

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ  
ім. Д.К.ЗАБОЛТНОГО

на правах рукопису

ІВАНИЦЯ

Володимир Олексійович

СТАН ТА МІНЛИВІСТЬ МІКРОБНИХ ЦЕНОЗІВ  
МОРСЬКИХ ЕКОСИСТЕМ

03.00.07 - мікробіологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

ОДЕСА - 1995



АВ 33. (2)

Робота виконана на кафедрі мікробіології і вірусології Одеського державного університету ім.І.І.Мечникова.

Офіційні опоненти: - доктор біологічних наук,  
професор Гвоздяк П.І.  
доктор біологічних наук,  
професор Сіренко Л.Я.  
доктор біологічних наук,  
професор Ставська С.С.

Провідна установа: - Інститут біології південних  
морів ім. О. О. Ковалевського  
НАН України (Одеська філія)

Захист відбудеться "21" лютого 1996 р. о 10-ій годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.81.01 по захисту дисертацій на здобуття вченого ступеня доктора біологічних наук при Інституті мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України за адресою: 252143, Київ-143, вул.Заболотного, 154.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України.

Автореферат дисертації розіслано "20" січня 1996 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність проблеми.** Мікроорганізми є невід'ємною складовою частиною будь-якого біоценозу, життєво необхідною для функціонування і саморегулювання морських екосистем і біосфери в цілому. Їх біохімічна діяльність визначає глобальний механізм взаємодії гідросфери та атмосфери і формує умови існування усіх інших організмів.

В умовах антропогенного забруднення мікроорганізми відтворюють природний "фон" і визначають "імунітет" морської екосистеми (Израэль, Цыбань, 1989). У свою чергу хімічне забруднення, впливає на склад мікробних угруповань, змінює швидкість і напрямки біогеохімічних процесів, що призводить до глобальних змін в біосфері.

Незважаючи на те, що мікробіологічні дослідження Світового океану активно розвиваються, все ж невідомо, які зміни відбуваються у складі мікробних ценозів в сучасних умовах та в якому напрямі змінюються еколого-фізіологічні властивості гетеротрофних бактерій.

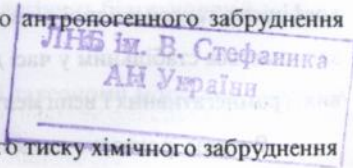
Припускається, що токсиканти здійснюють тиск на генетичний апарат і створюють умови для техногенної мікроеволюції мікроорганізмів у напрямку зростання їх агресивності (Иваница, 1990).

Довгострокові дослідження районів Світового океану з різним рівнем антропогенного навантаження дозволять виявити закономірності мінливості мікробних ценозів і створити систему об'єктивних показників для оцінки стану морських екосистем.

**Мета роботи:** визначення особливостей складу і закономірностей мінливості мікробних ценозів та еколого-фізіологічних властивостей домінуючої мікробіоти за умов глобального антропогенного забруднення морських екосистем.

### Задачі дослідження:

1. Визначення рівня генотоксичного тиску хімічного забруднення



на мікроорганізми морських водойм.

2. Вивчення складу домінуючої мікробіоти морських екосистем з різним рівнем антропогенного навантаження: Чорного, Балтійського, Берінгового та Чукотського морів.

3. Формування та підтримання колекційного фонду штамів морських бактерій.

4. Вивчення поширення гетеротрофних ковзних бактерій у водоймах, їх еколого-фізіологічних особливостей, таксономії та ролі в природних біоценозах.

5. Вивчення рівня деструктивного потенціалу домінуючих гетеротрофних бактерій морських водойм з різним рівнем антропогенного забруднення.

6. Визначення ступеня резистентності до органічних субстратів-токсикантів, солей токсичних металів, антибіотиків домінуючих гетеротрофних бактерій морських водойм.

7. Оцінка ступеня патогенних властивостей домінуючих гетеротрофних бактерій морських екосистем з різним рівнем антропогенного навантаження.

**Наукова новизна.** Вперше проведено широкомасштабне комплексне дослідження і порівняльний аналіз домінуючої гетеротрофної мікробіоти Чорного, Балтійського, Берінгового і Чукотського морів та отримано дані про мінливість мікробних ценозів за умов глобального антропогенного забруднення морських водойм.

