиназе c-Src, было показано участие c-Src в регуляции депо-управляемых Ca^{2+} -каналов [21]. Таким образом, мы допускаем, что тирозинкиназы Src-семейства могут фосфорилировать не только Vav1, но и компоненты кальциевых каналов нейтрофилов человека, чем можно объяснить различие чувствительности к их подавлению при стимуляции разными стимулами. Однако это предположение еще предстоит доказать экспериментально.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science*. 2004. Vol. 303. N 5663. P. 1532–1535.
2. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps // *J. Cell. Biol.* 2007. Vol. 176. N 2. P. 231–241.
3. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death // *Sci. STKE*. 2007. Vol. 2007. N 379: pe11.
4. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease // *Biochemistry (Mosc.)*. 2014. Vol. 79. N 12. P. 1286–1296.
5. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity // *Autoimmun. Rev.* 2015. Vol. 14. N 7. P. 633–640.
6. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology // *Biochemistry (Mosc.)*. 2020. Vol. 85. N 10. P. 1178–1190.
7. Vorobjeva N.V. Neutrophil extracellular traps: new aspects // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020. Vol. 75. N 4. P. 173–188.
8. Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis // *Cell. Rep.* 2014. Vol. 8. N 3. P. 883–896.
9. Vorobjeva N., Dagil Y., Pashenkov M., Pinegin B., Chernyak B. Protein kinase C isoforms mediate the formation of neutrophil extracellular traps // *Int. Immunopharmacol.* 2022. Vol. 24. N 114: 109448.
10. Amulic B., Knackstedt S.L., Abu Abed U., Deigendesch N., Harbort C.J., Caffrey B.E., Brinkmann V., Heppner F.L., Hinds P.W., Zychlinsky A. Cell-cycle proteins control production of neutrophil extracellular traps // *Dev. Cell*. 2017. Vol. 43. N 4. P. 449–462.e5.
11. Brian B.F., Freedman T.S. The Src-family kinase Lyn in immunoreceptor signaling // *Endocrinology*. 2021. Vol. 162. N 10: bqab152.
12. Futosi K., Mócsai A. Tyrosine kinase signaling pathways in neutrophils // *Immunol. Rev.* 2016. Vol. 273. N 1. P. 121–139.
13. Fumagalli L., Zhang H., Baruzzi A., Lowell C.A., Berton G. The Src family kinases Hck and Fgr regulate neutrophil responses to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine // *J. Immunol.* 2007. Vol. 178. N 6. P. 3874–3885.
14. Gao Y., Dickerson J.B., Guo F., Zheng J., Zheng Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. Vol. 101. N 20. P. 7618–7623.
15. Mitchell T., Lo A., Logan M.R., Lacy P., Eitzen G. Primary granule exocytosis in human neutrophils is regulated by Rac-dependent actin remodeling // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2008. Vol. 295. N 5. P. C1354–C1365.
16. Nani S., Fumagalli L., Sinha U., Kamen L., Scapini P., Berton G. Src family kinases and Syk are required for neutrophil extracellular trap formation in response to β -glucan particles // *J. Innate Immun.* 2015. Vol. 7. N 1. P. 59–73.
17. Vorobjeva N., Prihodko A., Galkin I., Pletjushkina O., Zinovkin R., Sud'ina G., Chernyak B., Pinegin B. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils *in vitro* // *Eur. J. Cell. Biol.* 2017. Vol. 96. N 3. P. 254–265.
18. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation // *Immunobiology*. 2016. Vol. 221. N 2. P. 208–219.

19. Geiszt M., Kapus A., Németh K., Farkas L., Ligeti E. Regulation of capacitative Ca^{2+} influx in human neutrophil granulocytes. Alterations in chronic granulomatous disease // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. N 42. P. 26471–26478.
20. Gupta A.K., Giaglis S., Hasler P., Hahn S. Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. N 5: e97088.
21. Babnigg G., Bowersox S.R., Villereal M.L. The role of pp60c-src in the regulation of calcium entry via store-operated calcium channels // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. N 47. P. 29434–29437.
22. Geiszt M., Kapus A., Ligeti E. Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? // *J. Leukoc. Biol.* 2001. Vol. 69. N 2. P. 191–196.
23. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NADPH oxidase modulates Ca^{2+} -dependent formation of neutrophil extracellular traps // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020. Vol. 75. N 3. P. 104–109.
24. Sundqvist M., Christenson K., Björnsdóttir H., Osla V., Karlsson A., Dahlgren C., Speert D.P., Fasth A., Brown K.L., Bylund J. Elevated mitochondrial reactive oxygen species and cellular redox imbalance in human NADPH-oxidase-deficient phagocytes // *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8: 1828.
25. Song Z., Huang G., Chiquetto Paracatu L., Grimes D., Gu J., Luke C.L., Clemens R.A., Dinanier M.C. NADPH oxidase controls pulmonary neutrophil infiltration in the response to fungal cell walls by limiting LTB4 // *Blood*. 2020. Vol. 135. N 12. P. 891–903.
26. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prikhodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020. Vol. 1866. N 5: 165664.

Поступила в редакцию 14.11.2022

После доработки 26.12.2022

Принята в печать 06.02.2023

RESEARCH ARTICLE

Participation of non-receptor Src family tyrosine kinases in the formation of neutrophil extracellular traps

N.V. Vorobjeva* 

Department of Immunology, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, 119234, Moscow, Russia

**e-mail: nvvorobjeva@mail.ru*

Neutrophils release decondensed nuclear chromatin or Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in response to a great number of physiological and pharmacological stimuli. However, apart from the host defensive function, NETs play an essential role in the pathogenesis of various autoimmune, inflammatory, and malignant diseases. Therefore, understanding the molecular mechanisms of NETs formation, usually leading to the neutrophil death (NETosis), is important to control the probable aberrant or excessive NETs release. The Src-family kinases (Src-kinases) are non-receptor tyrosine kinases that are involved in a variety of human functions. However, their role in NETosis and oxidative burst has not been sufficiently studied. Since three representatives of Src-kinases (Hck, Fgr, and Lyn) have been described in human neutrophils, we studied their contribution to NETosis and oxidative burst using inhibitory analysis. We have shown that Src-kinases are involved in the oxidative burst and NETosis induced by the calcium ionophore A23187 but not the mimetic of diacylglycerol phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA).

Keywords: *human neutrophils, neutrophil extracellular traps, NETs, oxidative burst, Src kinases*

Funding. The research was carried out within the framework of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No 121042600047-9 and Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University “Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology.”

Сведения об авторах

Воробьева Нина Викторовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-46; e-mail: nvvorobjeva@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5233-9338>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.26+579.25+579.68

**Состав бактериальных сообществ
нефтезагрязненных донных отложений реки Каменка****Д.О. Егорова* , П.Ю. Санников , Ю.В. Хотяновская , С.А. Бузмаков ***Кафедра биогеоценологии и охраны природы, Пермский государственный национальный исследовательский университет,
614068, г. Пермь, ул. Букирева, д. 15***e-mail: daryao@rambler.ru*

Река Каменка протекает по территории Кокуйского газонефтяного месторождения, расположенного в Пермском крае. Несмотря на отсутствие в непосредственной близости от реки нефтедобывающих объектов, в водах и донных отложениях выявлены нефтяные углеводороды в концентрации 2445–25800 мг/кг. Исследован состав микробных сообществ донных отложений реки Каменка, расположенных у истока и по течению реки. С применением методов высокопроизводительного секвенирования и биоинформатической обработки данных установлено, что основная доля микробных сообществ представлена бактериями филума Proteobacteria (16,7–30,3%), также в сообществах представлены филумы Actinobacteriota, Bacteroidota, Bdellovibrionota, Campilobacterota, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deferribacterota, Desulfobacterota, Firmicutes, Gemmatimonadota, Methyloirabillota, Myxococcota, Nitrospirota, Patescibacteria, Planctomycetota, Spirochaetota, Synergistota, Thermotofota и Verrucomicrobiota. Значения индекса Шеннона для исследованных сообществ находятся в прямой корреляционной зависимости от концентрации нефтяных углеводородов в донных отложениях. Филум Proteobacteria во всех сообществах представлен классами Alphaproteobacteria и Gammaproteobacteria, среди которых доминирующую позицию занимают представители семейств Rhodobacteriaceae и Comamonadaceae. При идентификации до рода установлено, что в семействе Comamonadaceae основную долю составляют бактерии рода *Hydrogenophaga*. Следует отметить, что бактерии рода *Pseudomonas* (класс Gammaproteobacteria) выявлены только в микробиоценозе донных отложений, характеризующихся наибольшей концентрацией нефтяных углеводородов.

Ключевые слова: бактерии, нефтяное загрязнение, донные отложения, микробное сообщество, высокопроизводительное секвенирование

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-1-3

Загрязнение окружающей среды нефтью является глобальной проблемой. Проникновение нефтяных углеводородов в природные объекты происходит в результате нарушения режимов нефтедобычи, аварий при транспортировке и хранении, в процессе переработки [1]. Длительная разработка нефтяных месторождений, особенно в районах со сложными климатическими или геологическими условиями, приводит к усугублению данной проблемы. Кокуйское месторождение, расположенное на территории Пермского края (Кунгурский и Ординский районы) (рис. 1) находится в активной эксплуатации более полувека (<https://www.nftn.ru>). Геологические запасы нефти составляют более 100 млн т. На территории месторождения выявлены нефтяные, газоконденсатонефтяные и газонефтяные залежи. Однако разработка месторождения осложнена горно-геологическими условиями региона, а именно – раз-

витием карстовых процессов. Наличие трещинных зон в карстовых породах обуславливает вертикальную миграцию нефти, в том числе – в составе подземных вод, что приводит к появлению нефтяных пятен на почвах или в реках, удаленных от нефтегазодобывающих объектов [2, 3]. Одной из таких проблемных территорий является река Каменка. На протяжении длительного периода времени в водах Каменки фиксируются нефтяные углеводороды, повышенное содержание хлоридов, а также присутствует запах сероводорода (данные не опубликованы).

Основными компонентами нефти являются линейные и разветвленные углеводороды, ароматические углеводороды, нафтены и ряд других органических соединений [4]. Поступление данных веществ в почву и донные отложения приводит к нарушению их структуры и функций, а также оказывает влияние на микробиоценоз [4–7].

Известно, что появление такого комплекса органических загрязнителей вызывает необратимые изменения в составе и структуре микробиоценоза, направленные на адаптацию к новым условиям [8, 9]. В большинстве случаев это приводит к повышению доли микроорганизмов, устойчивых к негативному воздействию углеводородов нефти или/и способных использовать данные соединений в метаболических процессах [10]. Анализ структуры микробных сообществ удаленных друг от друга регионов, подверженных негативному влиянию нефтяного загрязнения, свидетельствует о существенных различиях в составе основных таксономических групп микробиоценозов [8, 11].

Целью настоящей работы стало изучение состава микробиоценоза донных отложений реки Каменка, подверженных загрязнению углеводородами нефти в результате их проникновения из подлежащих горных пород.

Материалы и методы

Отбор проб донных отложений производили согласно ГОСТ 17.1.5.01-80 «ГИДРОСФЕРА. Общие требования к отбору проб донных отложений водных объектов для анализа на загрязненность» и Природоохранному нормативному документу

федеративному (ПНД Ф) 12.1:2.2.2:2.3.2-03 «Отбор проб почв, грунтов, осадков биологических очистных сооружений, шламов промышленных сточных вод, донных отложений искусственно созданных водоемов, прудов-накопителей и гидротехнических сооружений» в истоке реки Каменка и трех точках ниже по течению в августе 2021 г. (рис. 1) и транспортировали их в термоконтейнерах при поддержании температуры 4–5°C:

1) образец V-00 – отобран в истоке реки, pH 7,31, органический углерод 17,5%, общая щелочность ($\text{CO}_3 + \text{HCO}_3$) 390 мг/кг, хлориды 595 мг/кг, нефтепродукты 4093 мг/кг, присутствует характерный запах серы;

2) образец V-00-1 – отобран на расстоянии 10–15 м от истока реки, pH 6,97, органический углерод 12,6%, общая щелочность ($\text{CO}_3 + \text{HCO}_3$) 171 мг/кг, хлориды 2975 мг/кг, нефтепродукты 25800 мг/кг, присутствует характерный запах серы;

3) образец V-DO-12 – отобран на расстоянии 100 м от истока реки, pH 7,28, органический углерод 13,2%, общая щелочность ($\text{CO}_3 + \text{HCO}_3$) 1146 мг/кг, хлориды 3675 мг/кг, нефтепродукты 5494 мг/кг, присутствует характерный запах сероводорода;

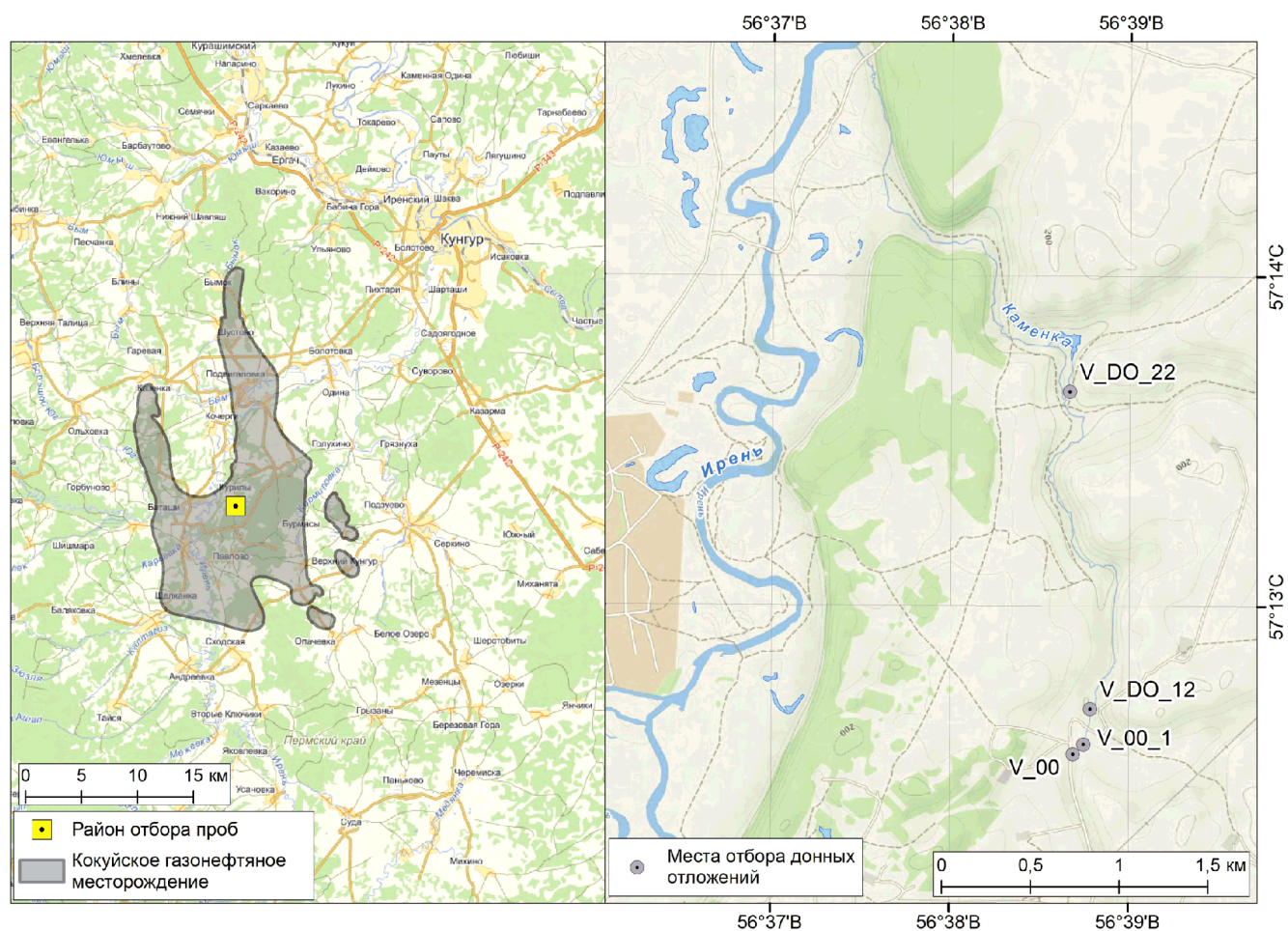


Рис. 1. Карта-схема расположения районов отбора донных отложений на реке Каменка, Пермский край.

4) образец V-DO-22 – отобран на расстоянии 2500 м от истока реки, pH 7,11, органический углерод 10,6%, общая щелочность ($\text{CO}_3 + \text{HCO}_3$) 281 мг/кг, хлориды 175 мг/кг, нефтепродукты 2445 мг/кг, присутствует характерный запах сероводорода.

Определение физико-химических параметров образцов проводили согласно опубликованной ранее методике [12], концентрацию нефти определяли согласно ПНД Ф 16.1:2.2.22-98 «Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в минеральных, органогенных, органоминеральных почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии».

Выделение ДНК из образцов донных отложений проводили с применением набора реактивов MACHEREY-NAGEL NucleoSpin Soil (MACHEREY-NAGEL, Германия) согласно инструкции производителя.

Высокопроизводительное секвенирование. Очищенные препараты ДНК использовали для создания библиотек фрагментов гена 16S рРНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением универсальных праймеров на вариабельный участок V4: F515/R806 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA/GGACTACVSGGGTATCTAAT) [13] с присоединенными адаптерами и уникальными баркодами компании Illumina (Illumina, США). ПЦР проводили в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5–1 единицу активности полимеразы Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, США), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 1–10 нг ДНК-матрицы и 2 нМ каждого dNTP (Life Technologies США). Смесь денатурировали при 94°C 1 мин., после чего следовало 25 циклов: 94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 60 с. Финальная элонгация проводилась при 72°C 3 мин. ПЦР-продукты очищали по рекомендованной Illumina методике с использованием магнитных частиц AMPureXP (Beckman Coulter, США). Подготовка библиотек и секвенирование проводились в соответствии с рекомендациями производителя для работы на приборе «Illumina MiSeq» (Illumina, США) с использованием набора реагентов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2 × 300 н).

Обработка данных с применением биоинформационных технологий. Первоначальную обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения компании Illumina (Illumina, США). Для последующего анализа (объединения последовательностей, удаления химерных прочтений, восстановления исходных фило-типов (ASV, Amplicon sequence variant) и дальнейшей таксономической классификации полученных ASV) использовали программные пакеты dada2 [14], phyloseq [15] и DECIPHER [16], работу осуществляли в программной среде R. Для

представления данных таксономического анализа использовали средства программного пакета QIIME [17].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 6.0. Статистический анализ осуществляли с использованием параметрических методов, статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Графические данные визуализированы в программе Microsoft Excel 2013.

Результаты и обсуждение

Физико-химический анализ донных отложений реки Каменка показал, что они имеют слабощелочную, ближе к нейтральной, среду (по показателю pH), содержат органический углерод, карбонаты и хлориды (в образцах V-00-1 и V-DO-12 концентрация хлоридов многократно превышает установленные нормы), а также загрязнены углеводородами нефти. Наиболее высокая концентрация нефтепродуктов выявлена в образце V-00-1 (см. Материалы и методы), отобранном в 10–15 м от истока реки. В данном месте предполагается выход подземных вод, содержащих нефть.

Впервые проведены исследования структуры микробного сообщества донных отложений реки Каменка. Использование молекулярно-генетических методов позволило выявить широкий спектр микроорганизмов, принадлежащих доменам Bacteria и Archaea.

В результате высокопроизводительного секвенирования участка гена 16S рРНК из образцов донных отложений истока реки Каменка (точка отбора V-00) (рис. 1) и последующей биоинформатической обработки получено 546 исходных фило-типов (ASV). Установлено, что 68,8% принадлежало домену Bacteria, 0,2% – домену Archaea, а 31% не был идентифицирован. Всего в составе микробного сообщества выявлено 13 филумов домена Bacteria (Acidobacteriota, Actinobacteria, Bacteroidota, Campilobacterota, Chloroflexi, Desulfobacteriota, Firmicutes, Patescibacteria, Planctomycetota, Proteobacteria, Spirochaetota, Synergistota, Verrucomicrobiota). Доминирующим является филум Proteobacteria (26,0%) (рис. 2). Доля других филумов варьировала от 0,1% до 9,1%. Хуже всего представлены филумы Acidobacteriota и Verrucomicrobiota (0,1% и 0,8% соответственно).

