

*На правах рукописи*

Кравцова Татьяна Робертовна

**ОКСИГЕННЫЕ ФОТОТРОФНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ,  
АССОЦИИРОВАННЫЕ С ГИДРОИДОМ *DYNAMENA PUMILA***

Специальность 03. 02. 10. – гидробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва-2013

Работа выполнена на кафедрах биоинженерии и гидробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Научные руководители:** доктор биологических наук, профессор  
**Ильяш Людмила Васильевна**  
(Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова)

доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник  
**Кокшарова Ольга Алексеевна**  
(Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова)

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Симаков Юрий Георгиевич**  
(Московский государственный университет технологий и управления)

доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
**Куликов Алексей Михайлович**  
(Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН)

**Ведущая организация:** Федеральное государственное учреждение науки  
Институт фундаментальных проблем биологии  
Российской академии наук (ИФПБ РАН)

Защита диссертации состоится «28» ноября 2013 г. в 11 часов 30 мин. на заседании диссертационного совета Д 501.001.55 при Московском государственном совете имени М.В.Ломоносова, по адресу: 119234 Москва, Ленинские горы, 1, 12, МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, аудитория 389.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «\_\_\_» октября 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Карташева Н.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Эпибиоз – это ассоциация, состоящая из организма-хозяина (базибионта) и живущих на нем организмов (эпибионтов). Эпибиоз широко распространен в водных экосистемах, при этом в качестве базибионта выступают водная растительность, простейшие и многоклеточные животные, в том числе гидроидные полипы (Di Camillo et al., 2005, 2008; Romagnoli et al., 2007; Martínez-García et al., 2011; Burke et al., 2011). Обязательным компонентом всех эпибионтных сообществ, обитающих в фотической зоне, являются кислородные фототрофные микроорганизмы (ОФМ): цианобактерии и одноклеточные водоросли. Исследования эпибионтных ОФМ актуальны с точки зрения оценки видового разнообразия, биотических взаимоотношений между компонентами и продуктивности водных экосистем.

Проведенные ранее исследования эпибионтных ОФМ, ассоциированных с гидроидным полипом *Dynamena pumila*, обитающим в Белом море, выявили присутствие разнообразных цианобактерий и эукариотных водорослей, которые, за исключением диатомовых водорослей, не были идентифицированы (Лобакова и др., 2008; Gorelova et al., 2013). Идентификация многих ОФМ представляет значительную трудность, и для уточнения их систематического положения с успехом используются молекулярно-генетические методы (Ernst et al., 2003; Taylor et al., 2007; Perkeron et al., 2011 и др.). Именно на основе их применения выявлено, что значительная часть видов ОФМ в природных водных экосистемах еще не идентифицирована, отсутствуют сведения об их ареалах и функциональной роли в экосистемах (Follows et al., 2007).

В предыдущих исследованиях показано, что среди ОФМ, ассоциированных с *D. pumila*, по численности преобладают цианобактерии и диатомовые водоросли (Горелова и др., 2009; Gorelova et al., 2013), тогда как оценки их биомассы, а также сведения о динамике биомассы в течение летнего периода до настоящего времени отсутствовали.

**Цель работы** - оценка численности и биомассы кислородных фототрофных микроорганизмов, ассоциированных с гидроидным полипом *Dynamena pumila* и

определение таксономического положения ОФМ, выделенных из ассоциации с гидроидом.

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

- Оценить численность и биомассу диатомовых водорослей и цианобактерий - основных компонентов эпибионтного сообщества беломорского гидроида *Dynamena pumila* в июне и августе.
- Получить изоляты ОФМ, из ассоциаций с гидроидом *D. pumila*.
- Охарактеризовать морфологию, ультраструктуру и состав пигментов ОФМ, изолированных из ассоциаций с гидроидом *D. pumila* микроорганизмов.
- Провести молекулярно-генетическое типирование и филогенетический анализ ОФМ, изолированных из ассоциации с гидроидом *D. pumila*.

**Научная новизна.** Выявлена выраженная сезонная и пространственная изменчивость биомассы эпибионтных диатомей и цианобактерий на молодых междуузлиях беломорского гидроида *Dynamena pumila*. Показано достоверное различие в трендах величины биомассы диатомовых водорослей и цианобактерий в летний период. Впервые в ассоциации ОФМ с гидроидом *D. pumila* идентифицированы цианобактерии *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp. Установлено, что ближайшие родственники этих ОФМ обитают как в морских, так и пресных водоемах разных широт. Цианобактерии *Leptolyngbya* sp. 2Dp86E и *Nostoc* sp. 10Dp66E являются новыми видами для биоты Белого моря. В ассоциации с *Nostoc* sp. впервые выявлена гетеротрофная бактерия рода *Gemmatimonas*.

**Практическая значимость работы.** Полученные данные расширяют представления о видовом разнообразии и обилии ОФМ, ассоциированных с беспозвоночными животными, обитающими в Белом море. Результаты могут быть использованы при оценке продукционного потенциала Белого моря, а также при решении таких фундаментальных задач гидробиологии и экологии, как выявление механизмов формирования видовой структуры и поддержания видового разнообразия эпибионтных сообществ. *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp., *Desmodesmus* sp. ведутся как лабораторные культуры, которые могут быть использованы в биотехнологических проектах в качестве продуцентов биологически

активных соединений. Результаты могут быть использованы в курсах лекций и практикумах по гидробиологии.

**Апробация работы и публикации.** Диссертационная работа апробирована и рекомендована к защите на совместном заседании кафедр гидробиологии и биоинженерии, на заседании международного биотехнологического центра МГУ имени М.В.Ломоносова. Результаты работы доложены и обсуждены на международной научной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера» (Апатиты, 2009), на международной научно-практической конференции «Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах» (Киров, 2010), на 2-ой и 3-ей Московских международных конференциях «Молекулярная филогения» (Москва, 2010, 2012), на 4-ой международной Европейской конференции микробиологов FEMS (Женева, 2011), на Всероссийском симпозиуме «Автотрофные микроорганизмы» (Москва, 2010), на 4-ой международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии» (Киев, 2012), на международной конференции «Физиология и биотехнология микроводорослей» (Москва, 2012).