Зокрема, показано, що мікробні ценози морських водойм з напруженою екологічною ситуацією, порівняно з фоновими, мають менший коефіцієнт таксономічної різноманітності, який протягом спостережень залишається стабільним у часі для всіх морів, та більшу частку паличкових, грамнегативних і непігментованих форм бактерій.

Вперше показано повсюдне поширення гетеротрофних ковзних

бактерії у водах Світового океану і встановлено закономірності їх розподілу в морському середовищі. Отримано нові дані про біологічні і еколого-фізіологічні особливості, склад жирних кислот, рівень ГЦ-пар, розмір генома, рівень гомології ДНК морських ковзних бактерій та визначена їх роль в мікробних ценозах, як деструкторів органічних сполук. Методами хемотаксономії і геносистематики встановлено рівень філогенетичних зв'язків між ізольованими штамми морських ковзних бактерій і запропоновано підходи до їх таксономії.

Продемонстрована чутливість генетичного апарату мікроорганізмів до дії хімічного забруднення, в дозах, що реально існують в прибережних і відкритих районах моря.

Вперше встановлено, що гетеротрофні бактерії імпактних районів порівняно з фоновими позначаються більш високими рівнями деструктивного потенціалу відносно субстратів-полютантів, резистентності до токсикантів та антибіотиків і патогенності.

Встановлені закономірності дозволяють сформулювати концепцію мікроеволюції мікроорганізмів у напрямку зростання їх адаптивних і агресивних властивостей за умов хронічного хімічного забруднення.

**Практична цінність роботи.** Результати досліджень дозволяють рекомендувати методологічний підхід і систему мікробіологічних методів (визначення складу мікробних ценозів та еколого-фізіологічних властивостей домінуючої мікробіоти) для використання в комплексному екологічному моніторингу морських екосистем.

Ізольовані і досліджені штами бактерій увійшли до складу колекції культур морських мікроорганізмів, що створено в Одеському університеті, і використовуються при розробці екологічних біотехнологій.

**Положення, які захищаються:**

- система знань з екології, біології і таксономії морських ковзних бактерій і ролі їх у природних біоценозах;

- генетичний апарат мікроорганізмів чутливий до дії низьких доз хімічного забруднення, що реально існують у прибережних і відкритих районах морських водойм;

- система поглядів на мінливість складу мікробних ценозів морських екосистем за умов антропогенного забруднення;

- концепція зростання адаптивних (деструкція субстратів-токсикантів, резистентність до токсикантів) та агресивних властивостей (резистентність до антибіотиків, патогенність) гетеротрофних бактерій під тиском хронічного хімічного забруднення природного середовища.

**Конкретна особиста участь автора в одержаних результатах.** Робота виконана автором особисто. До досліджень були залучені співробітники, аспіранти, студенти під безпосереднім керівництвом автора. Дослідження з ДНК-ДНК гібридизації виконані в Інституті мікробіології АН Росії сумісно з к.б.н. О.М.Лисенко; з жирнокислотного складу - в НДІ епідеміології та інфекційних захворювань сумісно з д.б.н. З.П. Васюренко.

**Апробація роботи.** Матеріали та основні положення дисертації доповідалися на VII з'їзді Всесоюзного мікробіологічного товариства (Алма-Ати, 1985 р.), VII з'їзді Українського мікробіологічного товариства (Чернівці, 1989 р.), I Установчому (VIII) з'їзді Українського мікробіологічного товариства (Одеса, 1993 р.), I з'їзді гідроекологічного товариства України (Київ, 1994 г.), республіканській науково-практичній конференції "Шляхи зменшення антропогенного впливу на природні курортні ресурси" (Київ, 1990 г.), Всесоюзній науковій конференції "Людина - океан" (Махачкала, 1990 г.), міжнародній екологічній конференції по захисту та відродженню ріки Дністер "Дністер-SOS" (Одеса, 1993 г.), міжнародному симпозиумі "Антропогенна екологія шельфа, гірл рік і лиманів (Одеса, 1992 г.), міжнародній конференції "Діагноз стану морського середовища Азово-Чорноморського басейну" (Севастополь,

1993 г.), "Black Sea Regional Conference on Environment protection technologies for coastal areas (Varna, 1995 p.), Symposium on ecological chemistry (Kishinau, Moldova, 1995), міжнародній конференції "Біолоїдна хімія і навколишнє середовище" (Київ, 1995 р.), наукових конференціях Одеського університету (1988, 1989, 1993 г.г.), наукових семінарах кафедри мікробіології Московського та Одеського університетів.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 46 експериментальних робіт, у тому числі 21 статтю у вітчизняних та зарубіжних журналах та збірниках.