В образцах донных отложений, отобранных ниже истока в 10–15 м (точка отбора V-00-1) (рис. 1), после обработки исходных данных выявлено 522 ASV. Основную долю (67,5%) составлял домен Bacteria, тогда как к домену Archaea принадлежало 4,8%. Не определена таксономическая принадлежность у 27,7% выявленных фило-типов. В отличие от микробного сообщества донных отложений истока реки Каменка, в рассматриваемом

мом сообществе выявлено 15 филумов домена Bacteria (Acidobacteriota, Actinobacteriota, Bacteroidota, Campilobacterota, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deferribacterota, Desulfobacteriota, Firmicutes, Gemmatimonadota, Patescibacteria, Planctomycetota, Proteobacteria, Spirochaetota, Verrucomicrobiota). Следует отметить, что филум Deferribacterota (0,1%) не выявлен в других исследованных сообществах. 30,3% идентифицированных последовательностей приходится на филум Proteobacteria (рис. 2). Также в значительной мере представлены филумы Campilobacterota (9,6%), Bacteroidota (9,2%) и Actinobacteriota (6,4%).

Сообщество донных отложений, отобранных ниже истока на 100 м (точка отбора V-DO-12) (рис. 1), на 65% представлено доменом Bacteria и на 0,1% — доменом Archaea. Для 34,9% исходных филотипов (из 685 ASV) таксономическая принадлежность не установлена. Доминировали представители филума Proteobacteria (20,4%) (рис. 2). Доля других тринадцати филумов в сообществе была ниже и варьировала от 0,1 до 14,1% (рис. 2).

Наиболее сложным для определения таксономической принадлежности оказалось сообщество донных отложений, отобранных в 2500 м ниже по течению от истока реки Каменка (точка отбора V-DO-22) (рис. 1). Относительная доля неклассифицируемых на филогенетическом уровне нуклеотидных последовательностей составила 49,1%. Среди идентифицированных последовательностей:

46,7% — домен Bacteria, 4,2% — домен Archaea. Анализ выявленных филумов показал, что в данном сообществе отсутствуют представители Acidobacteriota, но определяются представители филумов Methilomirabiota (0,1%) и Thermotogota (0,2%), а также в значительной мере представлен филум Cyanobacteria — 1,0%. Доминирующую позицию занимает филум Proteobacteria (16,7%) (рис. 2).

Установлена прямая линейная зависимость средней силы (коэффициент корреляции Пирсона составил 0,63) между концентрацией нефти в донных отложениях и значением индекса Шеннона-Уивера (H) как показателя биоразнообразия в исследованных микробиоценозах. Численные значения H относятся к диапазону, характеризующему низкое разнообразие таксономического состава сообществ ($H = 2,64–2,91$).

Таксономический состав бактериальных сообществ донных отложений реки Каменка существенно отличается от такового ряда бактериоценозов, подверженных длительному загрязнению нефтяными углеводородами [4, 8]. В составе микробного сообщества донных отложений с наибольшим уровнем нефтезагрязнения в значительной мере представлен филум Actinobacteriota (6,7%), а доля филума Chloroflexi (0,3%) ниже, чем в остальных сообществах. Доминирующая позиция филума Proteobacteria во всех исследованных сообществах может быть обусловлена рядом факторов: протеобактерии являются типичными

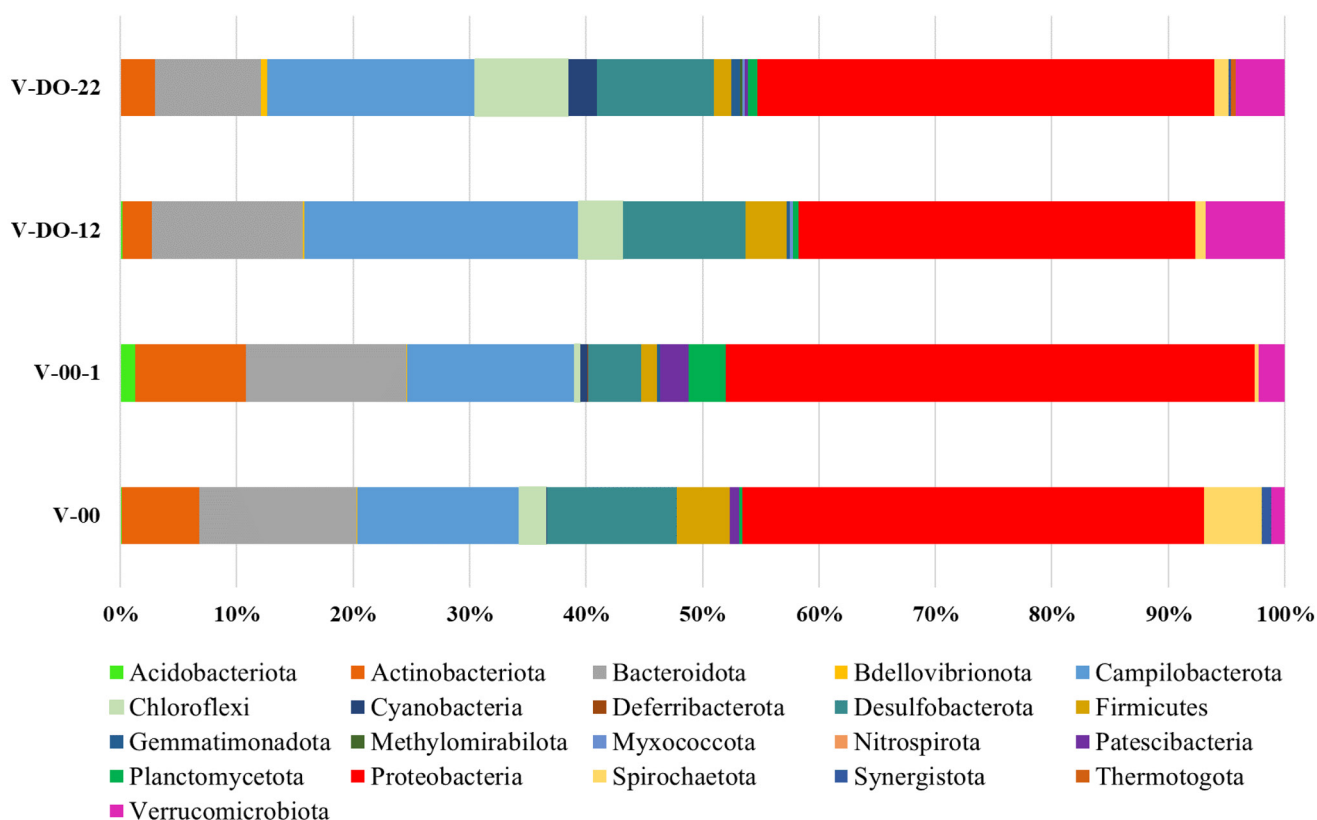


Рис. 2. Состав бактериальных сообществ донных отложений реки Каменка на уровне филумов.

представителями речных экосистем; представители данного филума играют важную роль в трансформации органических соединений; среди протеобактерий описано значительное количество штаммов, осуществляющих трансформацию углеводородов нефти [4, 7, 11, 18].

Во всех исследованных в настоящей работе сообществах присутствуют представители филумов Desulfobacteriota (3,0–7,3%) и Spirochaetota (0,2–3,3%). Интересно отметить, что бактерии данных филумов участвуют в анаэробных процессах, в том числе для них установлена способность к синтрофным взаимодействиям [19]. Учитывая тот факт, что восстановление сульфатов является одной из метаболических функций бактерий данных филумов, можно предполагать, что появление запаха сероводорода в местах отбора проб является результатом их жизнедеятельности.

Филум Halobacterota домена Archaea выявлен во всех сообществах донных отложений реки Каменка. Его доля в микробиоценозах составляла 0,1–3,4%. По литературным данным, филум Halobacterota характерен для анаэробных сообществ, а также для сообществ солевых пещер [19, 20].

Вероятно, его присутствие в исследуемых сообществах донных отложений обусловлено поступлением в реку Каменка подземных вод, проходящих по карстовым трещинам с подлежащих слоев. Интересно отметить, что в составе микробиоценозов, отобранных в точках V-00-1 и V-DO-22, выявлена значительная доля еще одного филума домена Archaea – Crenarchaeota (3,7% и 0,8% соответственно). Известно, что представители данного филума описаны в составе биоценозов полярного региона [21].

Проведен анализ микробных сообществ донных отложений на уровне класса, семейства, порядка и рода (таблица). Известно, что представители родов *Microbacterium*, *Flavobacterium* и *Lutibacter* обладают ферментативной активностью в отношении углеводородов нефти и сложных ароматических соединений, встречаются в составе донных отложений пресноводных и морских водоемов [22, 23]. Следует отметить, что наибольшая доля ASV рода *Microbacterium* представлена в микробном сообществе с наибольшим уровнем нефтезагрязнения (таблица). Также в данном сообществе выявлено присутствие рода *Rhodococcus*

Таблица

Доминантные таксоны (%) в микробных сообществах донных отложений

Таксономическая единица		Точка отбора			
		V-00	V-00-1	V-DO-12	V-DO-22
Класс	Actinobacteria	4,2	5,8	1,1	1,1
	Bacteroidia	8,4	9,2	7,8	3,3
	Desulfobacteria	2,6	0,9	2,9	1,6
	Desulfobulbia	2,2	1,6	2,6	1,3
	Alphaproteobacteria	5,3	8,7	4,9	3,2
	Gammaproteobacteria	20,7	21,5	15,4	13,4
Порядок	Micrococcales	3,5	5,0	0,3	0,9
	Flavobacteriales	4,5	5,4	1,4	1,2
	Desulfobacteriales	2,5	0,9	2,9	1,2
	Desulfobulbales	2,2	1,6	2,6	1,3
	Rhodobacteriales	2,3	1,8	2,6	1,0
	Burkholderiales	15,9	10,1	12,3	10,8
Семейство	Microbacteriaceae	3,1	3,78	0,3	0,5
	Flavobacteriaceae	4,4	4,5	1,4	1,1
	Desulfobacteriaceae	2,1	0,9	1,9	0,2
	Desulfocapsaceae	2,2	1,6	2,5	0,8
	Rhodobacteriaceae	2,3	1,8	2,6	1,0
	Comamonadaceae	8,6	5,6	4,6	6,3
Род	<i>Microbacterium</i>	0,4	1,0	0,1	0,1
	<i>Flavobacterium</i>	2,9	0,7	0,7	0,1
	<i>Lutibacter</i>	1,0	2,4	0,2	0,7
	<i>Desulfobacterium</i>	1,9	0,3	0,2	0,05
	<i>Desulfocapsa</i>	0,1	0,2	0,2	0,1
	Не классиф. до рода	2,3	1,8	2,6	1,0
	<i>Hydrogenophaga</i>	0,4	1,6	0,5	2,0

(0,04%), известного большим количеством описанных нефтедеструктирующих штаммов [24, 25]. Анализ распространения родов семейства Flavobacteriaceae показал, что род *Flavobacterium* наиболее представлен в сообществе истока реки Каменка, тогда как род *Lutibacter* имеет наибольшую долю в сообществе, отобранном на 10–15 м ниже истока.

Среди сульфатовосстанавливающих представителей микробиоценоза во всех исследованных сообществах преобладали рода *Desulfobacterium* и *Desulfocapsa* (таблица). Как было указано выше, река Каменка протекает по Кокуйскому месторождению, для которого характерны карстовые процессы в подлежащих породах. В процессе восходящего движения нефтезагрязненные глубинные воды проходят от каменноугольных карбонатов до сульфатно-карбонатного яруса, что приводит к их насыщению сульфатами [2, 3]. Таким образом, выходя на поверхность, подземные воды несут субстрат для жизнедеятельности сульфатовосстанавливающих бактерий.

Доминирующий филум Proteobacteria во всех исследованных сообществах представлен двумя классами: Alphaproteobacteria и Gammaproteobacteria (таблица). Известно, что представители класса Gammaproteobacteria широко распространены в биоценозах, испытывающих негативную нефтяную нагрузку [7, 11, 18]. Доминирующую позицию среди представителей данного класса занимает род *Hydrogenophaga* (таблица) на долю которого

приходится 0,4–2,0% ASV в сообществах донных отложений реки Каменка. Ранее представители рода *Hydrogenophaga* были описаны в составе микробных сообществ, выделенных из нефтезагрязненных осадков морей [7]. Интересно отметить, что представители рода *Pseudomonas*, к которому принадлежит значительное количество описанных штаммов-нефтедеструкторов, выявлены только в составе микробного сообщества донных отложений точки V-00-1 (0,1%), характеризующейся высокой концентрацией нефтяных углеводородов [26].

Таким образом, в результате проведенного исследования впервые описаны на молекулярно-генетическом уровне микробные сообщества нефтезагрязненных донных отложений реки Каменка, протекающей по территории Кокуйского газонефтяного месторождения. Выявлено присутствие доменов Bacteria и Archaea, доминантным является филум Proteobacteria. В значительной мере представлены филумы сульфатовосстанавливающих бактерий, что обусловлено проникновением в русло реки подземных вод, проходящих через сульфатно-карбонатный ярус.

Исследования выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №20-45-596018; конкурс РФФИ р_НОЦ_Пермский край). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnston J.E., Lim E., Roh H. Impact of upstream oil extraction and environmental public health: a review of the evidence // Sci. Total Environ. 2019. Vol. 657. P. 187–199.
2. Костарев С.М. Формирование техногенных скоплений компонентов глубинных флюидов в приповерхностных массивах горных пород (на примере районов нефтедобычи Пермской области) // Известия ВУЗов. Нефть и газ. 2004. № 5. С. 132–143.
3. Костарев С.М., Бачурин Б.А., Одинцова Т.А. Методические проблемы оценки нефтяного загрязнения подземных вод // Нефтепромышленное дело. 2016. № 12. С. 52–56.
4. Rodríguez-Urue M.L., Peña-Cabria J.J., Rivera-Cruz M.C., Delano-Frier J.P. Native bacteria isolated from weathered petroleum oil-contaminated soils in Tabasco, Mexico, accelerate the degradation petroleum hydrocarbons in saline soil microcosms // Env. Tech. Innov. 2021. Vol. 23: 101781.
5. Kingston P. Long-term environmental impact of oil spills // Spill. Sci. Technol. Bull. 2002. Vol. 7. N 1–2. P. 53–61.
6. Fahrenfeld N.L., Reyes H.D., Eramo A., Akob D.M., Mumford A.C., Cozzarelli I.M. Shifts in microbial community structure and function in surface waters impacted by unconventional oil and gas wastewater revealed by metagenomics // Sci. Total Environ. 2016. Vol. 580. P. 1205–1213.
7. Avona A., Capadici M., Trapani D.Di., Giustra M.G., Lucchina P.G., Lumia L., Di Bella G., Rossetti S., Tonazi B., Viviani G. Hydrocarbons removal from real marine sediments: Analysis of degradation pathways and microbial community development during // Sci. Total Environ. 2022. Vol. 838: 156458.
8. Shaoping K., Zhiwewi D., Bingchen W., Huihui W., Jialiang L., Hongbo S. Changes of sensitive microbial community in oil polluted soil in the coastal area in Shandong, China for ecorestoration // Ecotox. Environ. Saf. 2021. Vol. 207: 111551.
9. Khan M.A.I., Biswas B., Smith E., Mahmud S.A., Hasan N.A., Khan M.A.W., Naidu R., Megharaj M. Microbial diversity changes with rhizosphere and hydrocarbons in contrasting soils // Ecotox. Environ. Saf. 2018. Vol. 156. P. 434–442.
10. Liu Q., Tang J., Gao K., Gurav R., Giesy J.P. Aerobic degradation of crude oil by microorganisms in soils from four geographic regions of China // Sci. Rep. 2017. Vol. 7: 14856.
11. Huang L., Te J., Jiang K., Wang Y., Li Y. Oil contamination drives the transformation of soil microbial communities: Co-occurrence pattern, metabolic enzymes

and culturable // *Ecotox. Environ. Saf.* 2021. Vol. 225: 112740.

12. Зырин Н.Г., Орлов Д.С. Физико-химические методы исследования почв. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1964. 348 с.

13. Bates S.T., Berg-Lyons J.G., Caporaso W.A., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // *ISME J.* 2010. Vol. 5. N 5. P. 908–917.

14. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nat. Methods.* 2016. Vol. 13. N 7. P. 581–583.

15. McMurdie P.J., Holmes S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. N 4: e61217

16. Wright E.S. Using DECIPHER v2.0 to Analyze big biological sequence data in R // *R J.* 2016. Vol. 8. N. 1. P. 352–359.

17. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et. al. QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data // *Nat. Methods.* 2010. Vol. 7. N 5. P. 335–336.

18. King G.M., Kostka J.E., Hazen T.C., Sobecky P.A. Microbial responses to the deepwater horizon oil spill: from coastal wetlands to the deep sea // *Ann. Rev. Mar. Sci.* 2015. Vol. 7. P. 377–401.

19. Cabello-Yeves P.J., Callieri C., Picazo A., Mehrshad M., Haro-Moreno J.M., Roda-Garcia J.J., Dzhebekova N., Slabakova V., Slabakova N., Moncheva S., Rodriguez-Valera F. The microbiome of the Black Sea water column analyzed by shotgun and genome centric metagenomics // *Environ. Microbiol.* 2021. Vol. 16: 5.

20. Schwab L., Popp D., Nowack G., Bombach P., Vogt C., Richnow H.H. Structural analysis of microbiomes

from salt caverns used for underground gas storage // *Int. J. Hydrogen Energy.* 2022. Vol. 47. N 47. P. 20684–20694.

21. Gillan D.C., Danis B. The archaeobacterial communities in Antarctic bathypelagic sediments // *Deep-Sea Res. II.* 2007. Vol. 54. N 16–17. P. 1682–1690.

22. Ganesan M., Mani R., Sai S., Kasivelu G., Awasthi M.K., Rajagopal R., Azelee N.I.W., Selvi P.K., Chang S.W., Ravindra B. Bioremediation by oil degrading marine bacteria: An overview of supplements and pathways in key processes // *Chemosphere.* 2022. Vol. 303: 134956.

23. Hou Y., Li S., Dong W., Yuan Y., Wang Y., Shen W., Li J., Cui Z. Community structure of a propanil-degrading consortium and the metabolic pathway of *Microbacterium* sp. Strain T4-7 // *Int. Biodeter. Biodegrad.* 2015. Vol. 105. P. 80–89.

24. Iminova L., Delean Y., Frantsuzova E., Bogun A., Zvonarev A., Suzina N., Anbumani S., Solyanikova I. Physiological and biochemical characterization and genome analysis of *Rhodococcus qingshengii* strain 7B capable of crude oil degradation and plant stimulation // *Biotech. Rep.* 2022. Vol. 35: e00741.

25. Petrikov K., Delean Y., Surin A., Ponamoreva O., Puntus I., Filonov A., Boronin A. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: formation and structure // *Proc. Biochem.* 2013. Vol. 48. N 5–6. P. 931–935.

26. Ma Y., Wang L., Shao Z. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer // *Environ. Microbiol.* 2006. Vol. 8. N 3. P. 455–465.

Поступила в редакцию 21.07.2022

После доработки 30.01.2023

Принята в печать 12.02.2023

RESEARCH ARTICLE

Composition of bacterial communities in oil-contaminated bottom sediments of the Kamenka River

D.O. Egorova*, P.Y. Sannikov, Y.V. Khotyanovskaya, S.A. Buzmakov

Department of Biogeocenology and Nature Protection, Perm State National Research University,
Bukireva st., 15 Perm, 614068, Russia

*e-mail: daryao@rambler.ru

The Kamenka River flows through the territory of the Kokuyskoye gas and oil field located in the Perm Territory. Despite the absence of oil-producing facilities in the immediate vicinity of the river, oil hydrocarbons were found in the waters and bottom sediments at a concentration of 2445–25800 mg/kg. The composition of microbial communities of bottom sediments of the Kamenka River, located at the source and along the river, was studied. Using the methods of high-performance sequencing and bioinformatic data processing, it was established that the main share of microbial communities is represented by bacteria of the phylum Proteobacteria (16.7–30.3%), as well as the phyla Actinobacteriota, Bacteroidota, Bdellovibrionota, Campilobacterota, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deferribacterota, Desulfobacterota, Firmicutes, Gemmatimonadota, Methyloirabiolota, Myxococcota, Nitrospirota, Patescibacteria, Planctomycetota, Spirochaetota, Synergistota, Thermotofota and Verrucomicrobiota. The values of the Shannon index for the studied communities are directly correlated with the concentration of petroleum hydrocarbons in bottom sediments. The phylum Proteobacteria in

all communities is represented by the classes Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria, among which representatives of the families Rhodobacteriaceae and Comamonadaceae dominate. When identifying to the genus, it was found that in the Comamonadaceae family, the main share is made up of bacteria of the genus *Hydrogenophaga*. It should be noted that bacteria of the genus *Pseudomonas* (class Gammaproteobacteria) were found only in the microbiocenosis of bottom sediments, characterized by the highest concentration of petroleum hydrocarbons.