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 3 статьи опубликованы в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 166 страницах машинописного текста, содержит 13 таблиц и 26 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, приложения и списка литературных источников, включающего 361 наименование.

## **Глава 1.**

### **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

Освещены вопросы, касающиеся закономерностей формирования эпибионтных сообществ. Рассмотрены состав эпибионтных ОФМ и их пространственно-временная изменчивость на разных группах организмов-

базибионтах. Дана общая характеристика колониального гидроида *Dynamena pumila* и состава ассоциированных с ним ОФМ. В Белом море *D.pumila* распространен в сублиторали, обитает в основном на фукусах, встречается также на камнях, аскофиллумах и ламинариях. Высота колоний редко превышает 7 см. Тело гидроида представляет собой разветвленную двухслойную трубу, часть которой - столонны гидроризы прикреплены к субстрату. Вдоль столон гидроризы примерно через каждые 2,5 мм образуются вертикально поднимающиеся побеги, которые также ветвятся. Ствол побега состоит из междоузлий длиной 2-3 мм, отделенных друг от друга сужением ствола. Гидранты располагаются на стволе побега друг против друга, лишены ножки и приплюснуты к стволу, имеют внешний скелет – гидротеку (Марфенин, 1993). Удлинение колонии происходит моноподиальным способом с терминально расположенными зонами роста. При средней температуре воды 12-18°С новое терминальное междоузлие может развиваться за 24-72 ч (Косевич, Федосов, 2008; Gorelova et al., 2013).

Также обсуждены современные молекулярно-генетические методы и их применение для исследований ОФМ, обитающих в водных экосистемах.

## **Глава 2.**

### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Образцы колоний гидроида *D. pumila* отбирали в верхнем горизонте сублиторали Ругозерской губы Кандалакшского залива Белого моря в районе Беломорской биологической станции МГУ имени Н.А. Перцова в июне и августе 2006 г. и 2007 г. С апикальной части колоний 3-5 гидроидов срезали первые 4–5 междоузлий. В лаборатории с помощью светового микроскопа Leica DM2500 делали фотографии поверхности гидроида, включая фронтальную сторону междоузлия, зону слияния ствола и гидротеки. В июне было сделано 30 фотографий, в августе – 16. По фотографиям на участках определенной площади, выбранных случайным образом, подсчитывали количество эпибионтных ОФМ. Количество клеток (N) пересчитывали на 1 мм<sup>2</sup> поверхности гидроида. Объемы клеток определяли методом геометрического подобия (Hillebrand et al., 1999). Величину биомассы в единицах углерода (B) рассчитывали по аллометрическим уравнениям (Menden-Deuer, Lessard,

2000). Площадь поверхности колонии гидроида рассчитывали по средним линейным размерам междоузлия (Марфенин, 1993) методом геометрического подобия, принимая, что высота побега составляет 20-25 междоузлий с учетом бокового ветвления 30-300% в зависимости от возраста колонии (Марфенин, 1993). Достоверность различий средних значений N и B оценивали по критерию Манна-Уитни с использованием программы PAST (PAleontological STatistics) Version 2.04 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

В работе использованы накопительные культуры ОФМ, выделенные из ассоциаций с *D. pumila* сотрудниками каф. биоинженерии биологического факультета МГУ. Выделение моновидовых изолятов цианобактерий и эукариотных водорослей из накопительных культур проведено с участием автора. Изоляты культивировали на жидкой и твердой (1.5% агара) минеральной среде BG-11 и её безазотном аналоге BG-11<sub>0</sub> (Stanier et al., 1971).

Спектры поглощения клеточных суспензий в видимом и ближнем ИК-диапазоне снимали на спектрофотометре Hitachi 150-20, снабженном интегрирующей сферой. Компенсацию на вклад светорассеяния осуществляли, как описано в работе (Merzlyak, Razi Naqvi, 2000).

Выделение хромосомной ДНК из цианобактерий проводили согласно методике (Koksharova et al., 1998). Амплификацию фрагментов нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК-23S рРНК проводили по методике (Papaefthimiou et al., 2008). В качестве праймеров применяли опубликованные нуклеотидные последовательности (Nübel et al., 1997; Taton et al., 2003) и праймеры, дизайн которых был осуществлен в настоящей работе. Нуклеотидные последовательности *nifH* гена амплифицировали с помощью праймеров (Ben-Porath, Zehr, 1994). Для амплификации фрагментов нуклеотидных последовательностей 18S рРНК в качестве праймеров применяли нуклеотидные последовательности (Katana et al., 2001). Все праймеры синтезировали в компании «Синтол» (Россия). Амплификацию проводили в амплификаторе ТЕРЦИК (НПФ «ДНК-Технология», Россия).

Ампликоны клонировали в векторе pJET 1.2/blunt с помощью набора для клонирования ПЦР фрагментов CloneJet™ PCR Cloning Kit # K1231 фирмы Fermentas (EU). Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer в ЦКП «Геном».

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) и BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>) с использованием нуклеотидных баз данных секвенированных геномов микроорганизмов. Нуклеотидные последовательности изучаемых ОФМ сравнивали с последовательностями, представленными в генном банке (GenBank) с помощью программы BLAST с отбором их по степени сходства, обеспечивающей достаточное разнообразие видов. Последовательности отобранных видов выравнивали посредством программы MEGA 5.1 (<http://www.megasoftware.net/>) с использованием алгоритма ClustalW v.1.6. Для филогенетических построений использовали метод кластеризации - метод ближайшего соседа (Neighbor-Joining) с предварительным выбором оптимальной эволюционной модели нуклеотидных замен (MEGA 5.1). Статистическую надежность топологий получаемых деревьев оценивали с помощью бутстреп-анализа в 1000 повторностях (MEGA 5.1).