**Структура та обсяг праці.** Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису методів дослідження, 10 глав викладення результатів дослідження, обговорення, заключення, висновків та списку цитованої літератури (284 першоджерела). Робота викладена на 367 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 65 таблицями, 61 малюнком.

## ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були культури гетеротрофних бактерій, що є домінуючими в мікробних ценозах Чорного (171 культура), Балтійського (223 культури), Берінгового (77 культур), Чукотського (77 культур) морів, причорноморських водойм (295 культур); ковзні бактерії, ізольовані з Чорного моря та інших районів Світового океану (165 штамів), а також колекційні штами роду *Cytophaga*.

Культури домінуючих представників гетеротрофних бактерій були ізольовані з води Чорного моря під час експедицій у 1992 - 1994 р.р., Балтійського моря - у 1982, 1987, 1990 р.р., Чукотського та Берінгового морів - у 1988 р., причорноморських водойм - у 1991-1993 р.р. Чисті культури бактерій Балтійського, Берінгового та Чукотського морів отримано

з первинних ізолятів, що були люб'язно передані нам проф. А.В.Цибань (Інститут глобального клімату та екології АН Росії).

Кількість гетеротрофних бактерій визначали посівом на МПА і РПА. Целюлозолітичні ковзні бактерії - на середовищі Гетчинсона (Егоров, 1976). Ковзні бактерії з протеолітичною активністю - на середовищі СРСК (Іваница, Елинская, 1988). Ковзні бактерії з бактеріолітичною активністю - на середовищі ЕСМ (Mc Curdy, 1981).

Культивування ізольованих морських штамів проводили на середовищі SP-2 (Reichenbach et al., 1981), CY (Reichenbach et al., 1984), Nutrient agar (Christensen et al., 1980).

Вивчення фенотипічних ознак проводили загальноприйнятими методами дослідження, викладеними в "Методы водной микробиологии" (1965), "Методы биологического анализа морской воды" під редакцією А.В.Цибань (1980), "Методы общей бактериологии" під редакцією Ф.Герхарда (1984), за допомогою системи тестування API 20 NE (Biomeieux, France) і біохімічних пластин Нижньо-Новгородського заводу.

Ідентифікацію бактерій проводили за Визначником Бергі (1984) та схемами визначення морських грамнегативних бактерій (Oliver, 1982).

Стійкість до антибіотиків і токсикантів визначали за методом стандартних серійних розбавлень в щільному живильному середовищі.

Генотоксичну дію хімічних сполук та забруднених вод і ґрунту визначали за допомогою тесту, запропонованого Еймсом (Ames et al., 1973; Ames et al., 1975; Панченко, Кіяницька, (1988); генотоксичну дію метаболітів бактерій - за Clarce, Wada (1975); "Методы общей бактериологии" (1984).

Потенційні патогенні властивості морських мікроорганізмів визначали за цитопатичною дією на перещеплених культурах клітин RH, EPC, (Гудзенко и др., 1988) і розробленій первинно-трипсинізованій культурі клітин мантиї мідії *Mytilus galloprovincialis* (Іваница, Джахуди,

Гудзенко, 1993).

Нуклеотидний склад ДНК бактерій вимірювали за методом теплової денатурації (Marmur et al., 1962). Для визначення розміру генома досліджуваних штамів використовували методику Gilles et al. (1970). ДНК мітили за допомогою реакції НК-трансляції (Маниатис и др., 1984).

Імобілізацію ДНК на мембрані проводили за методикою Gillespie and Spiegelman (1965), а реакцію ДНК-ДНК-гібридизації - за методикою De Ley and De Smidt (1975). Реакцію ДНК-ДНК - гібридизації в розчині проводили за методикою De Ley et al. (1970).