Keywords: *bacteria, oil pollution, bottom sediments, microbial community, high throughput sequencing*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 20-45-596018 (RFBR competition r_NOTs_Perm region).

Сведения об авторах

Егорова Дарья Олеговна — докт. биол. наук, доц., доц. кафедры биогеоценологии и охраны природы географического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета. Тел.: 8-342-280-77-00; e-mail: daryao@rambler.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8018-4687>

Санников Павел Юрьевич — канд. геогр. наук, доц. кафедры биогеоценологии и охраны природы географического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета. Тел. 8-342-239-64-87; e-mail: sol1430@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7973-301X>

Хотяновская Юлия Владимировна — ст. преп. кафедры биогеоценологии и охраны природы географического факультета, инж. лаборатории экологии и охраны природы Пермского государственного национального исследовательского университета. Тел.: 8-342-239-63-93; e-mail: 79082412863@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7172-778X>

Бузмаков Сергей Алексеевич — докт. географ. наук, проф., зав. кафедрой биогеоценологии и охраны природы географического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета. Тел.: 8-342-239-63-93; e-mail: lep@psu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5144-0714>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 582.28+582.273

**Микобиота красной водоросли *Palmaria palmata*
в Кандалакшском заливе Белого моря****М.И. Коваленко¹, М.Л. Георгиева^{1, 2} , В.В. Козловский³, И.А. Максимова⁴ ,
А.В. Качалкин^{4, 5} , Е.Н. Бубнова^{6, *} **¹Кафедра микологии и альгологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Россия, 119021, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1;³Центр морских исследований, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, вл. 1, стр. 77, Научный парк МГУ, офис 402;⁴Кафедра биологии почв, факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;⁵Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН, Россия, 142290, г. Пушкино, пр. Науки, д. 5;⁶Беломорская биостанция имени Н.А. Перцова, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12*e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru

Проведено исследование разнообразия микромицетов, ассоциированных с живыми талломами съедобной красной водоросли *Palmaria palmata* (дульс) в Белом море. Образцы отбирали в Кандалакшском заливе, на верхней (10 талломов на литорали) и нижней (10 талломов в сублиторали) границах распространения вида. Работу проводили культуральными методами, грибы выделяли с поверхности талломов. С одного образца водоросли выделялось от 0 до 55 колоний; максимальное число морфотипов — 24. Общее разнообразие составило 52 морфотипа, из которых 48 мицелиальных и 4 дрожжевых. Все идентифицированные дрожжи относятся к отделу Basidiomycota; среди мицелиальных грибов 2 вида принадлежат к отделу Mucoromycota, остальные — к отделу Ascomycota, абсолютное большинство из которых — анаморфы. Наиболее разнообразными были представители родов *Acremonium* (10 морфотипов), *Penicillium* (9) и *Cladosporium* (6); самыми многочисленными — *Acremonium* (158 колоний) и *Cladosporium* (103). *Acremonium fuci* — вид, наиболее широко представленный на исследованных талломах (122 колонии на 15 талломах). Важнейшим фактором для формирования поверхностной микобиоты *P. palmata* является местообитание: литоральные и сублиторальные популяции водоросли существенно различаются по численности и структуре сообществ грибов. Талломы литоральной популяции значительно богаче грибами, здесь преобладают темноокрашенные виды, *Acremonium fuci* и *Sarocladium strictum*. В микобиоте сублиторальных образцов — светлоокрашенные виды, отсюда же выделено большинство дрожжей.

Ключевые слова: морские грибы, водоросли-макрофиты, Rhodophyta, *Palmaria*, дульс, Белое море

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-1-4

Водоросли-макрофиты — важнейшие продуценты в прибрежных экосистемах мирового океана [1, 2]. Многие из них используются человеком в пищу, в промышленности и в сельском хозяйстве [2]. Грибы, ассоциированные с живыми талломами водорослей — это неоднородная экологическая группа, куда входят сапротрофы, мутуалисты и патогены [1]. Согласно имеющимся данным, на водорослях можно обнаружить около 80 видов облигатных [1] и несколько меньшее чис-

ло видов факультативных морских грибов [3–5]. Молекулярные исследования также показывают высокое разнообразие грибов, связанных с талломами водорослей [6–8]. Есть сведения, что талломы водорослей-макрофитов могут содержать микотоксины в высоких концентрациях [9], что также является признаком присутствия грибов. Грибы, связанные с водорослями (по англоязычной терминологии — algalicolous fungi), могут быть как эндофитными, так и эпифитными. Эндофитами

считают грибы, живущие в коровом и внутренних слоях таллома [1], а эпифитами — грибы, обитающие на поверхности и в слизистом чехле хозяина [4]. Живые талломы водорослей выделяют большое количество полисахаридной слизи и активных веществ [1, 2]. Эта слизь создает на поверхности талломов специфическую среду, в которой поселяются микроорганизмы, образуя уникальные многокомпонентные сообщества. В большей степени тема биопленок на поверхности макрофитов исследована микробиологами [10, 11]. Но имеющиеся данные по грибам свидетельствуют о том, что поверхность водорослей — привычное для них местообитание [3, 4, 11–13], и они также могут участвовать в образовании поверхностных биопленок на макрофитах.

Palmaria palmata (L.) F. Weber & D. Mohr — красная водоросль (Rhodophyta, Florideophyceae, Palmariales, Palmariaceae), широко распространенная в холодных водах северной и северо-восточной Атлантики [14]. Она обитает от нижней литорали до глубины около 20 м, в основном как эпифит на талломах крупных бурых водорослей. Талломы пальмарии, с продолжительностью жизни 2–4 г., до 50 см высотой, пластинчатые, состоят из частей разного возраста: в основании более старые, полуразрушенные лопасти предыдущих лет, на них — более молодые, ежегодно возникающие ответвления, называемые также пролификациями [15]. В Северной Америке и в Европе этот вид является самым массовым пищевым макрофитом (бытовое англоязычное название — *dulse*), в некоторых районах ее культивируют, а также используют как удобрение в сельском хозяйстве [14, 15]; известны попытки применения ее в ремедиации загрязненных вод [16]. В связи с важностью пальмарии не только в природных сообществах, но и в народном хозяйстве, ее биология довольно подробно исследована [15, 17, 18]. Проводились исследования микробиома этой водоросли [19]. В то же время о микобиоте пальмарии сведения крайне скудны. Известно о двух находках паразитических грибов на ней у французского побережья Атлантического океана [20]: это *Chadefaudia marina* Feldm.-Maz. и *Didymella magnei* Feldmann. Еще одна работа была посвящена эндофитным грибам различных водорослей у атлантического побережья Канады. Здесь была обнаружена очень высокая заселенность талломов *Palmaria palmata* грибами (87,4% фрагментов, что в 4 раза выше среднего по всем исследованным видам). Были выделены представители 9 морфотипов, среди которых 3 вида из рода *Penicillium*, представители родов *Hypoxylon*, *Helicomycetes* и *Botrytis*, а также 3 морфотипа стерильных мицелиев [21, 22]. В 1920-х гг. на образцах пальмарии с литорали острова Кильдин в Баренцевом море были обнаружены красные дрожжи [23]. А при исследовании численности дрожжей на поверхности

различных водорослей у атлантического побережья США было показано, что на талломах пальмарии, как и на других красных водорослях, она изменяется в разные сезоны и может колебаться от 4 до 8600 клеток/г [12]. Этим сведения о грибах, ассоциированных с талломами *Palmaria palmata*, к настоящему времени исчерпываются.

С учетом природной и хозяйственной значимости пальмарии, а также потенциальной важности и слабой изученности ее микобиоты, целью настоящей работы было исследование разнообразия грибов, ассоциированных с *Palmaria palmata* в Белом море. В задачи исследования входило: выявление наличия грибов и определение их таксономического состава на разных частях таллома водоросли; сравнительная характеристика комплексов грибов на старых и молодых участках таллома; сравнительная характеристика комплексов грибов на талломах литоральных и сублиторальных популяций водоросли.

Материалы и методы

Материалами нашего исследования послужили талломы *P. palmata* (рис. 1), собранные в августе 2018 г. в окрестностях Беломорской биостанции имени Н.А. Перцова в Кандалакшском заливе Белого моря (66°34' с.ш., 33°08' в.д.). Мы выбрали две площадки сбора талломов: у верхней границы распространения водоросли на средней литорали и у нижней границы в этом районе — в сублиторали, на глубине около 5,5 метров. Площадки располагались на одной линии, перпендикулярной урезу воды, на расстоянии около 200 м друг от друга. Сбор талломов литоральной популяции производили во время отлива. Здесь пальмария представлена эпифитами на талломах бурых фукоидов *Fucus distichus* L. и *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis. Сбор талломов сублиторальной популяции осуществляли при водолазном погружении. В этом экотопе пальмария являлась эпифитом на талломах ламинариевых водорослей *Saccharina latissima* (L.) C.E. Lane, C. Meyers, Druehl & G.W. Saunders и *Laminaria digitata* (Hudson) J.V. Lamouroux. Всего было отобрано по 10 талломов на каждой площадке, на расстоянии 1–3 м друг от друга. Каждый отобранный таллом помещали в индивидуальный стерильный полиэтиленовый пакет и до обработки хранили в холодильнике при 6°C.

Не позднее, чем через 5 сут после сбора, производили первичный посев. Для него использовали агаризованные среды на основе природной беломорской воды соленостью 26‰: овсяный агар, сусло-агар (общее содержание сахаров 0,15%) и оригинальный пальмарный агар (свежие нарезанные талломы *P. palmata*, взятые из расчета 56 грамм на 1 л среды, промывали проточной водой, кипятили в природной морской воде 10 мин, после чего остужали, фильтровали через ватно-марлевый фильтр, и доводили до конечного объе-

ма дистиллированной водой; добавляли 0,4 г дрожжевого экстракта и 15 г агара на 1 л среды). Для подавления роста бактерий в среды добавляли комплексный антибиотик оксациллин + ампициллин, (133,4 мг + 66,6 мг) / 0,5 л среды, или гентамицин, 40 мг / 0,5 л среды. Перед посевом каждый образец промывали под проточной водой от крупных загрязнений, после чего еще раз промывали стерильной морской водой. Затем стерильным скальпелем отделяли старые разрушающиеся части таллома от молодых пролификаций (рис. 1) и каждую из этих групп разделяли на две равные части. Из каждой группы этих фрагментов половина шла на посев поверхностной микобиоты, другую половину подвергали поверхностной стерилизации по модифицированной нами методике, использованной ранее для работы с бурыми водорослями [4]. Модификация состояла в уменьшении времени инкубации в стерилизующих растворах в связи с тем, что талломы пальмарии значительно более тонкие и нежные, чем талломы исследованных ранее фукоидов. Все фрагменты, приготовленные для посева, стерильно нарезали на кусочки площадью 1 см² и раскладывали на поверхность среды в чашки Петри, по 3–4 фрагмента на чашку. Для каждого варианта было использовано по 4 чашки для посева (1 – сусло-агар, 1 – овсяной агар, 2 – пальмария-агар). Кроме посева талломов были также сделаны контрольные посевы воды и воздуха на участке отбора образцов. Все посевы инкубировали в течение 1 мес. при температуре 6°C. После инкубации выделяли чистые культуры для дальнейшей идентификации. Мицелиальные грибы идентифицировали только по морфолого-культуральным критериям [7, 20, 24–26]. Для идентификации

дрожжевых грибов использовали данные секвенирования ITS-региона рДНК. Методика выделения ДНК и проведения полимеразной цепной реакции опубликованы ранее [27]. Для секвенирования был использован праймер ITS5, секвенирование осуществлялось в ЗАО «Евроген» (Москва, Россия). Идентификацию дрожжей на основании полученных результатов секвенирования проводили, используя данные генбанка NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и базы данных MycoID (www.mycobank.org). Синонимию и таксономическое положение всех идентифицированных таксонов сверяли по базе MYCOBANK (<https://www.mycobank.org>).

Использовали понятие обилия видов как отношение числа колоний данной группы к общему числу колоний в варианте, выраженное в процентах. Для определения различия видового состава различных вариантов рассчитывали индексы Сьеренсена-Чекановского и Брея-Кертиса. Видовое разнообразие различных вариантов оценивали по индексу Шеннона. Для исследования структуры и характера взаимосвязей, существующих между исследуемыми вариантами, применяли многомерное шкалирование (Multidimensional Scaling). Мы приняли два набора вариантов: 1) по признаку локализации: образцы литорали / образцы сублиторали; 2) по признаку возраста: образцы старых частей таллома / образцы молодых частей таллома. Для проверки правильности группировки вариантов была проведена процедура проверки неслучайности группировки объектов (ANOSIM – Analysis of Similarities: группировка считается неслучайной при значимости ниже 5%). Для всех расчетов использовали пакеты MS Excel 2007 (Microsoft™) и PRIMER v6 (Primer™, 2001).

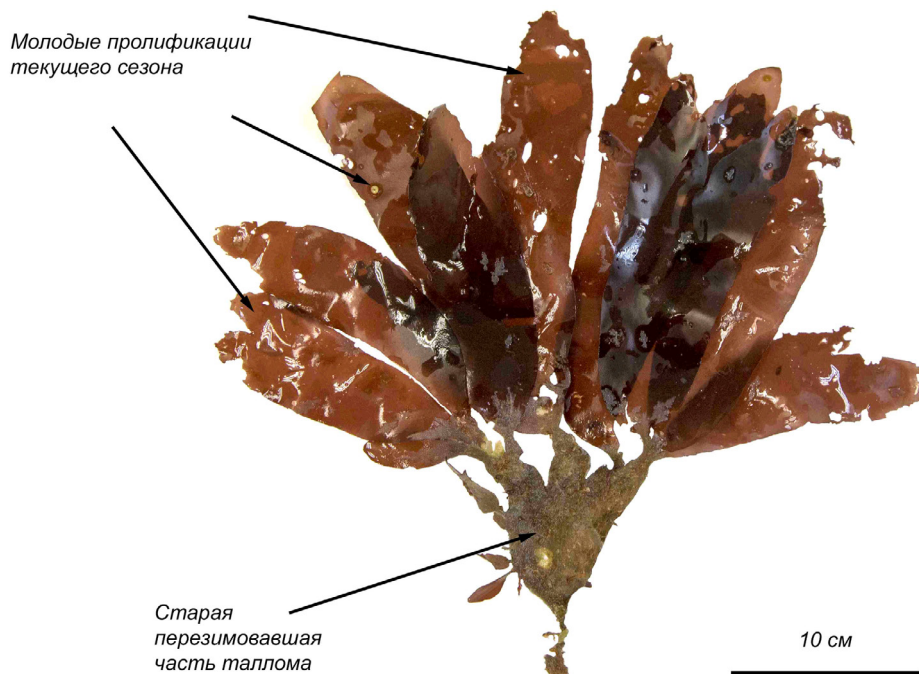


Рис. 1. Внешний вид таллома *Palmaria palmata*.

Результаты и обсуждение

Сразу отметим, что попытки выделить эндофитные грибы из талломов пальмарины не увенчались успехом. Причиной этого может служить как их отсутствие или слишком большая редкость в наших образцах, так и недостатки методики стерилизации. В любом случае, это требует отдельного исследования, а дальнейшее изложение связано только с поверхностной микобиотой данной водоросли. Кроме того, не удалось выявить особенностей микокомплексов, выделявшихся на разных средах, поэтому в дальнейшем мы не обсуждаем эти различия, а рассматриваем общую микобиоту по каждому варианту.

Общая характеристика микобиоты. С талломов исследуемой водоросли мы выделили и идентифицировали 320 спороносящих изолятов мицелиальных грибов и 9 изолятов дрожжей; из контрольных посевов – 65 спороносящих изолятов мицелиальных грибов и 2 изолята дрожжей (таблица). Идентифицированные дрожжи принадлежат 4 видам из 4 родов отдела Basidiomycota. 2 вида из 2 родов мицелиальных грибов относятся к отделу Mucoromycota, а все остальные – к отделу Ascomycota, из которых только один вид (*Chaetomium globosum*) образовывал плодовые тела, а все остальные – это анаморфные стадии представителей различных классов. Общее разнообразие мицелиальных грибов – 41 вид из 25 родов

Таблица

Разнообразие и численность исследованной микобиоты

Названия таксонов	T*	K	СУММ
MUCOROMYCOTA			
Mucoromycetes			
Mucorales			
Mucoraceae			
<i>Mucor racemosus</i> f. <i>sphaerosporus</i> (Hagem) Schipper	2	0	2
Umbelopsidomycetes			
Umbelopsidales			
Umbelopsidaceae			
<i>Umbelopsis ramanniana</i> (Möller) W. Gams	0	1	1
ASCOMYCOTA			
Pezizomycotina			
Dothideomycetes			
Cladosporiales			
Cladosporiaceae			
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	18	2	20
<i>Cladosporium fusiforme</i> Zalar, de Hoog & Gunde-Cimernan	1	0	1
<i>Cladosporium halotolerans</i> Zalar, de Hoog & Gunde-Cim.	3	0	3
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	22	35	57
<i>Cladosporium salinae</i> Zalar, de Hoog & Gunde-Cim.	4	3	7
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	9	6	15
Pleosporales			
Pleosporaceae			
<i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire	1	0	1
<i>Paradendryphiella arenariae</i> (Nicot) Woudenb. & Crous	10	0	10
<i>Paradendryphiella salina</i> (G.K. Sutherland) Woudenb. & Crous	14	0	14
Eurotiomycetes			
Eurotiales			
Aspergillaceae			
<i>Penicillium atramentosum</i> Thom	5	0	5
<i>Penicillium aurantiocandidum</i> Dierckx	1	0	1
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	1	0	1
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	3	0	3
<i>Penicillium cyclopium</i> Westling,	3	0	3
<i>Penicillium expansum</i> Link	3	0	3
<i>Penicillium fellutanum</i> Biourge	1	0	1
<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling	3	0	3
<i>Penicillium thomii</i> Maire	6	0	6
Chaetothyriales			
Herpotrichiellaceae			
<i>Phialophora</i> cf. <i>cyclaminis</i> J.F.H. Beyma	1	0	1
<i>Phialophora</i> sp. 1	1	0	1
Leotiomycetes			
Helotiales			

Окончание таблицы

Названия таксонов	Т*	К	СУММ
Ploetterulaceae			
<i>Cadophora fastigiata</i> Lagerb. & Melin	3	0	3
<i>Cadophora malorum</i> (Kidd & Beaumont) W. Gams	1	0	1
Sclerotiniaceae			
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	2	2	4
Thelebolales			
Pseudeurotiaceae			
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (Link) Minnis & D.L. Lindner	0	1	1
Sordariomycetes			
Hypocreales			
Chaetomiaceae			
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	2	0	2
<i>Trichocladium</i> sp.	1	0	1
Cordycipitaceae			
<i>Akanthomyces lecanii</i> (Zimm.) Spatafora, Kepler & B. Shrestha	2	0	2
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	1	0	1
<i>Cordyceps farinosa</i> (Holmsk.) Kepler, B. Shrestha & Spatafora	1	0	1
Hypocreaceae			
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i> (Link) Zare, W. Gams & Schroers	2	1	3
Glomerellales			
Plectosphaerellaceae			
<i>Verticillium chlamydosporium</i> Goddard	3	0	3
Nectriaceae			
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	1	0	1
Ophiocordycipitaceae			
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> W. Gams	3	1	4
<i>Tolypocladium inflatum</i> W. Gams	2	0	2
Sarocladiaceae			
<i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerbell	23	3	26
Hypocreales i.s.			
<i>Acremonium byssoides</i> W. Gams & G. Lim	1	0	1
<i>Acremonium charticola</i> (Lindau) W. Gams	10	0	10
<i>Acremonium minutisporum</i> (Sukapure & Thirum.) W. Gams	1	0	1
<i>Acremonium fuci</i> Summerb., Zuccaro & W. Gams	122	8	130
<i>Acremonium tubakii</i> W. Gams	4	0	4
<i>Acremonium</i> spp. 1-5	12	0	12
Saccharomycotina			
Saccharomycetes			
Saccharomycetales			
Dipodascaceae			
<i>Geotrichum candidum</i> Link	2	0	2
BASIDIOMYCOTA			
Agaricomycotina			
Tremellomycetes			
Tremellales			
Bullaribasidiaceae			
<i>Vishniacozyma foliicola</i> Q.M. Wang & F.Y. Bai ex Yurkov	1	0	1
Rhynchogastremataceae			
<i>Papiliotrema fonsecae</i> (V. de Garcia, Zalar, Brizzio, Gunde-Cim. & van Broock) Yurkov	2	0	2
Pucciniomycotina			
Cystobasidiomycetes			
Sakaguchiales			
Sakaguchiaceae			
<i>Sakaguchia dacryoidea</i> (Fell, I.L. Hunter & Tallman) Y. Yamada, K. Maeda & Mikata	5	1	6
Microbotryomycetes			
Sporidiobolales			
Sporidiobolaceae			
<i>Rhodotorula diobovata</i> (S.Y. Newell & I.L. Hunter) Q.M. Wang, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout	1	1	2

Примечание: *Т – талломы пальмари; К – контрольные посевы окружающих воды и воздуха; СУММ – общее число колоний, выделенных с талломов и из контрольных посевов.