### Глава 3.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**3.1. Пространственно-временная динамика ОФМ, ассоциированных с колониальным гидроидом *Dynamena pumila*.** В летний период на первых пяти междуузлиях беломорских гидроидов *D. pumila* присутствуют одноклеточные и трихомные цианобактерии, диатомовые и зеленые водоросли.

*Диатомовые водоросли.* В июне встречались только «прикрепленные» формы *Cocconeis scutellum*, *C. costata* и *Licmophora* sp. В августе видовое богатство диатомей увеличилось до 20 таксонов. В июне средние значения численности (N) и биомассы (B) диатомей составили  $2,09 \pm 1,85$  тыс. кл./мм<sup>2</sup> и  $0,130 \pm 0,115$  мкг С/мм<sup>2</sup>,



соответственно. В августе значения N и В были достоверно ( $p < 0,02$ ) ниже, чем в июне, средние значения составили  $1,45 \pm 2,74$  тыс. кл./мм<sup>2</sup> и  $0,091 \pm 0,170$  мкг С/мм<sup>2</sup>. По биомассе в июне и в августе доминировал *C. scutellum*.

*Цианобактерии*. Как в июне, так и в августе, отмечены трихомные формы, по морфологическим признакам принадлежащие к III и IV субсекциям, и одноклеточные формы. В июне N цианобактерий менялась от 0,53 до 292,50 тыс. кл./мм<sup>2</sup> в зависимости от локализации на побегах гидроида. Наибольшая N отмечалась в местах слияния гидротечи со стволом гидроида. В июне средние значения N и В составили  $27,02 \pm 60,86$  тыс. кл./мм<sup>2</sup> и  $0,54 \pm 1,23$  мкг С/мм<sup>2</sup>, соответственно. В августе N и В были высоко достоверно ( $p < 0,01$ ) больше, чем в июне, средние значения составили  $100,73 \pm 124,00$  тыс. кл./мм<sup>2</sup> и  $2,03 \pm 2,44$  мкг С/мм<sup>2</sup>, соответственно.

В июне величины биомассы диатомей и цианобактерий достоверно не различались ( $p = 0,72$ ), тогда как в августе биомасса цианобактерий была высоко достоверно ( $p < 0,01$ ) больше биомассы диатомей.

Сравнительный анализ полученных результатов с опубликованными данными показал следующее. Состав эпибионтных диатомей в целом согласуется с ранее опубликованными данными (Лобакова и др., 2008; Горелова и др., 2009). Такие диатомеи, как *Cocconeis costata*, *Ceratoneis closterium*, *Nitzschia* cf. *sigma*, *Navicula* spp., *Fragilaria* sp. на *D. pumila* отмечены впервые. Некоторые диатомеи, выявленные на гидроиде ранее, в исследованных нами образцах отсутствовали. Вариабельность состава может быть обусловлена как сезонной динамикой, так и зависимостью от локальных гидрологических условий, в которых обитают колонии гидроида. Доминирование среди диатомей водоросли *Cocconeis scutellum*, которая является «приросшей» формой, свидетельствует о начальном этапе развития эпибионтного сообщества. Это согласуется с возрастом исследованных междуузлий – максимум 2 недели. В зрелых эпибионтных сообществах преобладают диатомеи, прикрепляющиеся к субстрату слизистым тяжом. Видовое богатство эпибионтных диатомей на молодых междуузлиях *D. pumila* меньше такового в зрелых эпибионтных сообществах на беломорских макрофитах (Бондарчук, 1970; Георгиев,

2010) и на средиземноморском гидроиде *Eudendrium racemosum* (Romagnoli et al., 2007), тогда как величины численности и биомассы диатомей оказались сопоставимыми. Численность и биомасса эпибионтных цианобактерий на гидроиде *D. pumila* были больше, чем аналогичные оценки для *E. racemosum* (Romagnoli et al., 2007). Сезонная динамика обилия эпибионтных диатомей и цианобактерий на *D. pumila* сходна с таковой на *E. racemosum*. Выявленная пространственная изменчивость обилия эпибионтных диатомей и цианобактерий может быть обусловлена разным возрастом междуузлий, наличием благоприятных для колонизации зон на теле гидробионта, а также микромасштабной неоднородностью гидрологических условий.

**3.2. Идентификация кислородных фототрофных микроорганизмов, ассоциированных с колониальным гидроидом *Dynamena pumila*.** Из ассоциаций с *D. pumila* было выделено четыре изолята ОФМ, которые идентифицированы по совокупности морфологических, ультраструктурных характеристик, составу пигментов и филогенетическому анализу (табл. 1).

**3.2.1. Цианобактерия *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1.** *Морфология, ультраструктура и пигментный состав.* Одноклеточная цианобактерия, клетки не имеют слизистых чехлов. Деление происходит перетяжкой поперечно в одной плоскости. Бинарное деление приводит к образованию двух дочерних клеток как одинаковой, так и разной длины. Форма клеток – палочки, длина 1,5-2,0 мкм, диаметр 0,6-0,8 мкм. Рельеф поверхности клеток складчатый. В протопласте находятся по 2-3 периферически расположенных тилакоида, в центре нуклеотид, карбоксисомы. Резервные полимеры представлены гранулами поли-β-гидроксибутирата, цианофициновые гранулы отсутствуют (Koksharova et al., 2013).

*Молекулярно-генетическое типирование и филогенетический анализ.* Определен фрагмент ДНК размером 2277 пар нуклеотидов (п.н.), содержащий большую часть гена 16S рРНК, внутренний транскрибируемый спейсер 16S-23S рРНК и часть гена 23S рРНК. Сравнение полученной нуклеотидной последовательности с общей коллекцией последовательностей ДНК в GenBank показало, что *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1 не имеет полного сходства ни с одним ранее исследованным организмом.