Метиллові ефіри жирних кислот готували за модифікованим методом Brian and Gardner (1967). Склад жирних кислот визначали на газовому хроматографі "Цвет-100".

Гідрування застосовували для визначення ненасичених жирних кислот за методом Adams et al. (1960). Бромовання проводили за методом Brian and Gardner (1967) і використовували для визначення циклопропанових кислот. Оксикислоти виявляли трифторацетилюванням за методом Moss et al. (1973).

Математичну обробку отриманих даних виконали за програмою Statgraphics 3.0.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 1. Генетичні наслідки хімічного забруднення морського середовища

Антропогенне забруднення морського середовища хімічними токсикантами набуло глобального характеру (Израэль, Цыбань, 1989). Воно здатне впливати на генетичний апарат мікроорганізмів і призводити до їх зміни, наслідки яких ще не визначені. Можна припустити, що генетичні перебудови сприяють адаптації мікроорганізмів до нових хімічних умов.

Довгострокові дослідження вод Світового океану з різним рівнем

антропогенного забруднення повинні були виявити певні закономірності мінливості мікробних ценозів, що уможливорює створення системи об'єктивних мікробіологічних показників для оцінки стану морських екосистем.

Проведені дослідження на моделі мутантного штаму *Salmonella typhimurium* TA 100 дозволили встановити чутливість генетичного апарату мікроорганізмів до дії хімічних поллютантів у дозах, що реально існують в прибережних і відкритих районах моря.

Мінімальні концентрації окремих органічних і неорганічних токсикантів, що в досліді виявили мутагенну дію (ММК), є значно нижчі за гранично припустимі концентрації (ГПК) цих сполук, встановлені для води рибогосподарських комплексів.

Найвищу мутагенну активність із досліджених сполук мають  $\text{CoCl}_2$  і  $\text{CdCl}_2$  (ММК -  $5 \times 10^{-5}$  мкг/мл) і пропіконазол (ММК -  $6 \times 10^{-6}$  мкг/мл). Це є свідченням того, що і за гранично припустимих концентрацій досліджені сполуки є генетично небезпечними поллютантами, а значення ГПК потребують перегляду.

На прикладі Чорного моря і причорноморських водойм показано глобальний характер поширення генотоксикантів у морському середовищі. Рівень мутагенної активності води у деяких районах перевищував фоновий у 2-64 рази (Табл. 1). Найвищий рівень мутагенного забруднення виявлено в районі Одеської банки.

Значна частина хімічного забруднення, що викликає мутагенний ефект, акумулюється в мулі. Фракції хімічних токсикантів, які вилучаються з мулу розчиненням у воді, в деяких районах Чорного моря в середньому перевищували фоновий рівень у 2-10 разів, органічнорозчинні фракції - у 2-38 разів.

Високі значення генотоксичної дії хімічних поллютантів, як правило, локалізовані в прибережних районах і пов'язані з інтенсивними дже-

Середні значення мутагенної активності води і ґрунту різних районів  
Чорного моря

Район	Час відбору проб	Вода	Ґрунт	
			Неорганічна фракція	Органічна фракція
Одеське прибережжя	10.1992	1,0±0,1	11±0,7	8,0±0,4
	08.1994	4,7±0,5	-	-
Порт	06.1994	1,2±0,2	2,8±0,2	3,5±0,3
Одеська банка	06.1994	1,9±0,1	2,3±0,3	2,9±0,2
	08.1994	64±15	-	-
Дунай-Дністер	10.1992	1,0±0,1	1,6±0,1	1,3±0,1
Дніпро-Буг	10.1992	1,0±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1
Кримське прибережжя	03.1992	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1
	06.1992	5,0±0,2	1,6±0,1	2,8±0,3
Кавказьке прибережжя	06.1992	8,7±0,5	-	-
	10.1992	5,3±0,4	-	-
Півн.західна частина	03.1992	1,0±0,1	2,9±0,3	2,4±0,2
	06.1992	4,1±0,3	2,6±0,2	38±3

Примітка: " - " дослідження не проводили.

релами антропогенного забруднення.