и 7 морфотипов были идентифицированы только до уровня рода. Кроме перечисленного выше, было выделено 26 стерильных мицелиальных изолятов (20 с талломов водоросли и 6 из контрольных посевов), отнесенных нами к 12 морфотипам, что было учтено при статистической обработке, а также 51 изолят дрожжей (44 с талломов и 7 из контрольных посевов), которые нам не удалось идентифицировать. Разнообразие идентифицированных грибов представлено 2 семействами и 2 порядками из 2 классов мукоромицетов, 15 семействами и 9 порядками из 5 классов аскомицетов и 4 семействами и 3 порядками из 3 классов базидиомицетов. Наиболее разнообразно представлены классы Sordariomycetes (21 вид), Eurotiomycetes (11 видов) и Dothideomycetes (9 видов). Наиболее обильны были классы Sordariomycetes (204 изолята) и Dothideomycetes (128 изолятов). Из видов наиболее обильным и широко распространенным был *Acremonium fuci* (130 колоний в 16 образцах). Кроме того, довольно частыми и обильными были *Cladosporium herbarum* (57 колоний в 9 образцах), *Sarocladium strictum* (26 колоний в 13 образцах) и *Cladosporium cladosporioides* (20 колоний в 10 образцах). Только четыре вида известны как облигатно-морские: *Acremonium fuci*, *Cladosporium salinae*, *Paradendryphiella arenaria* и *P. salina*. Все остальные обнаруженные виды часто встречаются в морях, но также обычны и широко распространены в различных наземных экотопах, в том числе — в почвах данного района [28].

В целом, можно отметить следующее: состав и структура микобиоты поверхности исследованных водорослей и окружающей среды (контроль) различаются между собой (только 11 общих видов из 8 родов), что приводит к выводу о формировании специфических комплексов грибов в уникальном местообитании — на поверхности талломов пальмари. Это подтверждается также тем, что полученные нами результаты по микобиоте поверхности пальмари заметно отличаются от известных данных о микобиоте морских грунтов в районе исследования [20], где наиболее распространенными были виды из родов *Tolypocladium* и *Penicillium*, а также анаморфа *Pseudogymnoascus pannorum*. Кроме того, выявленная микобиота отличается от исследованных ранее в этом же районе бурых водорослей из родов *Fucus* [3], а также *Ascophyllum* и *Pelvetia* [4], на поверхности которых преобладали в основном грибы из рода *Penicillium*. Представители рода *Cladosporium* в целом были довольно обычны, хотя в меньшей степени, чем в нашей работе, а *A. fuci* вообще был редок. На фукусах обильными были представители рода *Paradendryphiella*. *Cephalosporium*-подобные анаморфы (*Acremonium* и другие) значительно чаще выделялись из внутреннего пространства *A. nodosum* после стерилизации поверхности, чем с его поверхности [4]. Подобное исследование ми-

кобиоты бурых водорослей из рода *Sargassum* на Дальнем Востоке [5] также показало отличную от полученной нами картину, где наиболее обильными, в зависимости от вида хозяина, были *Cladosporium cladosporioides* или этот же вид в комплексе с *Trichoderma viride*, *Penicillium simplicissimum*, *P. thomii* и *P. roquefortii*. Изучение эпифитных сообществ грибов на различных, в том числе — красных, водорослях у побережья Египта [13] показало преобладание во всех случаях представителей родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Аналогичные результаты были показаны и при исследовании поверхностной мико- и микробиоты красных, бурых и зеленых макрофитов у побережья Китая [11]. Сравнение с поверхностью различных водорослей, а также окружающей среды (грунтов в первую очередь) в районе исследования определенно позволяет заключить, что на поверхности красной водоросли *P. palmata* создаются условия для формирования уникальных микокомплексов.

Самый массовый из выделенных нами видов — *A. fuci* впервые был описан как эндофит бурой водоросли *Fucus serratus* [7]. Но, согласно последующим исследованиям, данный вид не является специфическим эндофитом фукусов, а широко распространен в прибрежных зонах умеренных и холодных морей и регулярно выделяется из разнообразных морских местообитаний [4]. Хотя его заметное преобладание ранее не было отмечено ни в каких экотопах. Остальные наиболее распространенные в нашем исследовании виды — *C. herbarum*, *C. cladosporioides* и *S. strictum* — хотя и распространены в наземных ценозах, но также обычны в различных морских экотопах, а в некоторых случаях могут даже преобладать [28].

С поверхности *P. palmata* было выделено относительно большое количество дрожжевых колоний. Идентифицированные нами виды ранее неоднократно обнаруживались в морской среде. Вид *Vishniacozyma foliicola*, хотя и описан на материалах с листьев растений из Китая, однако известны его многочисленные изоляты из вод Южного океана (данные коллекции CBS — CBS-KNAW culture collection). *Papiliotrema fonsecae* ранее неоднократно выделялся из морской или прибрежной среды в ЮАР, США, Германии, Португалии (данные NCBI — National Center for Biotechnological Information). Однако только вид *Sakaguchia dacryoidea* можно считать преимущественно «морским»: его описание было сделано на изолятах из вод Индийского, Тихого и Южного океанов, также известны его штаммы из Атлантики (данные коллекции CBS и NCBI). Дрожжи, обнаруженные в ходе нашего исследования на *P. palmata*, ранее не отмечались на других беломорских макрофитах (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Odonthalia dentata* и *Saccharina latissima*), что может указывать на специфичность дрожжевого населения, формирующегося на разных видах водорослей [29].

При исследовании микотоксинов, содержащихся в талломах различных водорослей Канда-лакшского залива [9], было обнаружено относительно низкое их содержание в талломах *P. palmata*. В частности, были обнаружены только три группы микотоксинов (из анализировавшихся 16) в относительно невысоких концентрациях. Наше исследование микобиоты косвенно подтверждает такие результаты. Наиболее массовый вид в нашем исследовании — *A. fuci* — не известен как токсинообразующий. В то же время, выявленные упомянутыми авторами токсины продуцируют в основном виды из родов *Alternaria*, *Penicillium* и *Aspergillus*, которые не обнаружены, или редки на исследованных нами талломах.

Влияние возраста на состав и структуру микобиоты талломов. В многолетнем талломе *Palmaria palmata* можно выделить более старые (перезимовавшие) части и более молодые, образовавшиеся в текущем сезоне (рис. 1). Старые части, как правило, выглядят деградировавшими, зачастую слабо окрашенными, они в основном мельче, чем молодые. Учитывая такую разницу во внешнем виде и состоянии разных частей таллома, мы провели проверку влияния возраста на состав и структуру микобиоты.

Ни общее количество колоний, ни количество колоний дрожжевых грибов, выделенных со старых и молодых частей талломов, не различаются принципиально. Индексы разнообразия Шеннона также довольно близки по значению и составляют 2,65 для старых частей и 2,56 — для молодых. При этом сходство между этими двумя группами довольно высоко: значение индекса Сьеренсена-Чекановского составило 69%. Применение многомерного шкалирования (MDS) не дало четкой картины разделения вариантов по фактору возраста. В соответствии с процедурой ANOSIM значение фактора возраста части таллома не подтверждается (уровень значимости 29,2%). При этом мы можем отметить некоторые особенности структуры микобиоты старых и молодых частей талломов. На молодых краевых зонах и пролификациях преобладают виды рода *Acremonium* и подобные, особенно *A. fuci* (38%), *S. strictum* (8%) и *A. charticola* (5%). Кроме того, относительно высокое обилие у видов из родов *Cladosporium* (18%) и *Penicillium* (7%). В микобиоте старых частей высока доля *A. fuci* (38%) и *S. strictum* (8%), а также представителей рода *Penicillium* (10%). Однако в этом случае выше обилие темноокрашенных грибов (30%), в частности — видов из рода *Paradendryphiella* (11%). Наряду с общими чертами (высокое обилие *Cephalosporium*-подобных грибов), можно также отметить и некоторые различия (более высокая доля *Paradendryphiella* и других темноокрашенных, а также *Penicillium* на старых частях талломов) в поверхностной микобиоте талломов пальмарины разного возраста.

Влияние местообитания на состав и структуру микобиоты. Как мы уже отмечали, водоросль *Palmaria palmata* интересна тем, что обитает от средней литорали до сублиторали. На границах обитания создаются принципиально различные условия: на верхней границе распространения — регулярная смена периодов осушения и затопления, на нижней — постоянное существование в водной среде. Учитывая такую разницу в условиях существования особей этой водоросли, мы провели проверку влияния местообитания на состав и структуру микобиоты.

В данном случае сразу обращает на себя внимание различие в численности выделенных грибов. С поверхностей талломов литоральной популяции *P. palmata* было выделено примерно в пять раз больше колоний мицелиальных грибов, чем с поверхности сублиторальной. С дрожжевыми грибами ситуация обратная: заселенность сублиторальной популяции примерно в пять раз выше, чем литоральной. Индексы разнообразия при этом были довольно высокими в обоих случаях: немного выше для литоральных образцов (2,69), чем для сублиторальных (2,33). Индекс сходства Сьеренсена между литоральными и сублиторальными образцами низок, составляет всего 26%. Диаграмма многомерного шкалирования (рис. 2) наглядно демонстрирует группировку образцов литорали отдельно от образцов сублиторали; точка, соответствующая воде с литорали, находится между точками образцов с литорали и сублиторали; точка, соответствующая воде с сублиторали, находится рядом с точками образцов с сублиторали; точка, соответствующая контролю воздуха, располагается отдельно. Таким образом, фактор локализации оказался важен не только для талло-мов водоросли, но и для окружающей воды. В соответствии с процедурой ANOSIM значение фактора локализации очень хорошо подтверждается (уровень значимости 0,1%). В микобиоте литоральных образцов преобладают виды рода *Acremonium* и подобные им — 53% общего числа изолятов. Из них наиболее многочисленны *A. fuci* (38%) и *S. strictum* (6%). Далее по обилию идет род *Cladosporium* (17,5%), представленный здесь всеми обнаруженными видами. Интересно, что из всех образцов с литорали наиболее обильным и частым представителем рода *Cladosporium* был *C. herbarum*, также наиболее обильный в контроле воздуха. Видимо, в формировании микобиоты литоральной популяции пальмарины участвуют пропагулы, переносимые не только водой, но также и воздухом. Облигатные морские *Paradendryphiella* spp. демонстрируют здесь такое же обилие, как обычные почвенные *Penicillium* (7%). Остальные виды представлены единичными колониями. В сублиторальных образцах также наиболее обильны *A. fuci* (28%) и *S. strictum* (14%). Несколько меньший, но также заметный вклад вносят

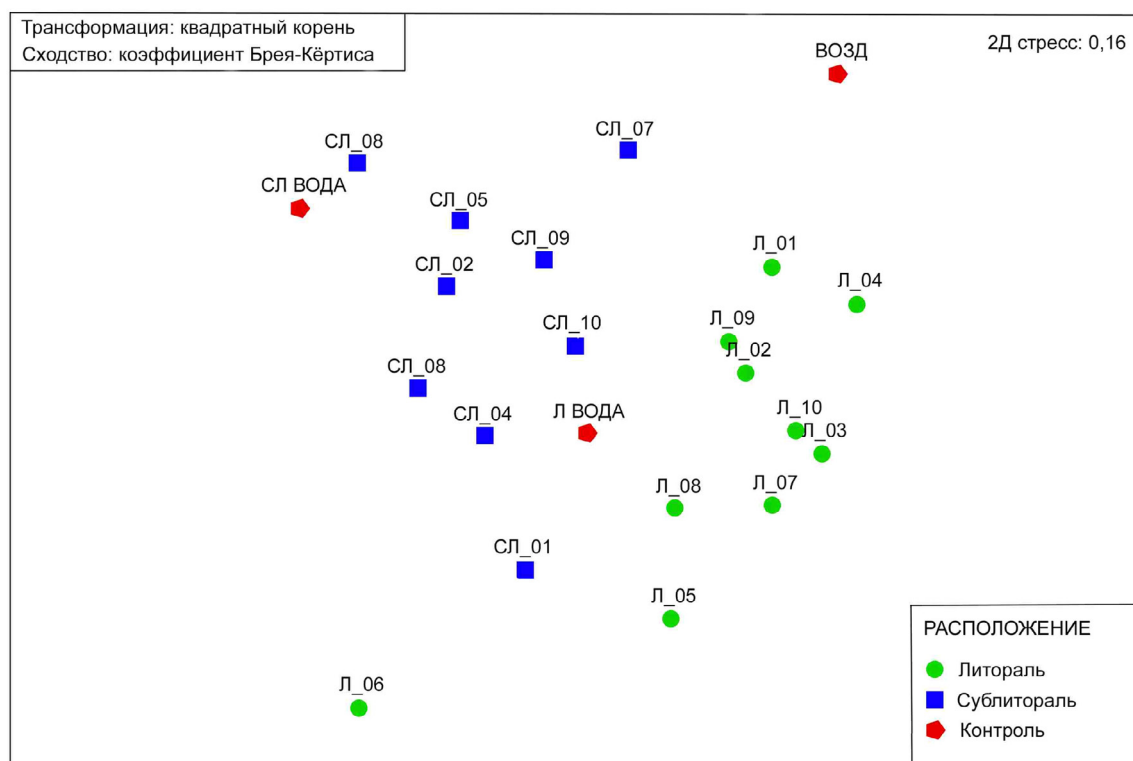


Рис. 2. Диаграмма многомерного шкалирования (MDS) для исследованных вариантов по признаку местообитания. Пояснения. Л_01-Л_10 – образцы с литорали; СЛ_01-СЛ_10 – образцы с сублиторали; Л ВОДА – вода литорали (контроль); СЛ ВОДА – вода сублиторали (контроль); ВОЗД – воздух (контроль).

темноокрашенные виды: *C. cladosporioides* (8%), *C. herbarum* (4%) и *Paradendryphiella* spp. (8%). Общее обилие стерильных изолятов в образцах сублиторали почти в 10 раз выше (24%), чем в образцах с литорали.

Итак, впервые в Белом море мы изучили микобиоту поверхности талломов широко распространенной в холодноводных морях съедобной красной водоросли *Palmaria palmata*. Мы обнаружили, что поверхность этой водоросли – уникальное в своем роде местообитание, где формируются специфические сообщества грибов. При этом состав поверхностной микобиоты заметно различается у пальмариий, обитающих на верхней (на литорали) и нижней (в сублиторали) границах распространения вида. Наиболее обильным и распространенным в исследованных нами образцах оказался вид *Acremonium fuci*, описанный как эндофит бурой водоросли *Fucus serratus*, но, как показали дальнейшие исследования, широко распространенный в различных местообитаниях холодноводных морей, хотя и не известный ранее как преобладающий в каких-либо из них. Кроме того, на поверхности исследованной водоросли обычны такие темноокрашенные грибы, как представители родов *Cladosporium* и *Paradendryphiella*. Они являются обычными морскими обитателями, хотя и не всегда настолько обильны. В то же время, на талломах пальмарии обнаружено мало

представителей рода *Penicillium* и *Pseudogymnoascus* и вообще не обнаружено видов из родов *Tolypocladium* и *Trichoderma*, которые, хотя и являются наиболее распространенными в почвах холодных регионов, также обычны в различных экотопях Белого моря. Таким образом, микобиота, формирующаяся на поверхности *Palmaria palmata* – специфична и отличается от микобиоты, известной для поверхности других водорослей и внешней среды в данном районе.

Идентификация мицелиальных грибов, а также статистическая обработка результатов поддержаны Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-15-2021-1396). Идентификация дрожжей выполнена в рамках темы государственного задания №121040800174-6 «Почвенные микробиомы: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал», а также в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raghukumar S. Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems. Germany: Springer, 2017. 378 pp.
2. Satheesh S., Siddik A.A., Ba-Akdah M.A., Al-Sofyani A.A. An introduction to the ecological significance of seaweeds on coastal ecosystems // Biotechnological applications of seaweeds / Ed. E. Nabti. N.Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2017. P. 1–14.
3. Бубнова Е.Н., Киреев Я.В. Сообщества грибов на талломах бурых водорослей рода *Fucus* в Кандалакшском заливе Белого моря // Микол. фитопатол. 2009. Т. 43. № 5. С. 20–29.
4. Коновалова О.П., Бубнова Е.Н. Микобиота бурых водорослей *Ascophyllum nodosum* и *Pelvetia canaliculata* (Phaeophyceae, Fucales) в Кандалакшском заливе Белого моря // Микол. фитопатол. 2011. Т. 45. № 3. С. 240–248.
5. Киричук Н.Н., Пивкин М.В. Вторичные морские грибы, ассоциированные с бурыми водорослями рода *Sargassum* залива Петра Великого (Японское море) // Микол. фитопатол. 2015. Т. 49. № 3. С. 146–150.
6. Zuccaro A., Schulz B., Mitchell J.I. Molecular detection of ascomycetes associated with *Fucus serratus* // Mycol. Res. 2003. Vol. 107. N 12. P. 1451–1466.
7. Zuccaro A., Sammerbell R.C., Gams W., Schroers J.I., Mitchell L.I. A new *Acremonium* species associated with *Fucus* spp., and its affinity with a phylogenetically distinct marine *Emericellopsis* clade // Stud. Mycol. 2004. Vol. 50. N 2. P. 283–297.
8. Zuccaro A., Schoch C.L., Spatafora J.W., Kohlmeyer J., Draeger S., Mitchell J.I. Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus* // Appl. Environ. Microbiol. 2008. Vol. 74. N 4. P. 931–941.
9. Kononenko G.P., Burkin A.A., Georgiev A.A., Georgieva M.L. Mycotoxins in macroalgae from the Velikaya Salma strait of the Kandalaksha Gulf of the White Sea // Russ. J. Mar. Biol. 2021. Vol. 47. N 1. P. 480–488.
10. Railkin A., Ganf T., Manylov O. Marine biofouling. CLC Press, 2003. 303 pp.
11. Chen J., Zang Y., Yang Z., Qu T., Sun T., Liang S., Zhu M., Wang Y., Tang X. Composition and functional diversity of epiphytic bacterial and fungal communities on marine macrophytes in an intertidal zone // Front. Microbiol. 2022. Vol. 13: 839465.
12. Seshadri R., Sieburth J.N. Cultural estimation of yeasts on seaweeds // Appl. Microbiol. 1971. Vol. 12. N 4. P. 507–512.
13. Abdel-Gawad K.M., Hifney A.F., Issa A.A. Goma A.M. Spatio-temporal, environmental factors, and host identity shape culturable-epibiotic fungi of seaweeds in the Red Sea, Egypt // Hydrobiologia. 2014. Vol. 740. N 1. P. 37–49.
14. Mouritsen O.G., Dawczynski C., Duelund L., Jahreis G., Vetter W., Schröder M. On the human consumption of the red seaweed dulse (*Palmaria palmata* (L.) Weber & Mohr) // J. Appl. Phycol. 2013. Vol. 25. N 6. P. 1777–1791.
15. Grote B. Recent developments in aquaculture of *Palmaria palmata* (L.) Weber & Mohr: cultivation and uses // Rev. Aquac. 2019. Vol. 11. N 1. P. 25–41.
16. Voskoboinikov G.M., Ryzhik I.V., Salakhov D.O., Metelkova L.O., Zhakovskaya Z.A., Lopuchanskaya E.M. Absorption and conversion of diesel fuel by the Red Alga *Palmaria palmata* (Linnaeus) F. Weber et D. Mohr, 1805 (Rhodophyta): the potential role of alga in bioremediation of sea water // Russ. J. Mar. Biol. 2020. Vol. 46. N 2. P. 113–119.
17. Lopes D., Melo T., Meneses J., Abreu M.H., Pereira R., Domingues P., Lillebo A.I., Calado R., Domingues M.R. A new look for the red macroalga *Palmaria palmata*: a seafood with polar lipids rich in EPA and with antioxidant properties // Marine Drugs. 2019. Vol. 17. N 9: 533.
18. Nishida Y., Kumagai Y., Michiba S., Yasui H., Kishimura H. Efficient extraction and antioxidant capacity of mycosporine-like amino acid from red algae dulse *Palmaria palmata* in Japan // Marine Drugs. 2020. Vol. 18. N 10: 502.
19. Moore J.E., Xu J., Millar C. Diversity of the microflora of edible macroalga *Palmaria palmata* // Food Microbiol. 2002. Vol. 19. N 2–3. P. 249–257.
20. Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. Marine mycology, the higher fungi. N.Y.: Academic Press, 1979. 691 pp.
21. Flewelling A.J., Ellsworth K.T., Sanford J., Forward E., Johnson J.A., Gray C.A. Macroalgal endophytes from the atlantic coast of Canada: a potential source of antibiotic natural products? // Microorganisms. 2013. Vol. 1. N 1. P. 175–187.
22. Flewelling A.J., Currie J., Gray C.A., Johnson J.A. Endophytes from marine algae: promising sources of novel natural products // Curr. Sci. 2015. Vol. 109. N 1. P. 88–111.
23. Nadson G.A., Burgvits G.K. Yeast of the Arctic Ocean // Doklady Akademii Nauk SSSR. 1931. N 4. P. 103–110.
24. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of the soil fungi. Acad. Press, 1980. 1070 pp.
25. Bissett J. Notes on *Tolypocladium* and related genera // Can. J. Bot. 1983. Vol. 61. N 5. P. 1311–1329.
26. Zalar P., Hoog G.S. de, Schroers H.-J., Crous P.W., Groenewald J.Z., Gunde-Cimerman N. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments // Stud. Mycol. 2007. Vol. 58. P. 157–183.
27. Glushakova A.M., Kachalkin A.V. Endophytic yeasts in *Malus domestica* and *Pyrus communis* fruits under anthropogenic impact // Microbiology. 2017. Vol. 86. N 1. P. 128–135.
28. Бубнова Е.Н., Грум-Гржимайло О.А., Козловский В.В. Состав и структура сообществ мицелиальных грибов в донных грунтах Белого моря // Вестник Моск. ун-та. Сер. 16. Биол. 2020. Т. 75. № 3. С. 182–187.
29. Kachalkin A.V. Yeasts of the White Sea intertidal zone and description of *Glaciozyma litorale* sp. nov. // Antonie van Leeuwenhoek. 2014. Vol. 105. N 6. P. 1073–1083.