Полная нуклеотидная последовательность была депонирована в генный банк (GenBank) как *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1 (HM064496.1) (Кокшарова и др., 2010; Kravzova et al., 2012; Koksharova et al., 2013).

**Таблица 1.** Таксономическое положение типированных изолятов.

Изолят	Номенклатура бактерий (Castenholz, 2001)	Ботаническая номенклатура (www.algaebase.org)	ОФМ
1Dp66E-1	Субсекция I (Chroococcales)	Фила Цианобактерия Класс ЦианопHYCEAE Порядок Synechococcales Семейство Synechococcaceae Род <i>Synechococcus</i>	<i>Synechococcus</i> sp. 1Dp66E-1
2Dp86E	Субсекция III (Oscillatoriales)	Фила Цианобактерия Класс ЦианопHYCEAE Порядок Pseudanabaenales Семейство Pseudanabaenaceae Род <i>Leptolyngbya</i>	<i>Leptolyngbya</i> sp. 2Dp86E
10Dp66E	Субсекция IV (Nostocales)	Фила Цианобактерия Класс ЦианопHYCEAE Порядок Nostocales Семейство Nostocaceae Род <i>Nostoc</i>	<i>Nostoc</i> sp. 10Dp66E
3Dp86E-1	—	Тип Chlorophyta Класс Chlorophyceae Порядок Sphaeropleales Семейство Scenedesmaceae Род <i>Desmodesmus</i>	<i>Desmodesmus</i> sp. 3Dp86E-1

Филогенетический анализ показал, что *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1 образует кладу, сформированную штаммами *Synechococcus* spp. и *Cyanobium* spp. Клада поддерживается референтным штаммом *Synechococcus* sp. PCC 7009 и объединяет несколько кластеров. Ближайшие родственники беломорского *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1 - планктонные формы, обитающие в разных географических зонах, в пресных и солоноватоводных экосистемах (табл. 2).

**Таблица 2.** Результаты анализа BLAST, полученные с помощью сравнения нуклеотидных последовательностей генного кластера 16S-23S рНК *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1 с гомологичными последовательностями из GenBank.

Ближайший родственник из Генного Банка	Номер клона или штамма в Генном банке	Score	Идентичность, %	Происхождение штамма или клона, литературный источник
<i>Synechococcus</i> sp. BGS171	AF330246.1	3422	93	Озеро Балатон (46 <sup>0</sup> 50 N; 17 <sup>0</sup> 44 E), (Ernst et al., 2003).
<i>Synechococcus</i> sp. BO8806	AF317072.1	3388	94	Боденское озеро (47 <sup>0</sup> 39 N; 9 <sup>0</sup> 19 E), (Ernst et al., 2003).
<i>Synechococcus</i> sp. BO983115	AF317078.1	3377	94	
<i>Synechococcus</i> sp. BO981502	AF317077.1	3341	94	
<i>Cyanobium</i> sp. Sai004	GU935365.1	3296	94	Водоохранилище, Саксония, Европа, (не опубл.).
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7009	AM709628.1	3431	94	Озеро, Калифорния, США. Референтный штамм, (не опубл.).
<i>Cyanobium</i> sp. Suigetsu-CR3	AB610888.1	3465	95	Меромиктическое озеро Суйгецу (35 <sup>0</sup> 35'N; 135 <sup>0</sup> 52'E), отделившееся от Японского моря, (Ohki et al., 2009).
<i>Cyanobium</i> sp. Suigetsu-CR4	AB610887.1	3465	95	
<i>Cyanobium</i> sp. Suigetsu-CG1	AB610890.1	3465	95	
<i>Cyanobium</i> sp. Suigetsu-CG3	AB610892.1	3469	95	
<i>Synechococcus</i> sp. BS20	AF330254.1	3321	94	Балтийское море, (Ernst et al., 2003).

**3.2.2. Цианобактерия *Leptolyngbya* sp. 2Dp86E.** *Морфология, ультраструктура и пигментный состав.* Однорядные неветвящиеся трихомы сильно изогнуты или переплетены между собой, окружены слоистыми чехлами. Клетки цилиндрические или бочковидные, длина 1,5-2,5 мкм, диаметр 1,0-1,5 мкм, делятся бинарно в одной плоскости. Дифференцированные клетки отсутствуют. В центре клетки расположен компактный нуклеоид, рибосомы и карбоксисомы, по периферии вдоль продольной клеточной стенки располагаются тилакоиды (Koksharova et al., 2013).

*Молекулярно-генетическое типирование и филогенетический анализ.* Определена нуклеотидная последовательность рибосомального кластера (1732 п.н.), содержащего большую часть гена 16S рНК, внутренний транскрибируемый спейсер 16S-23S рНК и часть гена 23S рНК. Последовательность *Leptolyngbya* sp.

2Dp86E депонирована в GenBank как *Oscillatoriales* cyanobacterium 2Dp86E (GU265558.1). Эта цианобактерия не имеет полного сходства ни с одним ранее исследованным организмом (Кокшарова и др., 2009; Лобакова и др., 2010; Горелова и др., 2012б; Кравцова и др., 2012; Koksharova et al., 2010, 2013; Kravzova et al., 2012).

Филогенетический анализ выявил общую кладу для последовательностей *Leptolyngbya* sp. 2Dp86E и цианобактерий родов *Leptolyngbya*, *Nodosolinea*, *Phormidium*, а также других представителей порядков Pseudanabaenales и Oscillatoriales. Ближайшие родственники *Leptolyngbya* sp. 2Dp86E обитают как в наземных, так и водных экосистемах, они отмечены в планктоне и бентосе пресных и морских водоемов (табл. 3).