Високий рівень мутагенної активності визначено в Дністровському і Сухому лиманах. Максимальні значення мутагенної активності в Дністровському лимані були вищі за фонові для води в 11 разів, водорозчинної фракції - у 120 разів, органічнорозчинної фракції - у 26 разів; для

води Сухого лиману - у 16 разів, водорозчинної фракції - у 21 раз, органічнорозчинної - у 24 рази.

Порівняльний аналіз дозволив установити високі значення коефіцієнтів кореляції між показниками мутагенної активності та даними хімічного аналізу морської води. Так, для акваторії Одеського прибережжя рівень корелятивних зв'язків ( $r$ ) між мутагенною активністю і присутністю у воді миш'яку, ртуті, заліза, нікелю, поліароматичних вуглеводнів, поліхлорованих біфенілів сягав значень більших за 0,9.

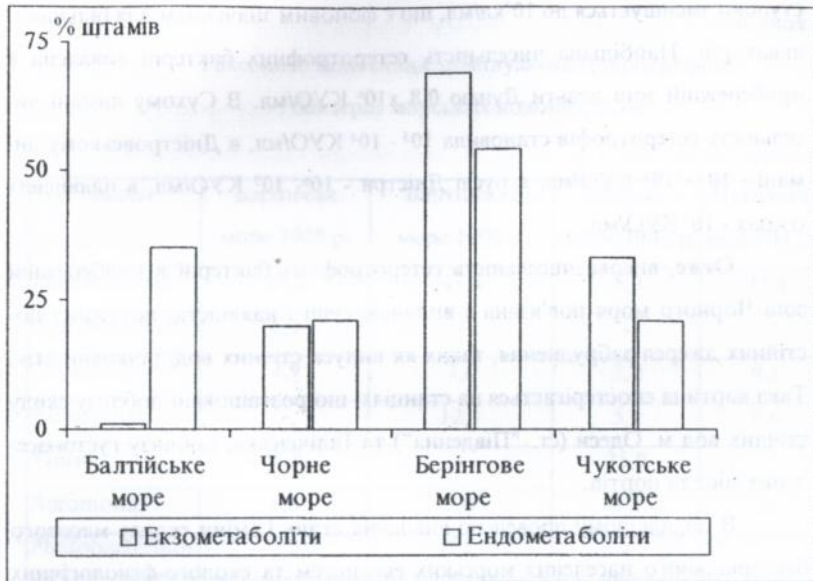
Отже, без сумніву можна констатувати, що мікроорганізми природних водойм перебувають під хронічним тиском токсичних речовин антропогенного походження і чутливо реагують на них змінами у генетичному апараті, які, треба думати, стосуються, в першу чергу, адаптивних еколого-фізіологічних ознак.

Мікроорганізми можуть доповнювати і підсилювати дію генотоксикантів, трансформуючи їх у ще більш токсичні форми. У той же час, проведені дослідження показали, що морські бактерії самі продукують метаболіти з мутагенною активністю. Мутагенна дія ендо- і екзометаболітів визначена на моделі мутантних штамів *E.coli* Rec<sup>-</sup> і *E.coli* PolA<sup>-</sup> для бактерій, ізольованих з Балтійського, Чорного, Берінгового і Чукотського морів (Мал.1).

Проведені дослідження дозволяють стверджувати, що здатність продукувати метаболіти з різним ступенем генотоксичної дії притаманна представникам різних таксономічних груп: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Planococcus*, *Cytophaga*, *Xanthomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*.

Встановлено, що метаболіти досліджених морських бактерій проявляють мутагенну дію вже при концентрації  $10^5$  кл/мл. Слід відзначити, що така щільність бактерій досить поширена в прибережних районах.

Отже, можна зробити висновок, що розвиток домінуючих бактерій мікробних ценозів, які формуються в імпактних районах Світового



Мал.1. Генотоксичні властивості метаболітів гетеротрофних морських бактерій.

океану, підсилює потенційну генетичну небезпеку хімічного забруднення і складає загрозу для генофонду морських екосистем. У морському середовищі можуть виникати умови для техногенної еволюції мікроорганізмів з непрогнозованими властивостями.