Поступила в редакцию 11.11.2022

После доработки 23.01.2023

Принята в печать 04.02.2023

RESEARCH ARTICLE

Mycobiota of the red algae *Palmaria palmata* in the Kandalaksha Bay of the White SeaM.I. Kovalenko¹, M.L. Georgieva^{1, 2} , V.V. Kozlovsky³, I.A. Maximova⁴ ,
A.V. Kachalkin^{4, 5} , E.N. Bubnova^{6, *} ¹Mycology and Alogology Department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;²Gause Institute of New Antibiotics, St. Bolshaya Pirogovskaya, 11, Moscow, 119021, Russia;³Marine research center, Moscow State University, office 402, MSU Science park, Leninskie Gory 1–77, 119234, Moscow, Russia;⁴Soil Biology Department, School of Soil Sciences, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;⁵Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5, Pushchino, 142290 Moscow Region, Russia;⁶White Sea Biological Station, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
*e-mail: kattya.bubnova@wsbs-msu.ru

This is a first report about the diversity of micromycetes associated with living thalli of the edible red algae *Palmaria palmata* (dulse). We collected samples in the Kandalaksha Bay of the White Sea at upper (10 thalli in the littoral) and lower (10 thalli in the sublittoral) lines of this species distribution. The work was carried out by cultural methods, fungi were isolated from the surface of thalli. From one thallus from 0 to 55 colonies belongs to 0–24 morphotypes were isolated. The total diversity was 52 morphotypes, of which 48 were mycelia and 4 were yeast. All identified yeasts belong to Basidiomycota; among filamentous fungi, 2 species belongs to Zygomycota, and the rest belongs to Ascomycota, the vast majority of which are represented by anamorphic stages. The most diverse genera were *Acremonium* (10 morphotypes), *Penicillium* (9) and *Cladosporium* (6); the most numerous are *Acremonium* (158 colonies) and *Cladosporium* (103 colonies). *Acremonium fuci* is the most common species on the studied thalli (122 colonies on 15 thalli). The most important factor for the formation of the surface mycobiota of dulse is the habitat: littoral and sublittoral algal populations differ significantly in the fungal communities number and structure. The thalli of the littoral population are much richer in fungi. The mycobiota of littoral samples is dominated by dark-colored species, as well as *Acremonium fuci* and *Sarocladium strictum*. While the mycobiota of sublittoral samples is dominated by light-colored species, and most of the isolated yeasts were also founded here.

Keywords: marine fungi, seaweeds, Rhodophyta, *Palmaria*, dulse, White Sea

Funding: The identification of filamentous fungi, as well as the statistical processing of the results, was supported by Russian Ministry of Science and Higher Education (Grant Number 075-15-2021-1396). Yeast identification was carried out within the framework of the state task No. 121040800174-6 “Soil microbiomes: genomic diversity, functional activity, geography and biotechnological potential,” as well as within the framework of the Development Program of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Lomonosov Moscow State University “The future of the planet and global environmental changes.”

Сведения об авторах

Коваленко Мария Игоревна — бакалавр кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-64; e-mail: mi.kovalenko@mail.ru

Георгиева Марина Леонидовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ; науч. сотр. лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе. Тел.: 8-495-939-27-64; e-mail: i-marina@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7657-6474>

Козловский Владислав Владимирович — канд. биол. наук, нач. отдела экологии Центра морских исследований МГУ. Тел.: 8-495-648-65-88; e-mail: vladkst@gmail.com

Максимова Ирина Аркадьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-36-03; e-mail: maximova.irina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3030-6417>

Качалкин Алексей Владимирович — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ, вед. науч. сотр. Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН Пушкинского научного центра биологических исследований. Тел.: 8-495-939-36-03; e-mail: kachalkin_a@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4494-2468>

Бубнова Екатерина Николаевна — канд. биол. наук, науч. сотр. Беломорской биостанции имени Н.А. Перцова биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-44-95; e-mail: kattya.bubnova@wsbs-msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6921-8724>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 574.5(282.05+289)

Особенности видовой, пространственной и трофической структуры макробентоса в лагунной экосистеме Никольской губы (Кандалакшский залив, Белое море)**А.П. Столяров** *Кафедра гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12**e-mail: macrobenthos@mail.ru*

В статье рассматриваются видовой состав, а также особенности пространственной и трофической структуры макробентоса Никольской губы Белого моря. Никольская губа относится к сильно заиленным лагунным экосистемам, в ней доминирует трофическая группа собирающих детритофагов. Накопление большого количества органического вещества в осадках лагуны и ее опреснение в весенний период способствуют развитию преимущественно мелких видов детритофагов-собирателей, которые оказываются более устойчивыми к заилению и опреснению, а также к дефициту кислорода. Эти процессы особенно четко проявляются в кутовом районе губы. В лагуне было обнаружено 26 видов беспозвоночных животных и 9 видов морских трав и водорослей. Анализ полученных данных по видовому составу, разнообразию и структуре сообществ макробентоса свидетельствует о преимущественно эстуарном характере фауны лагунной экосистемы Никольской губы по сравнению с другими лагунами Белого моря, поскольку она хорошо защищена от морских волн и течений островами, лудами и коргами.

Ключевые слова: лагунная экосистема, макробентос, видовое разнообразие экосистемы, пространственное распределение видов, трофическая структура лагуны, Белое море

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-1-5

Лагунные экосистемы, как правило, представляют собой неглубокие, полужамкнутые и динамичные системы [1, 2]. Небольшой объем воды на площадь поверхности бентали, наличие обширной литорали и мелководных зон сублиторали, приливно-отливные и ветровые явления способствуют усилению обмена веществ и энергии между водной толщей и донными отложениями. Прибрежные лагуны являются продуктивными экосистемами, имеющими своеобразный видовой состав живых организмов [2–7]. К характерным чертам лагунных экосистем можно отнести их неустойчивость и изменчивость под влиянием внешних факторов, таких как гидрологический и солевой режимы водоема, различные антропогенные факторы [8–12]. В течение относительно короткого промежутка времени такие экосистемы могут менять свою форму и размеры [1].

Макробентос является важным компонентом лагунных и морских экосистем, играющим заметную роль в круговороте питательных веществ, разложении детрита, а также в качестве источника пищи для более высоких трофических уровней. Кроме того, макрозообентос является весьма чувствительным индикатором изменений в экосистеме [5, 6, 11]. В связи с этим исследования макро-

бентоса актуальны и могут прояснить некоторые вопросы формирования лагунных экосистем, тенденции изменений и сохранения этих уникальных объектов.

Цель нашей работы заключалась в изучении особенностей видовой, пространственной и трофической структуры сообществ макробентоса в одной из мелководных лагунных экосистем Белого моря.

Материалы и методы

Исследование макробентоса было проведено в лагунной экосистеме губы Никольской в июле – начале августа 2019 и 2021 гг. (рис. 1). Ранее была изучена видовая и пространственная структура сублиторальных сообществ макробентоса [3]. В настоящей работе дополнительно были взяты пробы в нижней, средней и верхней литорали. Пробы были отобраны на 28 станциях, из которых 13 расположены в сублиторали, а 15 – в литоральных местообитаниях. Пять литоральных разрезов были взяты последовательно в направлении от кутового района в сторону мористой области. Каждый разрез представлял собой три станции, соответствующие трем горизонтам литорали: нижнему, среднему и верхнему. В сублиторали 8 проб были взяты

напротив литоральных разрезов, а 9–13 — на выходе из губы.

В приливно-отливной полосе на каждой станции брали два вида проб — рамками $12,5 \times 12,5$ см и 25×25 см. Мелкие организмы, такие как *Peringia ulvae*, мелкие полихеты и олигохеты, собирали на участке $12,5 \times 12,5$ см ($1/64$ м²) до глубины 8–10 см. Организмы средних размеров учитывали под рамкой 25×25 см ($1/16$ м²) до глубины залегания плотной безжизненной глины (20–35 см). Крупных беспозвоночных, глубоко зарывающихся в грунт (*Arenicola marina* и *Mya arenaria*), учитывали по норкам на площади 1 м². На нижней литорали (а иногда и на средней) к стандартному пробоотбору добавлялся отбор в скоплениях *Mytilus edulis*. Дополнительно определяли проективное покрытие пляжа скоплениями мидии. Грунт, взятый с площади $1/64$ и $1/16$ м², аккуратно промывался на сите с ячейей 0,5 мм и 1 мм соответственно.

Сублиторальный макробентос отбирали с помощью дночерпателя Экмана-Берджи с площадью захвата 0,025 м². Грунт промывали на сите с ячейей 1 мм.

Промытые пробы просматривались прижизненно в лаборатории. Для расчета биомассы определяли сырой вес организмов.

Параллельно со сбором гидробиологического материала измеряли важнейшие параметры среды: соленость (с помощью кондуктометра) на малой (конец отлива—начало прилива) и полной воде в придонном слое (конец прилива—начало отлива), характер грунта (просеиванием через ряд сит или визуалью на четыре категории: ил, песчаный ил, илистый песок, песок), а также глубину в сублиторали лотом (конец отлива—начало прилива).

Для каждой станции были получены показатели плотности и биомассы видовых популяций, а также рассчитаны индексы видового разнообразия Шеннона [13].

Был проведен статистический анализ данных с помощью пакета прикладных программ PAST ver. 3.24 [14].

Для оценки сходства сообществ, формирующихся на разных станциях, проводили кластерный анализ по качественному составу макробентоса методом среднего присоединения на основе матриц сходства Соренсена [15]:

$$K_{X,Y} = \frac{2c}{a+b},$$

где c — число общих видов для сообществ X и Y , a — число видов, обнаруженных в сообществе X , b — число видов, обнаруженных в сообществе Y .

Для выбора приемлемой степени дробности полученных кластеров использовался критерий «значимого сходства», который рассчитывается как верхняя 95%-ная доверительная граница среднего сходства между станциями.

Результаты

Абиотические условия и характеристика районов исследования. Никольская губа находится в Кандалакшском заливе Белого моря в 5,5 км от Беломорской биологической станции МГУ ($66^{\circ}33'44''$ с.ш. и $32^{\circ}57'40''$ в.д.) и хорошо защищена от морских волн и течений островами, косами и лудами (рис. 1). Она напоминает эстуарное русло небольшой речки и характеризуется сильной заиленностью, как и другие губы этого района, например, губа Ермолинская (рис. 1).

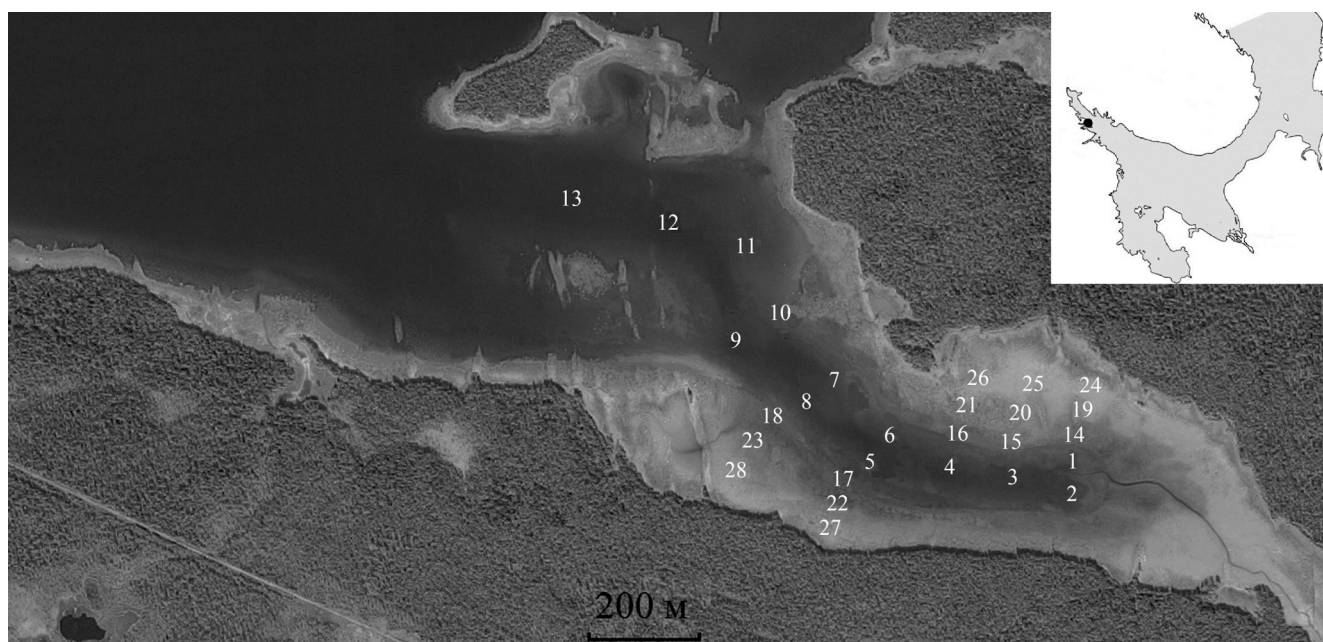


Рис. 1. Карта-схема района исследования лагунной экосистемы Никольской губы. Цифрами обозначены станции. 1–13 — сублитораль, 14–18 — нижняя литораль, 19–23 — средняя литораль, 24–28 — верхняя литораль.

Таблица 1

Список видов макробентоса, обнаруженных в лагунной экосистеме Никольской губы летом 2019 и 2021 гг.

Макробентос	Районы исследования			
	1	2	3	4
Зообентос:				
класс Polychaeta				
1. <i>Alitta virens</i> M. Sars, 1835	+	–	+	+
2. <i>Arenicola marina</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	+	–
3. <i>Harmothoe imbricata</i> (Linnaeus, 1767)	+	+	–	–
4. <i>Micronephthys minuta</i> (Theel, 1879)	+	–	–	–
5. <i>Nereimyra punctata</i> (Müller, 1788)	+	+	–	–
6. <i>Pectinaria koreni</i> (Malmgren, 1866)	+	–	–	–
7. <i>Phyllodoce maculata</i> (Linnaeus, 1767)	+	+	–	–
8. <i>Pygospio elegans</i> Claparede, 1863	–	–	+	–
9. <i>Scoloplos armiger</i> (O. F. Müller, 1776)	+	+	–	–
класс Oligochaeta				
10. <i>Paranais litoralis</i> (Müller, 1780)	–	–	+	–
11. <i>Tubificoides benedii</i> (d'Udekem, 1855)	+	+	+	+
кл. Gastropoda				
12. <i>Peringia ulvae</i> (Pennant, 1777)	+	+	+	+
13. <i>Littorina littorea</i> (Linnaeus, 1758)	–	+	+	+
14. <i>Littorina saxatilis</i> (Olivier, 1792)	–	–	+	+
15. <i>Littorina obtusata</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	+	–
класс Bivalvia				
16. <i>Macoma balthica</i> (Linnaeus, 1758)	+	+	+	+
17. <i>Mya arenaria</i> Linnaeus, 1758	–	+	+	–
18. <i>Mytilus edulis</i> Linnaeus, 1758	–	+	+	+
класс Crustacea				
19. <i>Gammarus duebeni</i> Lilljeborg, 1852	+	–	+	–
20. <i>Crassikorophium bonellii</i> (H. Milne Edwards, 1830)	–	+	–	–
класс Insecta				
21. <i>Chironomus salinarius</i> Kieffer, 1915	–	+	+	–
22. <i>Dolichopus</i> sp. Latreille, 1796	–	–	+	–
тип Nemathelminthes				
23. <i>Halicryptus spinulosus</i> von Siebold, 1849	–	+	+	–
24. <i>Priapulius caudatus</i> Lamarck, 1816	+	–	–	–
тип Nemertini				
25. <i>Amphiporus lactifloreus</i> (Johnston, 1828)	+	+	+	–
26. <i>Lineus gesserensis</i> (O. F. Müller, 1774)	+	–	–	–
Макрофиты (морские травы и водоросли):				
1. <i>Chorda tomentosa</i> Lyngbye, 1819	–	–	+	–
2. <i>Cladophora sericea</i> (Hudson) Kützinger, 1843	–	+	+	+
3. <i>Fucus vesiculosus</i> Linnaeus, 1753	–	–	+	–
4. <i>Juncus atrofuscus</i> Rupr. (1845)	–	–	+	+
5. <i>Puccinellia maritima</i> (Hudson) Parl., 1850	–	–	–	+
6. <i>Ruppia maritima</i> Linnaeus, 1753	–	+	+	–
7. <i>Salicornia pojarkovae</i> N. Semenova, 1956	–	–	+	+
8. <i>Triglochin maritimum</i> Linnaeus, 1753	–	–	–	+
9. <i>Zostera marina</i> Linnaeus, 1753	+	+	–	–

Примечание: «+» – наличие вида, «–» – вид не найден.
1 – сублитораль, 2 – нижняя литораль, 3 – средняя литораль, 4 – верхняя литораль.

Исследованная лагунная экосистема составляет около 1 км в длину и 200–400 м в ширину. Губа характеризуется небольшими глубинами (максимальные глубины 2,5–3 м на малой воде) и илисто-песчаными осадками. Надо отметить меньшие глубины кутового и центрального районов Никольской губы (1–2 м на малой воде).