**3.2.3. Цианобактерия *Nostoc* sp.10Dp66E. Морфология, ультраструктура и пигментный состав.** Трихомы этой цианобактерии окружены мощными слизистыми чехлами, клетки округлой формы 2,5-3,5 мкм в диаметре. Между вегетативными клетками располагаются гетероцисты и акинеты. Трихомы объединены колониальной слизью. Тилакоиды располагаются неупорядоченно, присутствуют цианофициновые гранулы (Горелова и др., 2012б; Koksharova et al., 2013).

*Молекулярное генетическое типирование и филогенетический анализ.* Определен фрагмент ДНК размером 1902 п.н., содержащий большую часть гена 16S рРНК, внутренний транскрибируемый спейсер 16S-23S рРНК и часть гена 23S рРНК. Последовательность *Nostoc* sp.10Dp66E депонирована в GenBank (JQ259187.1). Она не имеет полного сходства ни с одним ранее исследованным организмом (Горелова и др., 2012б; Кравцова и др., 2012; Kravzova et al., 2012; Koksharova et al., 2013). Филогенетический анализ выявил, что *Nostoc* sp. 10Dp66E образует отдельную ветвь и проявляет наибольшее сходство с *Nostoc commune* NC1, *Nostoc commune* NC5, *Calothrix* spp. (табл. 4). Сравнение морфологических признаков *Nostoc* sp. 10Dp66E с диагнозами *Nostoc commune* (Komárek, Anagnostidis, 1989) и по результатам сравнения вставок и потерь парных и одиночных нуклеотидов, *Nostoc* sp. 10Dp66E и *Nostoc commune* NC1 (EU586149.1) являются разными видами (идентичность 94%). Ближайшие родственники *Nostoc* sp. 10Dp66E обитают в наземных экосистемах.

**Таблица 3.** Результаты анализа BLAST, полученные с помощью сравнения нуклеотидных последовательностей генного кластера 16S-23S рНК *Leptolyngbya* sp. 2Dp86E с гомологичными последовательностями из GenBank.

Ближайший родственник из Генного Банка	Номер клона или штамма в Генном банке	Score	Идентичность, %	Происхождение штамма или клона, литературный источник
<i>Leptolyngbya</i> PCC7104	AB039012.1	2035	99	Монтаукский национальный парк, Нью-Йорк, США, (Ishida et. al., 2001).
<i>Leptolyngbya</i> sp. LEGE 07298	HM217044.1	2013	99	Донные отложения устьев рек Португалии, (Lopes et. al., 2012).
<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB24S04	AJ639893.1	2082	99	Озера Бубано, Басин, Имола, север Италии, (Castiglioni et. al., 2004).
<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB32S02	AJ639894.1	2033	99	
<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB19S12	AJ639895.1	2046	99	
<i>Phormidium</i> sp. SAG 61.90	EU624415.1	2013	98	Морской штамм, коллекция культур Ю. Карстен (Университет Росток, Германия), (Siegesmund et. al., 2008).
<i>Pseudanabaenaceae</i> cyanobacterium DPG1-KK5	EF654067.1	2771	96	Коллекция культур Ю. Карстен (Университет Росток, Германия), (Siegesmund et.al. 2008).
<i>Oscillatoria neglecta</i> IAM M-82	AB003168.1	1956	98	д.о. (Ishida et al., 1997).
<i>Nodosolinea nodulosa</i> UTEX 2910	EF122600.1	1954	99	Планктон, Южно-Китайское море, (Perkerson et. al., 2011).
<i>Leptolyngbya</i> N. <i>bijugata</i> str. Kovacic1986/5aa	EU528669.2	2475	92	Прибрежная зона озера Розплуце, Польша, (Casamatta, Johansen, не опубл.).
<i>Leptolyngbya</i> sp. SEV4-5-c1	EU528667.2	2152	97	Почвы пустыни, (Casamatta, Johansen, не опубл.).
<i>Nodosolinea</i> sp. FI2-2HA2	HM018678.1	2596	95	Почвы пустыни Форт Ирвин Мойове, Калифорния, США, (Perkerson et al., 2011).

Примечание: д.о. - данные отсутствуют

В ассоциации с *Nostoc* sp. 10Dp66E в результате молекулярно-генетического типирования выявлена некультивируемая гетеротрофная бактерия *Gemmatimonas* (JX437625) (925 п.н.). Эта бактерия является представителем новой бактериальной XXIV филы «*Gemmatimonadetes*». Идентифицированная бактерия имеет наибольшее сходство с *Gemmatimonas aurantiaca* T-27<sup>T</sup> (Takasaki et al., 2012).

**Таблица 4.** Результаты анализа BLAST, полученные с помощью сравнения нуклеотидных последовательностей генного кластера 16S-23S рРНК последовательности *Nostoc* sp. 10Dp66E с гомологичными последовательностями из GenBank.

Ближайший родственник из Генного банка	Номер клона или штамма в Генном банке	Score	Идентичность, %	Происхождение штамма или клона, литературный источник
<i>Nostoc commune</i> NC1	EU586726.1	2693	94	д.о. (Johansen et al., не опублик.).
<i>Nostoc commune</i> NC5 clone 11	EU586728.1	2666	94	д.о. (Johansen et al., не опублик.).
<i>Nostoc commune</i> NC1	EU784149.1	2681	94	Луговые почвы, вблизи Врбенских прудов, Ческе-Будеевице, Чехия, (Rehakova et al., 2007, не опублик.).
<i>Calothrix</i> sp. HA4356-MV2	JN385289.1	2634	92	Стены пещеры Гавайи, (Vaccarino, Johansen, 2011).
<i>Calothrix</i> sp. HA4356-MV2	JN385288.1	2232	96	Стены пещеры, Гавайи, (Vaccarino, Johansen, 2011).