## 2. Склад мікробних ценозів морських екосистем

Проведені в 1992-1995 роках дослідження, на прикладі Чорного моря, дозволили констатувати, що найбільша чисельність гетеротрофних бактерій зконцентрована в контактній зоні моря. Це - прибережні райони, лимани, естуарії. Щільність бактеріального населення в цій зоні, як правило, складає близько  $10^5$  кл/мл, а діапазон коливань  $(0,1 - 270) \times 10^3$  КУО/мл. З віддаленням у відкрите море концентрація гетеротрофів по-

ступово зменшується до  $10^3$  кл/мл, що є фоновим значенням для більшості акваторій. Найбільша чисельність гетеротрофних бактерій виявлена в прибережній зоні дельти Дунаю  $0,8 \times 10^6$  КУО/мл. В Сухому лимані чисельність гетеротрофів становила  $10^3 - 10^4$  КУО/мл, в Дністровському лимані -  $10^4 - 10^5$  КУО/мл, в руслі Дністра -  $10^6 - 10^7$  КУО/мл, в плавневих озерах -  $10^5$  КУО/мл.

Отже, висока чисельність гетеротрофних бактерій в прибережній зоні Чорного моря пов'язана з впливом суші і наявністю потужних постійних джерел забруднення, таких як випуск стічних вод, річковий стік. Така картина спостерігається на станціях, що розташовані поблизу скиду стічних вод м. Одеси (ст. "Південна") та Іллічівська, поблизу густонаселених міст та портів.

В подальшому проведено вивчення стану і зміни складу масового бактеріального населення морських екосистем та еколого-фізіологічних властивостей домінуючих гетеротрофних бактерій мікробних ценозів морських водойм з різним рівнем антропогенного забруднення. Чорне і Балтійське - закриті моря, а Берінгове і Чукотське - відкриті моря. Кліматичні і гідрохімічні умови останніх двох морів схожі, при цьому екосистема Берінгового моря зазнає значно більшого антропогенного тиску, ніж екосистема Чукотського моря.

Порівняльний аналіз якісного складу мікробіоти морських екосистем показав, що до числа зареєстрованих показників, які характеризують відмінності імпактних і фонових районів можна віднести таксономічну і морфологічну різноманітність бактеріопланктону. В імпактних морях виявлено менший індекс таксономічної різноманітності, більшу частку псевдомонад, паличкових, грамнегативних і непігментованих бактерій.

Так, домінуючі бактерії Балтійського моря (табл.2) віднесено до 7 таксонів (проти 11-12 в Берінговому). При цьому частка псевдомонад у

Таксономічний склад домінуючих гетеротрофних  
бактерій морських водойм (N,%)

Таксон	Берінгове море 1988 р.	Балтійське море 1990 р.	Чорне море 1992 р.	Чукотське море 1992 р.
Pseudomonas	30,5	47,4	5,2	43,4
Agrobacterium	6,3	-	-	-
Cytophaga	7,9	7,6	5,2	9,1
Alcaligenes	-	12,1	5,2	2,6
Vibrio	3,2	-	35,0	-
Aeromonas	1,6	3,0	8,8	2,6
Photobacterium	7,9	7,6	-	-
Klebsiella	-	-	-	1,3
Acinetobacter	-	-	8,8	-
Bacillus	20,6	16,6	8,8	18,2
Lactobacillus	2,8	-	-	-
Arthrobacter	5	-	3,8	7,8
Staphylococcus	1,6	-	-	9,1
Micrococcus	1,6	6,0	14,0	2,6
Planococcus	12,6	-	5,2	1,3

Балтиці в різні роки становить 47 - 57%, в той час коли в Берінговому морі - 30-41%. Частка паличковидних бактерій в Балтійському морі в різні роки складала 95-96% (в Берінговому - 74-85%), грамнегативних 54-81% (в Берінговому - 44-57%), пігментованих 57-73% (в Берінговому - 69 - 92%). За цими показниками Чукотське море узгоджується з Берінговим, а Чорне море - з Балтійським.

Слід відмітити особливості таксономічного складу домінуючої мікробіоти Чорного моря. По-перше, тут визначено більш високий індекс таксономічної різноманітності, ніж у Балтійському морі (10 родів домінуючих бактерій), а, по-друге, домінуючим таксоном є рід *Vibrio*, а не *Pseudomonas*, як у інших морів.