В целом сублитораль лагуны представлена селами, на которых произрастает морская трава *Zostera marina*. В нижней и средней литорали преобладают илы и песчанистые илы, а в верхней – илистые пески. Соленость придонной воды в период взятия проб была относительно высокой (22–23‰). По мере приближения к куту лагуны соленость снижалась до 21–22‰. В самом куте соленость воды падала до 1–3 промилле. Резкое снижение солености в куте лагуны обусловлено впадением в него большого ручья. Следует уточнить, что поступление пресного стока в губу летом ограничено из-за того, что мелкие ручьи пересыхают, а большой ручей сильно мелеет.

Видовой состав и общие показатели структуры сообщества. Всего в губе Никольской было встречено 26 видов макробентосных животных и 9 видов морских трав и водорослей (см. табл. 1). В составе зообентоса преобладали полихеты (девять видов) и моллюски (четыре вида брюхоногих моллюсков и три вида двустворчатых), меньше было встречено ракообразных (два вида). Зато были обнаружены представители насекомых (два вида) и олигохет (два вида). Полученные данные по качественному составу макробентоса свидетельствуют о преимущественно эстуарном характере фауны этого полужамкнутого мелководного водоема. Это объясняется его некоторой опресненностью, особенно во время сильных дождей или весной в результате снеготаяния.

Морские травы (за исключением зоостеры) встречались главным образом в верхней литорали и соленом марше (в основном кутового и центрального районов), а морские водоросли (фукусы, *Cladophora sericea*) – в нижней и средней литорали (в основном центрального и мористого районов губы). Морская трава *Zostera marina* в основном обнаруживалась в нижней литорали и частично – в сублиторали.

Интегральные показатели макрозообентосного сообщества (видовое разнообразие, общая плотность и биомасса) в губе Никольская преимущественно увеличивались от верхней литорали к средней и нижней, а также немного снижались к сублиторали (табл. 2). Общие показатели структуры сообщества в сублиторали были снижены по сравнению с нижней и средней литоралью, что можно объяснить значительным заилением дна этого водоема. В сублиторали доминировали в основном менее эвригалинные и менее многочисленые виды полихет (*Macoma balthica*, *Nereimyra punctatata*, *Alitta virens*, *Pectinaria koreni*, *Phyllodoce*

maculata). Сообщества литорали были представлены в основном эвритопными видами. В нижней литорали доминировали *Mytilus edulis*, *Macoma balthica*, *Littorina littorea*, *Scoloplos armiger*, в средней — *Macoma balthica*, *Mya arenaria*, *Littorina saxatilis*, *Mytilus edulis*, *Tubificoides benedii*, *Peringia ulvae* (табл. 1, 2). В верхней литорали из-за значительного осушения и опреснения в основном преобладали редкие популяции трех видов макробентоса — брюхоногих моллюсков *Peringia ulvae*, олигохет *Tubificoides benedii*, а также двустворчатых моллюсков *Littorina saxatilis* (табл. 1, 2).

В средней и нижней литорали по направлению от кутовых районов губы к морю наблюдалось в основном увеличение видового разнообразия, общей плотности и биомассы сообщества макробентоса. Особенно повышенной плотностью и биомассой характеризуется популяция *M. edulis* на выходе из губы (табл. 2). В верхней литорали происходило небольшое увеличение общей биомассы сообщества в сторону моря при снижении общей плотности, что связано с уменьшением плотности мелких форм зообентоса в этом направлении (в первую очередь, *Peringia ulvae* и *Tubificoides benedii*) (табл. 2). В сублиторали мы

наблюдаем некоторое увеличение общей биомассы сообщества в сторону моря при снижении общей плотности популяций беспозвоночных животных на выходе из губы (табл. 2). Это объясняется преобладанием в мористой части губы более крупных, но менее многочисленных моллюсков *Macoma balthica*, а также полихет *Nereimyra punctatata*, *Nereis virens*, *Scoloplos armiger*, *Micronephthys minuta*, *Pectinaria koreni*.

Таким образом, наиболее значительные изменения в продольном направлении от кутовых районов к мористой области наблюдались в средней и нижней литорали, обусловленные сменой гидрологических условий на выходе из губы (зона повышенной гидродинамики) и развитием там сообщества неподвижных сестонофагов *M. edulis*. Надо отметить, что поселения *M. edulis* встречались практически на всем протяжении губы (преимущественно в нижнем горизонте литорали), однако если на выходе из губы они образовывали плотные поселения, то в куте их плотность была невысокой. В основном здесь обитали единичные экземпляры молодых *M. edulis*, которые, по-видимому, вместе с кладофорой были занесены приливными течениями.

Таблица 2

Общие показатели структуры сообщества макрозообентоса губы Никольской

Общие показатели	Районы исследования (разрезы)					
	1 разрез (кут)	2 разрез	3 разрез	4 разрез	5 разрез (море)	Среднее
Верхняя литораль						
S	2	1	1	3	1	1,6±0,4
N, экз./м ²	3072	320	2048	1984	1024	1690±471
B, г/м ²	14,3	15,6	30,7	88,5	36,2	21,7±4,9
H _N	0,8	0	0	1,2	0	0,45±0,30
Средняя литораль						
S	4	4	7	10	10	7,0±1,3
N, экз./м ²	2560	352	5904	7811	22080	7741±3811
B, г/м ²	44,8	9,2	62,5	208,8	978	260,6±182,5
H _N	0,6	1,6	1,0	1,1	1,3	1,1±0,2
Нижняя литораль						
S	8	5	4	9	10	7,2±1,1
N, экз./м ²	22112	5800	600	2520	18992	10005±4413
B, г/м ²	279,3	101	4,1	41,2	1197	324,4±223,1
H _N	0,7	0,7	1,5	2,5	1,4	1,3±0,3
Суб-литораль						
S	4 (2)	5	3	4 (5)	3 (9)	4,4±1,0
N, экз./м ²	720 (640)	720	160	1000 (440)	240(1280)	650±167
B, г/м ²	17,6 (3,5)	7,0	5,8	34,4 (19,4)	4,5 (29,2)	15,2±5,3
H _N	1,1 (0,8)	1,9	1,5	1,0 (1,9)	1,6 (2,9)	1,6±0,3
Суб-литораль	6 разрез Выход из губы	7 разрез Выход из губы	8 разрез Выход из губы	9 разрез Выход из губы		
S	2(4)	2	2	3		2,6±0,4
N, экз./м ²	720 (560)	80	320	320		400±110
B, г/м ²	93,2 (50)	18,8	19,1	38,2		40±15,4
H _N	0,5 (1,8)	1,0	0,5	1,4		1,0±0,25

Примечание: S — число видов, N — общая плотность, B — общая биомасса, H_N — индекс Шеннона по плотности популяций. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего; в скобках указаны значения для станций одного разреза.

В целом наиболее значительные изменения видовой структуры сообщества в губе Никольская происходят в вертикальном направлении — от верхней литорали к средней, нижней литорали и сублиторали. В продольном направлении градиент структуры сообщества был менее выраженным.

Пространственная структура сообщества (сходство станций). Среднее сходство сообществ по качественному составу или по плотности видовых популяций макробентоса или по биомассе в экосистеме губы Никольской было невысоким (около 0,3–0,4). Это свидетельствует о неоднородности видовой структуры макробентосного сообщества в этой лагуне.

Кластерный анализ качественного состава макробентоса на уровне значимого сходства дает возможность выделить в Никольской губе четыре группы станций (рис. 2). Первая группа (ст. 11, 12, 13) расположена в сублиторали на выходе из губы, вторая группа (6–9) — в сублиторали внутри губы (рис. 2). Третья группа (19–20) включает в основном станции верхней литорали (24–28) и станции кутового района средней литорали (19, 20) и сублиторали (1, 2, 5, 7). Четвертая группа (14–17) включает станции нижней литорали (14–18), а также станции средней литорали мористого района губы (21, 22, 23). Таким образом, в основном группировка станций идет относительно приливного уровня. Хорошо отличаются сублиторальные сообщества от литоральных, за исключением сублиторальных сообществ кутовой области (значи-

тельная плотность брюхоногих моллюсков *Peringia ulvae* и олигохет *Tubificoides benedii*), которые по видовой структуре были ближе к литоральным комплексам. Также различаются сообщества нижней литорали и среднего горизонта литорали мористого района от сообществ всей верхней литорали и средней литорали кутового района.

Таким образом, сублиторальные сообщества можно разделить на комплексы видов, распространенные в куте лагуны при доминировании *Macoma balthica*, *Peringia ulvae*, *Tubificoides benedii*, в центральной части при доминировании *Macoma balthica*, *Nereimyra punctata*, *Alitta virens*, *Scoloplos armiger*, *Micronephthya minuta*, *Pectinaria koreni* и комплексы видов, распространенные на выходе из нее с низким видовым разнообразием и доминированием полихет *Scoloplos armiger*, *Alitta virens*, *Micronephthys minuta*. Литоральные сообщества, в свою очередь, подразделяются на сообщество макробентоса нижней литорали вместе со средней мористого района (доминируют *Macoma balthica*, *Mytilus edulis*, *Peringia ulvae*, *Littorina litorea*, *Amphiporus lactifloreus*, *Mya arenaria*) и на сообщество верхней литорали вместе со средней кутового района лагуны (*Peringia ulvae*, *Tubificoides benedii*, *Littorina saxatilis*).

Трофическая структура сообщества. Макробентосное сообщество лагунной экосистемы Никольской губы характеризуется преобладанием группы собирающих детритофагов (в среднем около 60% от общей биомассы сообщества) (табл. 3).

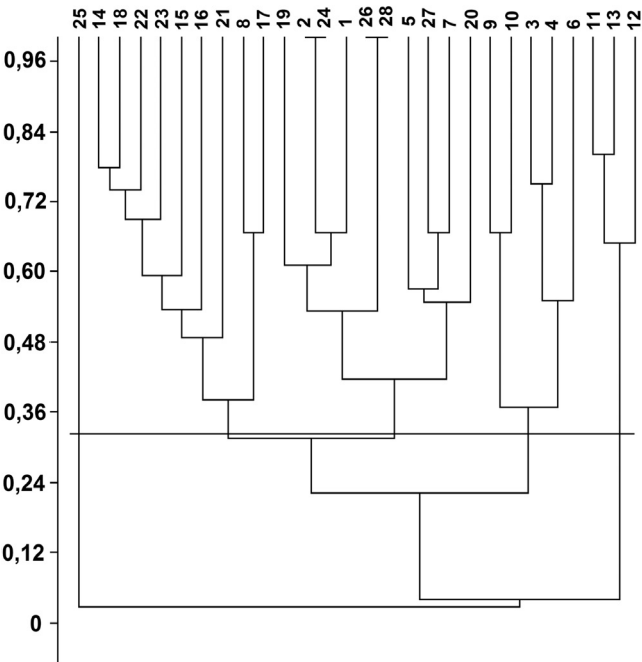


Рис. 2. Дендрограмма сходства сообществ (станций) по качественному составу макробентоса в губе Никольская (для литоральных и сублиторальных сообществ). Горизонтальной линией показан уровень значимого сходства. Нумерация станций согласно рис. 1.

Таблица 3

Трофическая структура сообщества макрозообентоса в лагунной экосистеме Никольской губы (Кандалакшский залив, Белое море)

Трофические группы	Районы исследования	
	Сублитораль	Нижняя литораль
Д (%)	63,6±11,6	61,5±11,8
Г (%)	1,8±1,5	1,6±1,2
НС (%)	0	24,4±13,7
ПС (%)	0	1,3±1,1
С, О (%)	0	5,4±3,0
Х (%)	31,8±11,3	5,2±2,9
П (%)	2,8±1,8	0,6±0,2
	Средняя литораль	Верхняя литораль
Д (%)	61,1±14,5	77,1±19,5
Г (%)	2,9±1,6	0
НС (%)	20,7±10,5	0
ПС (%)	12,4±6,6	0
С, О (%)	1,8±1,0	22,9±9,5
Х (%)	1,0±0,5	0
П (%)	0,1±0,05	0

Примечание: Д — собирающие детритофаги, Г — грунтоеды (безвыборочно заглатывающие грунт), НС — неподвижные сестонофаги, ПС — подвижные сестонофаги, С, О — скоблильщики, обгрызатели, Х — хищники, П — полифаги. % — % от общей биомассы сообщества.

Никольская губа хорошо защищена от морских волн и течений. Это сказывается в целом на повышенном содержании органического вещества в осадках лагуны и на доминировании в ней группы собирающих детритофагов. Но в то же время можно говорить об особенностях распределения трофических групп. Данные особенности проявляются при исследовании губы от верхней литорали к средней, нижней и сублиторали, а также в продольном направлении: кут губы и выход из нее также имеют свои отличия. На верхней литорали преобладали собирающие детритофаги (*Peringia ulvae* и *Tubificoides benedii*) и скоблильщики *Littorina saxatilis*. В средней литорали преобладали собирающие детритофаги (*Macoma balthica*, *Peringia ulvae*, *Tubificoides benedii*, *Paranais litoralis*, *Pygospio elegans*), за ними следовали неподвижные (*Mytilus edulis*) и малоподвижные сестонофаги (*Mya arenaria*), в нижней литорали — собирающие детритофаги (*Macoma balthica*), затем неподвижные сестонофаги (*Mytilus edulis*) и скоблильщики (*Littorina littorea*), а в сублиторали преобладали собирающие детритофаги (*Macoma balthica*) и хищники (в основном немертины *Lineus gesseriensis* и полихеты *Phyllodoce maculata*, *Micronephthys minuta*). В куте губы повсюду, т.е. на литорали и в сублиторали, преобладали собирающие детритофаги, а на выходе из губы в нижней и средней литорали в зоне активной гидродинамики доминировали неподвижные сестонофаги *Mytilus edulis*.

Таким образом, в вертикальном направлении изменения трофической структуры происходили в основном на уровне субдоминантных групп (в верхней литорали в качестве субдоминантной трофической группы преобладали скоблильщики, в средней — малоподвижные и неподвижные сестонофаги, в нижней — неподвижные сестонофаги и скоблильщики, в сублиторали — хищники) при доминировании группы собирающих детритофагов. В продольном направлении собирающие детритофаги, преобладающие внутри губы, замещались неподвижными сестонофагами *M. edulis* на выходе из губы в нижней и средней литорали при доминировании собирающих детритофагов в верхней литорали и в сублиторали.

Обсуждение

Никольская губа относится к мелководным сильно заиленным водоемам лагунного типа с затрудненным водообменом с внешней акваторией. Губа хорошо защищена от морских волн и течений и характеризуется бедной специфической фауной и флорой. В лагуне Никольской губы наблюдается хорошо выраженный вертикальный градиент структуры сообщества макробентоса (от верхней литорали к средней, нижней и сублиторали) и менее выраженный продольный — от кутовых наиболее заиленных и опресненных местообитаний к мористым. При этом общие показатели

структуры сообщества макробоентоса (видовое разнообразие, общая плотность, общая биомасса) в губе преимущественно увеличивались от верхней литорали к средней и нижней и снижались к сублиторали. В продольном направлении заметные изменения структуры сообщества макробентоса наблюдались в основном в нижнем и среднем горизонтах литорали, обусловленные развитием на выходе из губы плотных поселений *Mytilus edulis*, отсутствующих или слабо представленных в основной внутренней части губы.

Значительное ослабление водообмена губы Никольская с внешней акваторией и ее сильное заиление (преобладают илы и песчанистые илы с запахом сероводорода) приводят к существенному уменьшению видового разнообразия и снижению общей плотности и особенно биомассы сообщества макробентоса по сравнению с внешней акваторией и более открытыми морскими лагунами [5, 9, 12, 16–18]. Надо отметить, что снижение видового разнообразия сообщества наблюдалось не только в сублиторали, но и в литоральных местообитаниях, особенно заметное в кутовой части лагуны, где доминировали мелкие эвритопные виды — *Peringia ulvae* и *Tubificoides benedii*.

Макробентосное сообщество лагунной экосистемы Никольской губы по сравнению с ранее изученными морскими лагунами [9, 12] характеризуется не только меньшим видовым разнообразием макробоентоса, но и преобладанием группы собирающих детритофагов практически во всех местообитаниях (в верхней, средней, нижней литорали и сублиторали). Собственно, по этим показателям лагуна приближается к опресненному району эстуария реки Черной, где также доминировали собирающие детритофаги во всей прибрежной зоне [19]. Однако сообщество макробентоса солоноватой зоны эстуария р. Черной в отличие от губы Никольской характеризовалось развитием бедной солоноватоводной и пресноводной фауны, что связано с влиянием пониженной (критической [4]) солености воды (3–8 промилле) в этом районе эстуария. В губе Никольская в отличие от эстуарных экосистем основным фактором, влияющим на уменьшение видового разнообразия, является не столько соленость воды (была относительно высокой за исключением самой кутовой области), сколько сильное заиление осадков с преобладанием мягких илов с запахом сероводорода, что способствуют развитию в губе мелких видов детритофагов, особенно в ее кутовой и центральной областях. Нельзя недооценивать влияние солености воды, особенно весной или во время сильных дождей, и все же характер грунта, повышенное содержание органического вещества и детрита в осадках, процессы сульфатредукции оказываются более значимыми факторами, определяющими разнообразие и структуру макробентосных сообществ лагунной экосистемы Никольской губы.

В целом, сообщество макробентоса Никольской губы было более однородное и, соответственно, менее гетерогенное по сравнению с другими более открытыми морскими лагунами [5, 8, 9, 12] и особенно эстуарными экосистемами [19–21], что связано с более стабильными абиотическими условиями (преобладание мягких грунтов, мелководность, относительное постоянство солености) в лагуне. В эстуариях вследствие значительных изменений солености воды образуется несколько зон, заселенных различными комплексами пресноводных, солоноватоводных и морских эвригаллиных видов [4, 19–21].

В заключение отметим, что дальнейшее ослабление водообмена и уменьшение связи лагуны с морем из-за продолжающегося подъема берегов Белого моря [22] в обозримой исторической перспективе (50–100 лет) может привести к еще большему заилению, опреснению и возможному со-

кращению площади лагуны (за счет кутового района), это будет способствовать развитию немногих мелких видов детритофагов-собирателей, устойчивых к опреснению, углеродной нагрузке и воздействию сероводорода, что характерно для более изолированного соленого озера Кисло-Сладкое, где доминируют мелкие эвритопные виды *Peringia ulvae*, *Tubificoides benedii* и *Chironomus salinaris* [23].