Примечание: д.о. - данные отсутствуют

**3.2.4. Зелёная водоросль *Desmodesmus* sp. 3Dp86E-1. Морфология, ультраструктура и пигментный состав.** Одноклеточная водоросль, клетки округлой формы 4,5-9 мкм в диаметре, без жгутиков. Размножение осуществляется автоспорами (по 8 и более в одном спорангии). Клеточная стенка состоит из спорополленинового и полисахаридного слоев. На внешнем слое клеточной стенки располагаются структуры в виде трубочек и бородавок. Хлоропласт имеет лопастную форму, окружен оболочкой из двух мембран, содержит пиреноид. Запасные продукты представлены липидными глобулами, крахмальными зёрнами и гранулами, подобными полифосфатным или фенольным (Горелова и др., 2012а; Лобакова и др., 2012). Состав пигментов соответствует таковому представителей Chlorophyta.

*Молекулярно-генетическое типирование* изолята проведено сотрудниками кафедры биоинженерии. *Филогенетический анализ* проведен автором. Получен фрагмент ядерной ДНК (всего 500 п.н.), содержащий внутренний транскрибируемый межгенный спейсер ITS1-5,8-ITS2. Последовательность *Desmodesmus* sp. 3Dp86E-1

депонирована в GenBank (JQ313132.1) и не имеет полного сходства ни с одним ранее исследованным организмом.

При анализе последовательности *Desmodesmus* sp. 3Dp86E-1 выявлено, что водоросль кластеризуется со значениями бутстрэп-поддержки не ниже 50% с представителями рода *Desmodesmus* (табл. 5). В кластере объединились *Desmodesmus* spp., различающиеся по биотопическим характеристикам (планктонные и эпибионтные формы) и по отношению к солености (обитают как в пресных, так и морских водах).

**Таблица 5.** Результаты анализа BLAST, полученные с помощью сравнения нуклеотидных последовательностей, содержащих внутренние транскрибируемые спейсеры ITS-1-5,8-ITS-2 ядерной ДНК микроводоросли *Desmodesmus* sp. 3Dp86E-1, с гомологичными последовательностями из GenBank.

Ближайший родственник из Генного Банка	Номер клона штамма в Генном банке	Score	Идентичность, %	Происхождение штамма или клона, литературный источник
<i>Desmodesmus</i> sp . FG	JX046421.1	897	99	Планктон морских прибрежных вод, юго-восток побережья Аргентины, (Do Nascimento et al., 2012).
<i>Desmodesmus</i> sp. M1-20	JX046420.1	897	99	
<i>Desmodesmus</i> sp. 2CL66E	JQ313131.1	886	99	Ассоциация с гидроидом <i>Coryne lovenii</i> , Белое море, (не опубл.).
<i>Desmodesmus</i> sp. 1Pm66B	JQ313134.1	886	99	Ассоциация с трохофорной личинкой полихеты <i>Phyllodoce maculate</i> , Белое море, (не опубл.).
<i>Desmodesmus</i> sp 1Hp86E-2	JQ313133.1	883	99	Ассоциация с губкой <i>Halichondria panacea</i> , Белое море, (не опубл.).
<i>Desmodesmus bicellularis</i> isolate NDem 9/21 T-17d	DQ417558.1	655	90	Пруд Итаского Национального парка, Миннесота (не опубл.).
<i>Desmodesmus komarekii</i> isolate Tow 10/11 T-16W	DQ417562.1	655	90	
<i>Desmodesmus multivariabilis</i> var. <i>turskensis</i> isolate Mary 8/18 T-1W	DQ417525.1	767	94	Озеро Мери, Итаский Национальный парк, Миннесота, (не опубл.).



Анализ характера замен нуклеотидов в высоко консервативном фрагменте внутреннего транскрибируемого межгенного спейсера (ITSI) ядерной ДНК даёт основания отнести водоросли *Desmodesmus* sp. 3Dp86E-1, *Desmodesmus* sp. 1Pm66B, *Desmodesmus* sp. 2C166E и *Desmodesmus* sp. 1Hp86E-2, выделенные из беспозвоночных животных Белого моря, к близкородственным видам одной монофилетической группы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было оценено обилие эпибионтных диатомей и цианобактерий на первых пяти (молодых) междуузлиях гидроида *D. pumila*. На междуузлиях большего возраста, начиная с шестого, присутствует уже многослойная пленка обрастаний с гораздо более высокой численностью эпибионтных ОФМ (Gorelova et al., 2013). Количественные данные по обилию эпибионтных ОФМ на междуузлиях *D. pumila* большего возраста отсутствуют. Мы рассчитали биомассу эпибионтных ОФМ на поверхности одной колонии гидроида *D. pumila* с учетом средней биомассы ОФМ на молодых побегах и площади поверхности колонии *D. pumila*, понимая, что эти оценки являются заниженными. Тем не менее, полученные ориентировочные оценки дают возможность сравнить величины биомассы эпибионтных ОФМ и биомассы бентосных водорослей. Даже заниженные оценки биомассы эпибионтных ОФМ на одной колонии гидроида оказались сопоставимыми с биомассой микрофитобентоса под 1 см<sup>2</sup> (Удалов и др., 2004). А если учесть, что на 1 см<sup>2</sup> субстрата может в среднем обитать 4 колонии гидроида *D. pumila* (Марфенин, 1993), то биомасса эпибионтных ОФМ окажется даже больше таковой микрофитобентоса.

Исходя из биомассы эпибионтных ОФМ и рассчитанной максимальной удельной скорости роста разных размерных классов ОФМ, мы оценили максимальную величину первичной продукции эпибионтных ОФМ. Согласно расчетам, эпибионтные ОФМ на гидроиде *D. pumila* могут вносить существенный вклад в процессы первичного продуцирования в прибрежной зоне.