Работа выполнена в рамках программы развития междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды». Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kjerfve B. Coastal lagoons // Coastal lagoon processes / Ed. Kjerfve B. Amsterdam: Elsevier, 1994. P. 1–8.
2. De Wit R., Leruste A., Le Fur I., Sy M.M., Bec B., Ouisse V., Derolez V., Rey-Valette H. A multidisciplinary approach for restoration ecology of shallow coastal lagoons, a case study in South France // Front. Ecol. Evol. 2020. Vol. 8: 108.
3. Stolyarov A.P. Some features of the species, spatial, and trophic structure of macrobenthos in the lagoon systems of the Ermolinskaya and Nikol'skaya inlets (Kandalaksha bay, the White sea) // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2019. Vol. 74. N 3. P. 176–182.
4. Khlebovich V.V. Applied aspects of the concept of critical salinity // Biol. Bull. Rev. 2015. Vol. 5. N 6. P. 562–567.
5. Комплексные исследования Бабьего моря, полу-изолированной беломорской лагуны: геология, гидрология, биота – изменения на фоне трансгрессии берегов (Труды Беломорской биостанции МГУ. Т. 12.) / Под общ. ред. В.О. Мокиевского, А.И. Исаченко, П.Ю. Дгебуадзе и А.Б. Цетлина. М.: Т-во научн. изд. КМК, 2016. 243 с.
6. Ellis J.I., Clark D., Atalah J., Jiang W., Taiapa C., Patterson M., Sinner J., Hewitt J. Multiple stressor effects on marine infauna: Responses of estuarine taxa and functional traits to sedimentation, nutrient and metal loading // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. P. 1–16.
7. Van der Linden P., Marchini A., Smith C.J., Dolbeth M., Simone L.R.L., Marques J.C., Moloizzi J., Medeiros C.R., Patrício J. Functional changes in polychaete and mollusc communities in two tropical estuaries // Estuar. Coast. Shelf Sci. 2017. Vol. 187. P. 62–73.
8. Labay V.S., Kurilova N.V., Shpilko T.S. Seasonal variability of macrozoobenthos in a lagoon having a periodic connection with the sea (Ptich'e Lake, southern Sakhalin) // Biol. Bull. 2016. Vol. 43. N 9. P. 988–1002.
9. Stolyarov A.P. Peculiarities of the structure of and trends in the macrobenthos community of the Ermolinskaya Bay lagoon ecosystem, Kandalaksha Bay, White Sea // Biol. Bull. 2017. Vol. 44. N 9. P. 1019–1034.
10. Sy M.M., Rey-Valette H., Simier M., Pasqualini V., Figuières Ch., De Wit R. Identifying consensus on coastal lagoons ecosystem services and conservation priorities for an effective decision making: A Q approach // Ecol. Econ. 2018. Vol. 154. P. 1–13.
11. Mosbahi N., Serbaji M.M., Pezy J.P., Neifar L., Dauvin J.C. Response of benthic macrofauna to multiple anthropogenic pressures in the shallow coastal zone south of Sfax (Tunisia, central Mediterranean Sea) // Environ. Pollut. 2019. Vol. 253. P. 474–487.
12. Stolyarov A.P. Species diversity and trophic structure of macrobenthos communities in lagoon ecosystems (Kandalaksha Bay, White Sea) // Biol. Bull. 2020. Vol. 47. N 8. P. 887–896.
13. Shannon C.E. The mathematical theory of communication // Bell Syst. Tech. J. 1948. Vol. 27. N 3. P. 379–423.
14. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // Palaeontol. Electron. 2001. Vol. 4. N 1: 4.
15. Sørensen T.A. A new method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analysis of the vegetation on Danish commons // Kongel. Danske Vidensk. Selsk. Skr. 1948. Vol. 5. N 4. P. 1–34.
16. Броцкая В.А., Жданова Н.Н., Семенова Н.Л. Донная фауна Великой Салмы и прилежащих районов Кандакшского залива Белого моря // Труды Беломорской биологической станции МГУ. Т. 2. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1963. С. 159–182.
17. Chikina M.V., Spiridonov V.A., Mardashova M.V. Spatial and temporal variability of coastal benthic communities in the Keretsky Archipelago area and in the Velikaya Salma strait (Karelian coast, the White Sea) // Oceanology. 2014. Vol. 54. N 1. P. 54–65.
18. Артемьев С.Н., Новоселов А.П., Левицкий А.Л. Таксономическое и видовое разнообразие макрозоо-

бентоса в Двинском заливе Белого моря // *Arct. Environ. Res.* 2017. Т. 17. № 4. С. 308–320.

19. Столяров А.П. Видовое разнообразие и трофическая структура литоральных сообществ макробентоса эстуария реки Черной (Кандалакшский залив, Белое море) // *Бюлл. МОИП. Отд. биол.* 2019. Т. 124. № 4. С. 19–28.

20. Лабай В.С., Корнеев Е.С., Абрамова Е.В., Ушаков А.А., Ахмадеева Е.С. Макробентос эстуария типичной «лососевой» реки острова Сахалин (на примере р. Мануй) // *Известия ТИНРО.* 2022. Т. 202. № 3. С. 640–660.

21. Chertoproud M.V., Udalov A.A., Stoljarov A.P., Borisov R.R. Diversity of macrobenthic communities in the White Sea estuaries // *Oceanology.* 2004. Vol. 44. N 6. P. 845–855.

22. Романенко Ф.А., Шилова О.С. Последлениковское поднятие Карельского берега Белого моря по данным радиоуглеродного и диатомового анализов озерно-болотных отложений полуострова Киндо // *Докл. Акад. наук.* 2012. Т. 442. № 4. С. 544–548.

23. Мардашова М.В., Воронов Д.А., Краснова Е.Д. Бентосные сообщества прибрежных водоемов на разных стадиях изоляции от моря в окрестностях беломорской биостанции МГУ (Кандалакшский залив Белого моря) // *Зоол. журн.* 2020. Т. 99. № 7. С. 819–837.

Поступила в редакцию 02.11.2022

После доработки 19.02.2023

Принята в печать 07.03.2023

RESEARCH ARTICLE

Features of the species, spatial and trophic structure of macrobenthos in the lagoon ecosystem of the Nikolskaya Bay (Kandalaksha Bay, White Sea)

A.P. Stolyarov 

*Department of Hydrobiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: macrobenthos@mail.ru*

The article considers the species composition, features of the spatial and trophic structure of the macrobenthos of the Nikolskaya Bay of the White Sea. Nikolskaya Bay belongs to heavily silty lagoonal ecosystems with a predominance of the trophic group of collecting the detritus feeders. The accumulation of a large amount of organic matter in the sediments of the lagoon and its desalination in the spring period contribute to the development of mainly small species of detritophagous, which are more resistant to siltation and desalination, as well as to oxygen deficiency. These processes are especially manifested in the apex region of the bay. 26 species of invertebrates and 9 species of seagrasses and algae were found in the lagoon. Analysis of the obtained data on the species composition, diversity and structure of macrobenthos communities indicate the predominantly estuarine nature of the fauna of the Nikolskaya Bay lagoon ecosystem compared to other lagoons of the White Sea, since it is well protected from sea waves and currents by islands, luds and corgi.

Keywords: *lagoonal ecosystems, macrobenthos, species diversity, spatial distribution, trophic structure, White Sea*

Funding: The work was carried out within the framework of the program for the development of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of the Lomonosov Moscow State University “The future of the planet and global environmental changes.”

Сведения об авторе

Столяров Андрей Павлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-939-25-73; e-mail: macrobenthos@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4850-2929>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.152.34:582.282.123.4

Сравнение антикоагулянтного действия *in vitro* протеаз, секретируемых микромицетом *Aspergillus ochraceus* и содержащихся в яде змей

А.А. Осмоловский^{1, *} , И. Домбек², С. Хауке³, А.В. Орехова^{1, 4}, В.Г. Крейер¹

¹Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Faculty of Natural Sciences, University of Hohenheim, Germany, 70599, Stuttgart, Garbenstraße 13;

³School of Engineering and Design, Technical University of Munich, Germany, 85748, Garching, Boltzmann str. 15;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России, Россия, 101990, г. Москва, Петроверигский пер., д. 10.

*e-mail: aosmol@mail.ru

Изучено антикоагулянтное действие *in vitro* протеазы, секретируемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* L-1, и содержащихся в яде змей (препараты Protac® и RVV-X®) протеаз. Показана выраженность действия протеазы микромицета по отношению к плазме человека и теплокровных животных, а также плазмам человека, дефицитным по определенным факторам системы гемостаза в сопоставлении с протеазами змей в реакциях с хромогенными пептидными субстратами активированного протеина С и фактора X, а также с помощью теста на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Были подобраны оптимальное время прединкубации протеазы микромицета *A. ochraceus* L-1 с плазмой крови человека (3 мин) и концентрация хромогенного пептидного субстрата активированного протеина С (от 0,1 до 0,5 мг/мл), необходимые для корректного определения протеина С.

Ключевые слова: протеазы яда змей, протеаза *Aspergillus ochraceus*, антикоагулянтные ферменты, активаторы белков гемостаза, хромогенные пептидные субстраты, тест АЧТВ

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-1-6

Протеолитические ферменты мицелиальных грибов из космополитного рода *Aspergillus* различаются по спектру воздействия на белки системы гемостаза человека и представляют значительный интерес и как факторы патогенности, и как потенциальные компоненты препаратов медицинского назначения [1–5]. Проявляя свойства прямых фибрино- и фибриногенолитиков или активаторов проферментов системы гемостаза, они все чаще рассматриваются в качестве активирующих реагентов в наборах для диагностики *in vitro* некоторых белков плазменного гемостаза, таких как протеин С и фактор X [3, 6]. В силу наследственных или приобретенных заболеваний недостаток этих белков ведет к риску развития тромбоэмболических осложнений, что требует выявления уровня их активности для проведения корректной терапии у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями [7]. Содержание данных белков в плазме определяется при помощи специальных диагностических наборов, содержащих в качестве активирующего протеин С реагента сериновую протеа-

зу из яда южно-американского щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix*, а в качестве активирующего фактор X реагента – сериновую протеазу из яда гадюки Рассела (*Daboia russellii*) [8]. Ввиду сложности получения рекомбинантных форм змеиных протеаз-активаторов, поиск альтернативных протеолитических ферментов со схожими свойствами представляется весьма актуальным [9]. Одним из таких ферментов является внеклеточная сериновая протеаза микромицета *Aspergillus ochraceus* L-1, которая представляет собой негликозилированный белок с молекулярной массой 35 кДа, способный активировать протеин С и фактор X плазмы крови человека аналогично змеиным активаторам и показавший возможность применения для определения этих белков плазменного гемостаза хромогенным методом [10–12]. Возможность выявления указанных проферментов системы гемостаза с помощью протеазы *A. ochraceus* L-1 клоттинговым методом, а также ее воздействие на белки плазмы других млекопитающих остались неизученными.

Целью настоящей работы было сравнительное изучение антикоагулянтного действия *in vitro* протеазы, секретируемой микромицетом *A. ochraceus* L-1, и содержащихся в яде змей протеаз, а также определение оптимальных параметров детекции протеина С в плазме с помощью протеазы *A. ochraceus* L-1.

Материалы и методы

Получение протеазы *A. ochraceus* L-1. Для получения внеклеточной протеазы продуцент — микромицет *A. ochraceus* L-1 — культивировали в глубинных условиях в две последовательные стадии, сначала на посевной среде (состав в %: сусло — 6,7, глюкоза — 1, пептон — 0,1; pH 5,5–6,0), а затем — на ферментационной среде (состав в %: глюкоза — 3,5, гидролизат рыбной муки — 1, NaCl — 0,2, крахмал — 0,125, пептон — 0,1, KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05; pH 5,5–6,0), как было предложено ранее [13, 14]. Из культуральной жидкости, предварительно отделенной от биомассы фильтрованием через бумажный фильтр, проводили осаждение белков сульфатом аммония (степень насыщения — 0,7) с последующим выделением протеазы в соответствии с разработанным ранее способом, включающим этапы гидрофобной (на фенил-сефарозе, GE Healthcare, США) ионообменной (на ДЭАЭ-сефарозе, GE Healthcare, США) и гель-проникающей (на Сефадексе G-50, Pharmacia, Швеция) хроматографии [15]. Сорбенты для хроматографии уравнивали 50 мМ Трис-НСI-буфером, pH 8,0. Для подтверждения гомогенности выделенной протеазы проводили денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле по методу Лэммли (концентрация акриламида в концентрирующем геле — 6%, в разделяющем — 12,5%).

Определение белка. Количественное определение белка в пробах проводили спектрофотометрически при 280 нм в кювете с длиной пути 1 см [16].

Определение активирующей проферменты системы гемостаза активности. Активирующее действие протеиназы *A. ochraceus* L-1 изучали с плазмой крови человека в реакциях с хромогенными пептидными субстратами активированного протеина С (Glp-Pro-Arg-pNA) и фактора X (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) [3]. Для проведения реакции к 200 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл) добавляли 50 мкл образца плазмы, разведенной в 2 раза 0,05 М Трис-НСI-буфером, pH 8,2, прединкубировали 5 мин при 37°C. Далее к инкубационной смеси добавляли к 100 мкл 0,05%-ного (0,05 М Трис-НСI-буфер, pH 8,2) раствор соответствующего субстрата и продолжали реакцию при тех же условиях, регистрируя ее кинетику в течение 5 мин. Реакцию останавливали 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты [17]. За единицу активности (Е) принимали количество мкмоль п-нитроанилина, отщепившегося от хромогенного субстрата за 1 мин.

Реакции проводили перемешиванием при 37°C либо в термошейкере TS-100 (BioSan, Латвия), либо в термостатированном кюветном отделении спектрофотометра BioSpectrometer® kinetic (Erppendorf, Германия). Измерение оптической плотности растворов проводили на том же спектрофотометре.

Определение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). АЧТВ определяли с помощью набора реактивов «АЧТВ-тест» НПО «Ренам» (Россия) в соответствии с инструкцией. К 100 мкл активирующего агента добавляли 100 мкл плазмы, выдерживали 3 мин при 37°C, после чего к смеси добавляли 100 мкл 0,025 М раствора CaCl_2 и засекали время образования сгустка плазмы (в секундах). Реакции проводили на коагулометре ЭМКО-02 (Россия). В качестве активирующих реагентов использовали АЧТВ-реагент (на основе соевых фосфолипидов и эллаговой кислоты) (Ренам, Россия), АЧТВ-реагент с активатором (Ренам, Россия), препараты Protac® и RVV-X® (DSM, Швейцария) и выделенную протеазу *A. ochraceus* L-1. Образцами плазмы служили лиофилизированные нормальная плазма человека, патологическая плазма (плазма со сниженным содержанием факторов системы гемостаза) человека, дефибрированная плазма, плазма со сниженным уровнем протеина С, плазмы, дефицитные по факторам II, X, XI, XII (Ренам, Россия), а также плазмы животных: кролика (Аллерген, Россия), крысы, кошки, быка и свиньи (Sigma-Aldrich, США). Перед проведением реакции к образцам плазмы добавляли по 1 мл 0,05 М Трис-НСI-буфера, pH 8,2 и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин. АЧТВ рассчитывали по формуле: $(t_o - t_k)/t_k \times 100\%$, где t_o — время (с) свертывания плазмы в присутствии протеазы микромицета (опыт), t_k — время (с) свертывания плазмы с добавлением АЧТВ-реагента (контроль).

Определение параметров детекции протеина С с помощью протеазы *A. ochraceus* L-1. Для практического использования протеазы микромицета *A. ochraceus* L-1 в лабораторной диагностике определяли оптимальное время прединкубации с плазмой человека (исследовали временные интервалы в 30, 60, 120, 180, 240, 300 и 600 с) и оптимальную для использования концентрацию субстрата Glp-Pro-Arg-pNA (исследовали концентрации 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 мг/мл).

Эксперименты выполнены в трех повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ MS Excel 2013 и Statistica 7.0. Для сравнения данных использовали U-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде среднего значения с ошибкой среднего.

Результаты и их обсуждение

Возможность применения внеклеточной протеазы микромицета *A. ochraceus* для определения содержания протеина С и фактора Х плазмы крови, показанная ранее [11, 12], требует дополнительного изучения как выраженности ее действия, так и вызываемого антикоагулянтного эффекта в условиях *in vitro* в сравнении с имеющимися аналогами — препаратами Protac® (протеаза-активатор протеина С) и RVV-X® (протеаза-активатор фактора Х) для разработки полноценных диагностикумов на ее основе.

В качестве тестируемых образцов использовали плазмы человека и теплокровных животных, а также плазмы человека, дефицитные по определенным факторам системы гемостаза. Результаты сопоставления выраженности действия протеазы *A. ochraceus* L-1 с протеазами змей по отношению к различным плазмам представлены в табл. 1 и 2.

Как видно из табл. 1, протеаза *A. ochraceus* L-1 способна активировать как протеин С, так и фактор Х во всех использованных плазмах человека и теплокровных животных. В случае активации протеина С наибольшая выраженность действия протеазы микромицета была к плазме человека, в то время как протеаза южноамериканского щитомордника (препарат Protac®) оказалась наиболее активна в отношении плазмы быка, в реакции с которой протеаза микромицета была наименее активна. По отношению к другим плазмам обе

протеазы продемонстрировали различную выраженность действия. Интересно отметить, что протеаза Protac® не активировала протеин С плазмы крови крысы, в противоположность протеазе *A. ochraceus* L-1, активирующее действие которой было весьма значительным.

При изучении активирующей фактор Х активности в пробах с теми же плазмами сопоставление выраженности действия протеаз *A. ochraceus* L-1 и RVV-X® показало определенную схожесть: обе протеазы были наиболее активны по отношению к плазме быка, а наименее — к плазме крысы.

Возможно, такая избирательность в специфичности протеаз возникла по мере их эволюции в соответствии с занимаемыми продуцируемыми их организмами нишами: хорошо известно, что основными жертвами змей в природе являются прежде всего теплокровные животные, а аспергиллы служат причиной развития микозов у человека и других теплокровных млекопитающих, локально нарушая гемостаз в местах проникновения.

По отношению к плазмам человека, дефицитным по разным факторам системы гемостаза, исследуемые протеазы также проявили различную активность (табл. 2). Так, протеаза препарата Protac® активировала протеин С в большинстве образцов плазм (кроме плазмы со сниженным уровнем протеина С и плазмы, дефицитной по фактору II), а протеаза *A. ochraceus* L-1 также активировала этот белок, но с незначительно меньшим эффектом. Вероятно, снижение активности

Таблица 1
Выраженность действия протеаз *A. ochraceus* L-1 к плазмам человека и животных в сравнении с протеазами из яда змей

Плазма	Активаторная к протеину С активность, %		Активаторная к Х фактору активность, %	
	Протеаза <i>A. ochraceus</i>	Protac®	Протеаза <i>A. ochraceus</i>	RVV-X®
Нормальная человека	100,0	59,4 ± 1,0	59,5 ± 1,0	30,0 ± 1,0
Кролика	18,1 ± 1,0	45,3 ± 1,0	52,6 ± 1,0	61,5 ± 1,0
Свиньи	44,8 ± 1,0	35,6 ± 1,0	34,5 ± 1,0	26,3 ± 1,0
Кошки	17,0 ± 1,0	86,7 ± 1,0	41,1 ± 1,0	36,1 ± 1,0
Крысы	92,6 ± 1,0	0,0	14,1 ± 1,0	16,5 ± 1,0
Быка	21,2 ± 1,0	100,0	100,0	100,0

Таблица 2
Выраженность действия протеаз *A. ochraceus* L-1 к плазмам, дефицитным по определенным факторам системы гемостаза, в сравнении с протеазами из яда змей

Плазма	Активаторная к протеину С активность, %		Активаторная к Х фактору активность, %	
	Протеаза <i>A. ochraceus</i>	Protac®	Протеаза <i>A. ochraceus</i>	RVV-X®
Нормальная человека	100,0	100,0	100,0	100,0
Дефибринированная	89,3 ± 1,0	100	44,2 ± 1,0	21,4 ± 1,0
Дефицитная по фактору II	73,0 ± 1,0	84,1 ± 1,0	14,2 ± 1,0	61,2 ± 1,0
Со сниженным уровнем протеина С	53,2 ± 1,0	54,4 ± 1,0	83,4 ± 1,0	89,8 ± 1,0
Дефицитная по фактору X	85,5 ± 1,0	100	0,0	0,0
Дефицитная по фактору XI	74,4 ± 1,0	100	18,7 ± 1,0	0,0
Дефицитная по фактору XII	28,8 ± 1,0	100	12,2 ± 1,0	0,0

протеазы микромицета могут вызывать различные ингибиторы плазмы. Наименьшую активаторную к протеину С активность, как и активаторную к фактору Х активность протеаза *A. ochraceus* L-1 проявила с плазмой, дефицитной по фактору XII. Препарат RVV-X® оказался неактивен в плазмах, дефицитных по факторам XI и XII, тогда как протеаза микромицета активность с ними проявляла. Можно предположить, что обе протеазы не были активны в образце плазмы, дефицитной по фактору Х.

Действие протеолитических ферментов различных организмов как экзогенных активаторов белков системы гемостаза требует более детального изучения как отдельных мишеней, так и общего влияния на каскад свертывания крови. Одним из таких показателей *in vitro* является антикоагулянтная активность протеаз, измеряемая по удлинению времени свертывания образца плазмы — АЧТВ-тест, напрямую зависящего от уровня содержания протеина С в образце плазмы. Как показано на рис. 1А, АЧТВ при использовании протеаз *A. ochraceus* L-1 и Protac® оказалось сходно при их инкубации с нормальной плазмой, патологической плазмой и плазмой со сниженным уровнем протеина С. Протеаза RVV-X® в АЧТВ-тесте оказалась неактивна. Результаты теста АЧТВ подтверждают полученные ранее данные по определению содержания с их помощью протеина С в различных образцах плазмы [11] и позволяют рассматривать протеазу *A. ochraceus* L-1 для определения уровня содержания протеина С при помощи как хромогенного, так и коагулянтного методов.