Из ассоциации с гидроидом *D. pumila* было выделено четыре изолята ОФМ, которые успешно поддерживаются в лабораторных культурах. Эти ОФМ идентифицированы как цианобактерии *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp. и зеленая водоросль *Desmodesmus* sp. Генотипы всех четырех ОФМ оказались уникальными. Филогенетический анализ типированных *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp. и *Desmodesmus* sp. показал, что их ближайшие родственники обитают в разных биотопах как морских, так и пресных водоемов разных широт на нескольких материках. Мы полагаем, что сезонная вариабельность абиотических условий в Белом море, в частности, широкие диапазоны варьирования температуры, освещенности, солености, концентрации биогенных элементов способствует отбору генотипов, которые обеспечивают адаптацию к широкому набору условий. По-видимому, этим обусловлено близкое родство беломорских *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp. и *Desmodesmus* sp. с пресноводными формами.

Вследствие способности адаптироваться к широкому диапазону условий, многие арктические ОФМ могут быть выведены в культуры. Помимо культур, типированных как *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp. и *Desmodesmus* sp., из ассоциаций с другими беломорскими беспозвоночными животными было выделено несколько десятков культур цианобактерий и 19 культур эукариотных одноклеточных водорослей, не имеющих жестких панцирей (Лобакова и др., 2012; Горелова и др., 2012а), которые успешно ведутся в музее культур кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Полученные культуры беломорских *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp. и *Desmodesmus* sp. в перспективе могут быть использованы в практических целях для получения биотехнологически ценных соединений.

Для Белого моря показано наличие пикоцианобактерий в планктоне, оценены их численность и биомасса, однако идентификация до вида не проводилась (Ильяш, 1998; Белевич, Ильяш, 2012). Согласно литературным данным, в полярных водах планктонные пикоцианобактерии представлены почти исключительно родом *Synechococcus* (Vincent, 2000). Это дало основание предполагать, что виды рода

*Synechococcus* присутствуют и в планктоне Белого моря (Белевич, Ильяш, 2012). Результаты наших исследований доказывают присутствие *Synechococcus* sp. в биоте Белого моря. Учитывая связь между планктонным и эпибионтными сообществами (Wahl, 1989, 2009), можно ожидать присутствие *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1 и в планктоне Белого моря.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей показал, что в Белом море в ассоциациях с гидроидами *Dynamena pumila*, *Coryne lovenii*, губкой *Halichondria panicea* и трохофорными личинками полихеты *Phyllodoce maculate* обитают близкородственные виды *Desmodesmus*, представители одной монофилетической группы. Это может свидетельствовать о специфичности представителей рода *Desmodesmus* в выборе базибионта.

В биоте Белого моря ранее было идентифицировано несколько видов цианобактерий рода *Leptolyngbya* и *Nostoc* (Белякова, 1996; Уланова, 2003; Давыдов, 2006). Сравнение нуклеотидных последовательностей, депонированных в Генном банке, и морфологических признаков с диагнозами ранее идентифицированных видов этих родов, показало, что *Leptolyngbya* sp. 2Dp86E и *Nostoc* sp. 10Dp66E являются новыми видами для биоты Белого моря. Идентификация новых видов расширяет современные представления о биоразнообразии оксигенных фототрофных организмов Белого моря и Арктики в целом.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые количественно оценена биомасса диатомовых водорослей и цианобактерий в эпибионтном сообществе на молодых междуузлиях беломорского гидроида *Dynamena pumila* в летний период. Биомасса эпибионтных диатомей и цианобактерий на отдельных участках междуузлий варьирует в значительной степени.

2. Обилию эпибионтных диатомовых водорослей и цианобактерий присуща выраженная сезонная изменчивость. Биомасса диатомей снижалась от июня к августу, тогда как биомасса цианобактерий возрастала. В июне величины биомассы

диатомовых водорослей и цианобактерий достоверно не различались, тогда как в августе биомасса цианобактерий была больше биомассы диатомей.

3. Впервые в ассоциации с гидроидом *Dynamena pumila* идентифицированы цианобактерии *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp. и гетеротрофная бактерия *Gemmatimonas* sp. (ассоциирована с *Nostoc* sp.). Подтверждено присутствие в ассоциации зеленой водоросли *Desmodesmus* sp.

4. Филогенетический анализ типированных *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp. и *Desmodesmus* sp. показал, что их ближайшие родственники обитают в разных биотопах как морских, так и пресных водоемов разных широт на нескольких материках.

5. Зеленая водоросль *Desmodesmus* sp., ассоциированная с гидроидом *Dynamena pumila*, формирует одну монофилетическую группу с представителями рода *Desmodesmus*, ассоциированными с другими беспозвоночными животными Белого моря.

6. Цианобактерии *Leptolyngbya* sp. 2Dp86E и *Nostoc* sp. 10Dp66E являются новыми видами для биоты Белого моря.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Горелова О.А., Баулина О.И., Соловченко А.Е., Федоренко Т.А., Кравцова Т.Р., Чивкунова О.Б., Кокшарова О.А., Лобакова Е.С. Зелёные микроводоросли, изолированные из ассоциации с беспозвоночными Белого моря // Микробиология. 2012а. Т. 81. № 4. С.505-507.

2. Кравцова Т.Р., Лазебная И.В., Лазебный О.Е., Волкова Е.Ю., Федоренко Т.А., Горелова О.А., Баулина О.И., Лобакова Е.С., Васетенков А.Е., Кокшарова О.А. Молекулярная филогения зелёной микроводоросли, изолированной из *Halichondria panicea* (P., 1766) Белого моря // Физиология растений. 2013. Т. 60. № 4. С. 569-573.

3. Koksharova O.A., Kravzova T.R., Lazebnaya I.V., Gorelova O.A., Baulina O.I., Lazebny O.E., Fedorenko T.A., Lobakova E.S. Molecular identification, ultrastructural and phylogenetic study of cyanobacteria from association with the White sea hydroid *Dynamena Pumila* (L., 1758) // BioMed Research International. 2013. V. 2013. (11 pages). <http://dx.doi.org/10.1155/2013/760681>

Материалы конференций и тезисы:

1. Лобакова Е.С., Кокшарова О.А., Федоренко Т.А., Баулина О.И., Кравцова Т.Р., Омарова Е.О., Горелова О.А. Азотфиксирующие цианобактерии в симбиозе с беломорским гидроидным полипом *Dynamena pumila* (L.,1758) //

Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера. Тезисы докладов Международной научной конференции. 7-11 июня 2009 года, г. Апатиты, Россия. Апатиты: ООО «КаЭМ», 2009. С. 193-195.

2. Кокшарова О.А., Федоренко Т.А., Кравцова Т.Р., Омарова Е.О., Горелова О.А., Лобакова Е.С. Идентификация цианобактерий, изолированных из гидроидного полипа *Dynamena pumila* (L.,1758) // Бюллетень МОИП. Отд. биологический. 2009. Т. 114. Вып. 2. Прилож. 1. С. 137-139.

3. Кокшарова О.А., Горелова О.А., Кравцова Т.Р., Федоренко Т.А., Лазебная И.В., Баулина О.И., Лобакова Е.С. Цианобактерии – симбионты гидроидного полипа *Dynamena pumila* (L.,1758) // Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах. Материалы Международной конференции к 100-летию со дня рождения проф. Э. А. Штины. 11-15 октября 2010 года, г. Киров, Россия. Киров: Вятская ГСХА, 2010. С. 167-171.

4. Koksharova O.A., Kravzova T.R., Fedorenko T.A., Omarova E.O., Gorelova O.A., Baulina O.I., Lobakova E.S. Associations between the White Sea invertebrates and oxygen-evolving phototrophic microorganisms: a phylogenetic study // Molecular Phylogenetics. Materials 2<sup>nd</sup> Moscow international conference. May 18-21, 2010, Moscow, Russia. М.: Torus Press, 2010. P. 118.

5. Лобакова Е.С., Кравцова Т.Р., Федоренко Т.А., Косевич И.А., Баулина О.И., Кокшарова О.А., Горелова О.А. Нитчатая цианобактерия – симбионт гидроидных полипов // Автотрофные микроорганизмы. Материалы Всероссийского симпозиума к 80-летию биологического ф-та МГУ им. М.В. Ломоносова, 85-летию со дня рождения акад. Е.Н. Кондратьевой. 23-26 декабря 2010 года, г. Москва, Россия. М.: Макс Пресс, 2010. С. 65.

6. Лобакова Е.С., Баулина О.И., Соловченко А.Е., Федоренко Т.А., Кравцова Т.Р., Горелова О.А. Микроводоросли, ассоциированные с беспозвоночными животными Белого моря // Биологически активные вещества микроорганизмов. Прошлое, настоящее, будущее. Материалы Всероссийского симпозиума к 90-летию заслуженного проф. Московского ун-та Н.С. Егорова. 27-29 января 2011года, г. Москва, Россия. М.: Макс Пресс, 2011. С. 77.

7. Gorelova O., Koksharova O., Kravzova T., Lazebnaya I., Baulina O., Fedorenko T., Kosevich I., Lobakova E. Cyanobacteria associated with the White sea hydroid // Proceedings of the 4<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists. FEMS. June 26-30, 2011, Geneva, Switzerland. 2011. P. 2408.

8. Лобакова Е.С., Баулина О.И., Федоренко Т.А., Кравцова Т.Р., Кокшарова О.А., Горелова О.А. Микроводоросли, ассоциированные с беспозвоночными Белого моря: выделение и ультраструктура // Актуальные проблемы современной альгологии. Тезисы докладов IV Международной конференции. 23-25 мая 2012 года, г. Киев, Украина. Киев: Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН, 2012. С. 170-171.

9. Горелова О.А., Кравцова Т.Р., Кокшарова О.А., Лазебная И.В., Баулина О.И., Федоренко Т.А., Лобакова Е.С. Морфологическое и молекулярное типирование цианобактерий, ассоциированных с колониальным гидроидом *Dynamena pumila* // Актуальные проблемы современной альгологии. Тезисы докладов IV

Международной конференции. 23-25 мая 2012 года, г. Киев, Украина. Киев: Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН, 2012б. С. 81-82.

10. Кравцова Т.Р., Горелова О.А., Кокшарова О.А., Баулина О.И., Федоренко Т.А., Ильяш Л.В., Лобакова Е.С. Фототрофные микроорганизмы, изолированные из беломорских ассоциаций с колониальным гидроидом *Dynamena pumila* (L., 1758) // Физиология и биотехнология микроводорослей. Тезисы докладов Международной конференции к 80-летию со дня рождения В.Е. Семененко. 16-19 октября 2012 года, г. Москва, Россия. М.: Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 2012. С. 81.

11. Kravzova T.R., Lazebnaya I.V., Fedorenko T.A., Gorelova O.A., Lobakova E.S., Koksharova O.A. Phylogenetic study of new cyanobacteria associated with the White Sea invertebrates // Molecular Phylogenetics. Materials 3<sup>rd</sup> Moscow international conference. July 31 - August 4, 2012, Moscow, Russia. М.: Torus Press, 2012. P. 143.

Автор приносит глубокую и искреннюю благодарность научным руководителям проф. Л.В. Ильяш и д.б.н. О.А. Кокшаровой за постоянную помощь в работе и поддержку. Автор выражает особую благодарность проф. Е.С. Лобаковой, д.б.н. О.А. Гореловой и д.б.н. О.И. Баулиной за совместную экспериментальную работу, неоценимую помощь при проведении лабораторных исследований и обсуждение полученных результатов. Автор благодарен своим друзьям и коллегам к.б.н. Т.А. Федоренко, к.б.н. О.Б. Чивкуновой, к.б.н. И.В. Лазебной, А.А. Поповой и всем сотрудникам кафедры биоинженерии за помощь в работе, внимание и теплую дружескую атмосферу, сложившуюся в коллективе. Автор признателен проф. Н.Н. Марфенину за высококвалифицированные консультации.