Изучение АЧТВ с помощью протеазы *A. ochraceus* L-1 с образцами плазм других млекопитающих подтвердило выраженность действия этого фермента (рис. 1Б). Так, по сравнению с контрольными образцами (без протеазы), АЧТВ значительно удлинялось под действием протеазы микромицета в плазмах свиньи и крысы, незначи-

тельно — в плазме кролика, а в плазмах кошки и быка подобного эффекта выявлено не было. Вероятно, в плазмах этих животных протеаза микромицета *A. ochraceus* L-1 в большей степени выступает как активатор фактора Х, о чем дополнительно свидетельствуют данные табл. 1.

Ввиду перспективности использования протеазы микромицета *A. ochraceus* L-1 как активатора протеина С важной представляется задача по разработке диагностикума на ее основе. В связи с этим необходимо подобрать ключевые параметры — оптимальную концентрацию специфического хромогенного пептидного субстрата активированного протеина С (Glp-Pro-Arg-pNA), используемого для детекции протеина С, и оптимальное время реакции с образцом плазмы. На рис. 2 представлены данные, показывающие зависимость скорости реакции от концентрации субстрата активированного протеина С. Как видно из рисунка, скорость реакции линейна в диапазоне исследуемых концентраций от 0,1 мг/мл до 0,5 мг/мл. Следовательно, для лабораторного определения протеина С с помощью протеазы-активатора протеина С микромицета *A. ochraceus* L-1 следует использовать концентрацию указанного субстрата в этом диапазоне.

Поскольку реакция активации протеина С — сопряженная, со стадией прединкубации, время этой стадии может являться важным фактором для проведения корректного определения протеина С в образце. Результаты подбора оптимального времени инкубации протеазы микромицета с нормальной плазмой человека представлены на рис. 3. Видно, что увеличение активности идет в диапазоне от 10 до 180 с, после чего наблюдаются плато и снижение активности. Соответственно, рекомендуемое для определения содержания протеина С плазмы крови человека с использованием протеазы микромицета время составляет до 3 мин.

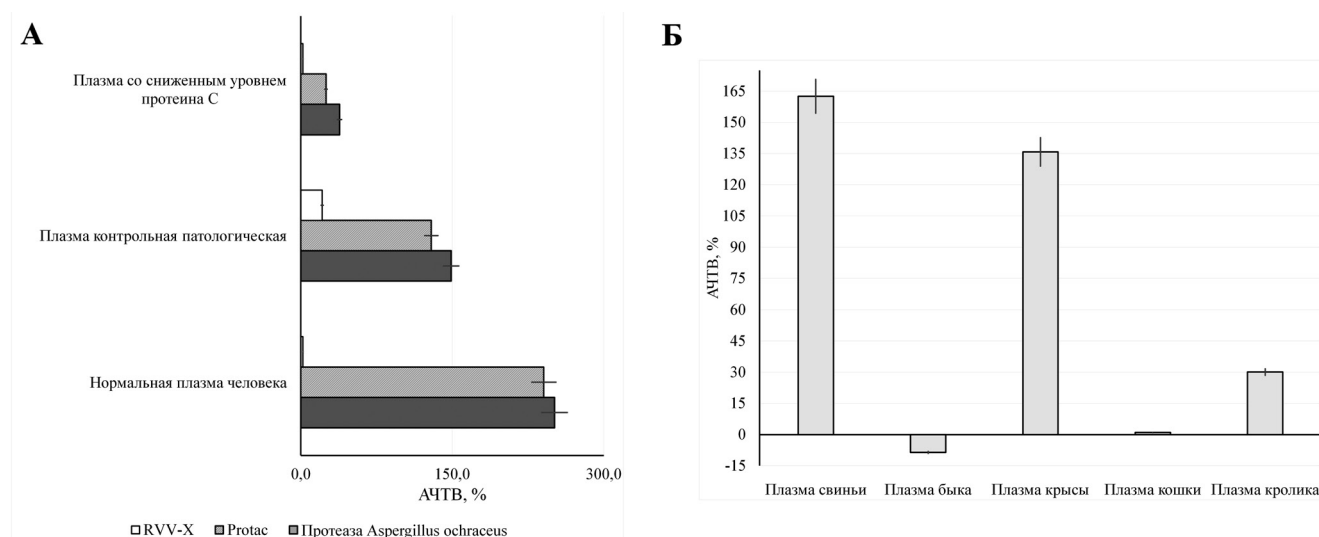


Рис. 1. АЧТВ образцов плазмы человека под действием протеаз *A. ochraceus* L-1 и препаратов Protac® и RVV-X® (А) и плазм крови других млекопитающих под действием протеазы *A. ochraceus* L-1 (Б).

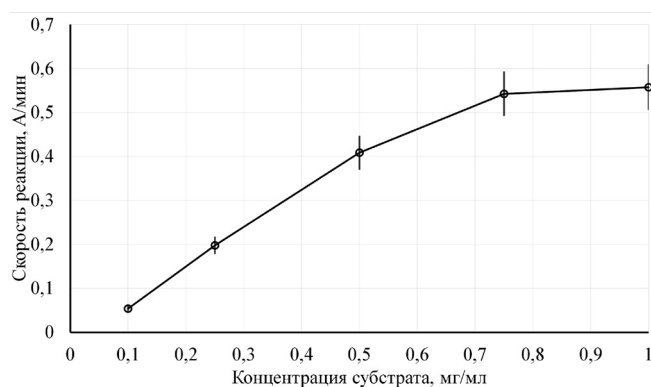


Рис. 2. Определение оптимальной концентрации хромогенного пептидного субстрата активированного протеина С для выявления содержания протеина С в образце при использовании протеазы *A. ochraceus* L-1.

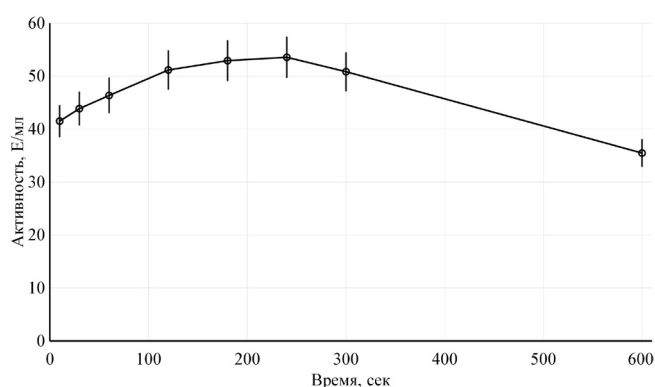


Рис. 3. Определение времени прединкубации протеазы *A. ochraceus* L-1 с плазмой крови человека для диагностики протеина С в образце.

Таким образом, было изучено антикоагулянтное действие *in vitro* нескольких протеаз — секретруемой микромицетом *A. ochraceus* L-1 и содержащихся в яде змей. Показана выраженность действия протеазы микромицета по отношению к плазмам человека и теплокровных животных, а также плазмам человека, дефицитным по определенным факторам системы гемостаза в сопоставлении с протеазами змей в реакциях с хромогенными пептидными субстратами активированного протеина С и фактора Х, а также с помощью теста на АЧТВ. Были подобраны оптимальное время прединкубации проте-

азы микромицета *A. ochraceus* L-1 с плазмой крови человека (3 мин) и концентрация хромогенного пептидного субстрата активированного протеина С (от 0,1 до 0,5 мг/мл), необходимые для корректного определения протеина С.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ № СП-3906.2021.4. Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdal-Aziz S.A.A., Ali S.M. Molecular characterization and differentiation of proteases isolated from different *Aspergillus* fungal species // OnLine J. Biol. Sci. 2021. Vol. 21. N 1. P. 69–119.
2. Srilakshmi J., Madhavi J., Lavanya S., Ammani K. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects // J. Pharm. Chem. Biol. Sci. 2015. Vol. 2. N 4. P. 218–234.
3. Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. The effect of micromycete extracellular proteases of *Aspergillus* genus on the proteins of haemostatic system // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. Vol. 40. N 6. P. 634–639.
4. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Пискунова Н.Ф., Егоров Н.С. Микромицеты *Aspergillus flavus* и *A. oryzae* как продуценты протеиназ-активаторов белков системы гемостаза человека // Микол. фитопатол. 2019. Т. 53. № 3. С. 183–185.
5. Osmolovskiy A.A., Şaş B., Aleksandrova A.V., Baranova N.A., Kreyer V.G. Evaluation of the spectrum of proteolytic activity of micromycetes of the genus *Aspergillus* in relation to proteins of the hemostasis system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2022. Vol. 77. N 2. P. 133–137.
6. Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Identification of targets for extracellular proteases activating proteins of the haemostatic system produced by micromycetes *Aspergillus*

ochraceus and *Aspergillus terreus* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. Vol. 41. N 5. P. 500–505.

7. Palta S., Saroa R., Palta A. Overview of the coagulation system // Indian J. Anaesth. 2014. Vol. 58. N 5. P. 515–523.

8. Sajevec T., Leonardi A., Križaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms // Toxicon. 2011. Vol. 57. N 5. P. 627–645.

9. Kunes Y.Z., Sanz M.-C., Tumanova I., Birr C.A., Shi P.Q., Bruguera P., Ruiz J.A., Sanchez-Martinez D. Expression and characterization of a synthetic protein C activator in *Pichia pastoris* // Protein Expr. Purif. 2002. Vol. 26. P. 406–415.

10. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S. Properties of extracellular proteinase — an activator of protein C in blood plasma formed by *Aspergillus ochraceus* // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. Vol. 51. N 1. P. 86–92.

11. Осмоловский А.А., Орехова А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Возможность применения внеклеточной протеазы микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D для определения содержания протеина С в плазме крови человека // Биомед. хим. 2018. Т. 64. № 1. С. 115–118.

12. Orekhova A.V., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Possibility for application of extracellular protease of micromycete *Aspergillus ochraceus* for

determining factor X content in human blood plasma // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2019. Vol. 74. N 2. P. 117–120.

13. Osmolovskiy A.A., Rukavitsyna E.D., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production of proteinases with fibrinolytic and fibrinogenolytic activity by a micromycete *Aspergillus ochraceus* // Microbiology. 2017. Vol. 86. N 4. P. 512–516.

14. Osmolovskiy A.A., Orekhova A.V., Conti E., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production and stability of the proteinase complex from *Aspergillus ochraceus* L-1 with fibrinolytic and anticoagulant activity // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2020. Vol. 75. N 3. P. 130–135.

15. Komarevsev S.K., Popova E.A., Kreier V.G., Miroshnikov K.A., Osmolovskiy A.A. Purification of the protease activator of protein C of human blood plasma produced by the mi-

cromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. Vol. 56. N 1. P. 32–36.

16. Gertler A., Trop M. The elastase-like enzymes from *Streptomyces griseus* (Pronase). Isolation and partial characterization // Eur. J. Biochem. 1971. Vol. 19. N 1. P. 90–96.

17. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S. *Aspergillus ochraceus* micromycetes – producers of extracellular proteinases – protein C activators of blood plasma // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. Vol. 48. N 5. P. 488–492.

Поступила в редакцию 17.01.2023

После доработки 21.02.2023

Принята в печать 02.03.2023

SHORT COMMUNICATION

Comparison of the *in vitro* anticoagulant action of proteases secreted by the micromycete *Aspergillus ochraceus* and contained in snake venom

A.A. Osmolovskiy^{1,*} , I. Dombeck², S. Hauke³, A.V. Orekhova^{1,4}, V.G. Kreier¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Faculty of Natural Sciences, University of Hohenheim, Garbenstraße 13, Stuttgart, 70599, Germany;

³School of Engineering and Design, Technical University of Munich, Boltzmann str. 15, Garching, 85748, Germany;

⁴Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine” of the Ministry of Health of Russia, Petroverigsky per., 10, Moscow, 101990, Russia

*e-mail: aosmol@mail.ru

The *in vitro* anticoagulant action of proteases secreted by the micromycete *Aspergillus ochraceus* L-1 and contained in snakes' venoms (Protac® and RVV-X® preparations) was studied. The severity of the action of micromycete protease in relation to plasmas of humans and warm-blooded animals, as well as human plasmas deficient in certain factors of the hemostasis system, in comparison with snake proteases in reactions with chromogenic peptide substrates of activated protein C and factor X, as well as using the activated partial thromboplastin time (APTT) test. The optimal time of preincubation of the micromycete *A. ochraceus* L-1 protease with human blood plasma (3 min) and the concentration of the chromogenic peptide substrate of activated protein C (from 0.1 to 0.5 mg/ml) necessary for the correct determination of protein C with her help.

Keywords: proteases of snake venom, *Aspergillus ochraceus* protease, anticoagulant enzymes, hemostasis protein activators, chromogenic peptide substrates, APTT

Funding: This work was supported by the Financial Council for Grants of the President of the Russian Federation No. SP-3906.2021.4.

Сведения об авторах

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6672-0551>

Домбек Изабель (Isabelle Dombeck) — магистр университета Хоэнхайма. Тел: +49-711-459 22780; e-mail: i.dom@gmx.de

Хауке Себастиан (Sebastian Hauke) — магистр Мюнхенского технологического университета. Тел: +49-89-289-15712; e-mail: sebastian.hauke@tum.de

Орехова Анастасия Владимировна — канд. мед. наук, науч. сотр. Национального медицинского исследовательского центра терапии и профилактической медицины Минздрава России, вед. инженер кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: stasya77@list.ru

Крейер Валериана Георгиевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, затрагивают самые разные разделы современной биологии, но обязательно в фундаментальном аспекте. К печати принимаются только комплексные работы, представляющие собой завершённые исследования или проблемные теоретические обзоры.

«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией «Pleiades Publishing Group» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания синхронны и выходят четыре раза в год. Русская версия журнала индексируется в базах данных РИНЦ, ВИНТИ, EastView, RSCI на платформе Web of Science, английская – в Scopus, SCImago, EBSCO Discovery Service, OCLC WorldCat Discovery Service, ProQuest Central, AGRICOLA, EMBiology, Institute of Scientific and Technical Information of China, Japanese Science and Technology Agency (JST), Dimensions, Google Scholar и др. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ русскоязычной версии составляет 0,790, показатель CiteScore 2021 (Scopus) англоязычной версии – 1,2.

После принятия статьи в печать редакция высылает авторам договоры с издателем журнала, которые необходимо заполнить и подписать всем соавторам. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc) и Word 2007 (*.docx), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько – по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Форматирование: шрифт Times New Roman, кегль 12, междустрочный интервал – полуторный, отступ – 1,25, выравнивание по ширине (для удобства к правилам прилагается [шаблон статьи](#)). Редакция рекомендует придерживаться следующего объема рукописи: до 4000 слов для экспериментальной статьи, до 7000 слов для обзорной (включая список литературы и резюме на английском языке). Объёмы, значительно отклоняющиеся от рекомендованных, необходимо согласовывать с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (полужирным шрифтом, кегль 14), инициалы и фамилии авторов (полужирным шрифтом), наименование организации с указанием почтового адреса (курсивом), в сноске на первой странице указывается e-mail автора (отмеченного в заголовке звездочкой), ответственного за переписку с редакцией. После информации о местах работы следуют резюме статьи на русском языке (150–300 слов) и ключевые слова (6–7 слов или словосочетаний, курсивом).

Образец оформления «шапки» статьи:

УДК 577.29

Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера

Н.А. Стефанова¹, Н.Г. Колосова^{1,2,*}

¹ Сектор молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академии наук, Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;

² кафедра цитологии и генетики, биологическое отделение, Новосибирский государственный университет, Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

*e-mail: kolosova@mail.ru

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение (слово «введение» не пишется), материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как «результаты и обсуждение»), заключение (не отделяется от предыдущего текста и не имеет подзаголовка), список

литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение — нижний колонтитул, середина страницы).

Информация о финансировании работы приводится перед списком литературы в следующей формулировке: «Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 00-00-00000)».

Кроме того, также перед списком литературы авторы должны сообщить о наличии или отсутствии конфликта интересов и указать, каким этическим советом утверждены протоколы исследования, если эксперименты проводились с использованием животных или с привлечением людей в качестве испытуемых.

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию...», где указывается дата отправки рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в «шапке» статьи).

Образец оформления англоязычной «шапки» статьи:

Evolution of understanding of Alzheimer's disease pathogenesis

N.A. Stefanova¹, N.G. Kolosova^{1,2,*}

¹*Sector of Molecular Mechanisms of Aging, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;*

²*Chair of Cytology and Genetics, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia*

**e-mail: kolosova@mail.ru*

После ключевых слов приводится информация о финансировании работы (Funding) на английском языке:

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 00-00-00000. (This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number AAAA-A00-000000000000-0).

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

Иванов Иван Иванович — канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-...; e-mail:...

Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков не должно быть избыточным (рекомендуется приводить не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах, предпочтение отдается рисункам. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи (после сведений об авторах). Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово «рисунок» («таблица») при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово «рис» и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное реальное (не интерполированное!) разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Иллюстрации могут быть цветными, однако необходимо учитывать, что цвет будет сохранен лишь в электронной версии статьи, но не в печатной. В связи с этим необходимо подобрать цвета таким образом, чтобы при переводе рисунка в оттенки серого его смысл не терялся и все элементы были различимы.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

Список литературы

Мы рекомендуем авторам придерживаться осмысленного соотношения объемов текста статьи и приставленного списка литературы. Как правило, список литературы должен занимать от 20 до 40% общего объема рукописи.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные статьи, в основном — напечатанные в последнее десятилетие (в некоторых областях биологии допустимы отклонения от этого правила, которые необходимо согласовывать с редакцией). Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, «...что соответствует выводам Смита [19]».

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи // Журнал. Год. Том (Т. или Vol.). Номер (N или №). Страницы.

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). Название. Город: Издательство (без кавычек), год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи // Название сборника / Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия (если редактора два, то между ними ставится и/and). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

4) **Электронный ресурс.** Название сайта [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг). *Дата обращения — это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана.*

5) **Электронная публикация.** Авторы (инициалы после фамилии). Название публикации [Электронный ресурс] // Название источника. Год. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (*Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.; Smith A., Jones J., Brown R., et al.*). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП — Бюл. МОИП, Journal of Biochemistry — J. Biochem. и т.п.), то же касается и городов (Москва — М., New York — N.Y. и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

Примеры оформления источников в списке литературы:

Статья в журнале:

Litchfield K., Reading J.L., Puttick C., Thakkar K., Abbosh C., Bentham R., Watkins T.B., Rosenthal R., Biswas D., Rowan A., Lim E. Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition // Cell. 2021. Vol. 184. N 3. P. 596–614.

Marchena M., Echebarria B. Influence of the tubular network on the characteristics of calcium transients in cardiac myocytes // PloS One. 2020. Vol. 15. N 4: e0231056.

Гребенкин И.В., Алексеев А.Е., Гайворонский Н.А., Игнатов М.Г., Казённов А.М., Козаков Д.В., Кулагин А.П., Холодов Я.А. Применение ансамбля нейросетей и методов статистической механики для предсказания связывания пептида с главным комплексом гистосовместимости // Комп. исслед. моделир. 2020. Т. 12. № 6. С. 1383–1395.

Книга:

Holliday R. Aging: the paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 pp.

Рязанова Г.И. Поведение насекомых. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2019. 232 с.

Статья в сборнике:

Mahajan M., Yadav R.K. Labeling and sorting of arabidopsis SAM cell populations to capture their transcriptome profile // Plant stem cells. Methods in molecular biology, vol. 2094 / Eds. M. Naseem and T. Dandekar. N.Y.: Humana, 2020. P. 39–47.

Храмченкова О.М., Бачура Ю.М. Альгодиагностика деградированных почв // Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.) / Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии, 2013. С. 174–176.

Электронный ресурс:

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: <http://www.senescence.info> (дата обращения: 11.03.2021).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.02.2021).

Электронная публикация:

Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс] // IUCN Red List of Threatened Species. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.02.2022).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

Дополнительные правила оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м — метр, кг — килограмм, мин — минута, ° — градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия — NaCl, углекислый газ — CO₂ и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота — АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота — ДНК, аргинин — Арг, валин — Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов — обычным шрифтом. Например: ген — *FOXO3*, его продукт — FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Например: ... два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocephalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется на соответствие правилам оформления. Если работа не соответствует требованиям, то она возвращается автору без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 7–10 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Далее над рукописью работает редактор, исправленный текст и его замечания отсылаются авторам на 2–3 рабочих дня.

Корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам также на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внося в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

Полезные ссылки

Список сокращённых названий журналов можно найти [здесь](#)

Классификатор УДК располагается [здесь](#)

О том, как правильно сокращать общепринятые термины, можно прочитать [здесь](#)