Неможливість більш глибокого і детального вивчення біологічних і екологічних особливостей усіх представників масового бактеріального населення привела нас до думки використовувати з метою мікробіологічного моніторингу одну з таких груп.

### 3. Поширення гетеротрофних ковзних бактерій в морському середовищі

Дослідження таксономічного складу мікробних ценозів морських екосистем показало, що до складу домінуючих гетеротрофних бактерій входять представники малодослідженої групи ковзних бактерій, що отримали свою назву завдяки специфічному виду пересування.

Розроблені нами підходи і живильні середовища дозволили виявити гетеротрофні ковзні бактерії, що не утворюють плодові тіла (цитофаги) у воді різних районів Світового океану від тропічних до субарктичних (табл. 3). Виявлення їх коливалося від 9 до 100%. Чисельність цитофаг становила від десятків до десятків тисяч КУО/мл, при цьому частка їх від загальної кількості гетеротрофів складала до 28%. Вперше ковзні бактерії знайдено на глибині 4500-5000 м в Тихому океані і 3500-4000 м в Іонічному морі.

Більш детально екологія ковзних бактерій вивчена в Чорному морі, особливо в районах Одеського прибережжя (табл.4). Отримані дані свідчать про повсюдне поширення цих бактерій. Чисельність їх залежить від пори року і коливається у середньому від  $10^2$  до  $10^4$  КУО/мл. Максимальні значення зареєстровано в районах дельти Дунаю, Одеської

Чисельність цитофаг у водах Світового океану

Район дослідження	Цитофаги тис. КУО/мл	Частка цитофаг від гетеротрофів, N%
Тихий океан	2,0 ± 0,7	11,9
Індійський океан	1,5 ± 0,5	11,8
Чорне море	10,0 ± 1,9	9,5
Японське море	3,4 ± 0,9	28,3
Аравійське море	4,3 ± 1,2	16,9
Червоне море	23,4 ± 7,2	12,3
Середземне море	12,0 ± 2,1	6,0
Егейське море	3,2 ± 0,8	4,2
Мармурове море	2,0 ± 0,5	23,5
Південно-Китайське море	19,8 ± 3,4	15,2

затоки, Дністровського лиману.

Чисельність цитофаг у воді Одеського прибережжя (табл.4) в середньому сягає значних величин (3,0-5,0 тис. КУО/мл). В окремих випадках наприкінці осені та взимку - 8,0-10,0 тис. КУО/мл. Число цитофаг, що вільно плавають, у поверхневих та придонних шарах води на більшості станцій Одеського прибережжя було відносно однаковим.

Встановлено, що частка ковзних бактерій в загальній кількості гетеротрофних бактерій значно зростає в холодну пору року. Це дає змогу рекомендувати ковзні бактерії для оцінки стану мікробних ценозів морських екосистем у зимовий та весняний періоди року.

Тяжіння ковзних бактерій до щільних субстратів, завдяки специфічному механізму пересування, визначає високий рівень контамінації

Вміст цитофаг у воді та ґрунті Одеського прибережжя  
восени 1990 року (тис. КУО/мл)

Район розташування станції	Вода		Ґрунт
	поверхнева	придонна	
Мис Є	2,8 ± 0,2	2,5 ± 0,5	45,0 ± 11,7
Лузанівка	2,0 ± 1,2	3,0 ± 0,8	13,3 ± 6,0
Порт	2,6 ± 0,8	0,9 ± 0,1	*
Австрійський пляж	1,6 ± 0,6	1,2 ± 0,3	27,5 ± 2,3
Ланжерон	2,0 ± 1,3	2,8 ± 1,3	48,0 ± 23,1
Мис Північний	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	15,0 ± 0,2
Аркадія	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,2	-
16-а станція	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,2	-
Дача Ковалевського	0,2 ± 0,1	0,0	2,4 ± 0,7

Примітка: \* - дослідження не проводили

цими бактеріями мідій і, можливо, інших гідробіонтів та водоростей (табл. 5). Чисельність їх на поверхні стулок у деяких випадках сягала  $10^5$  КУО/см<sup>2</sup>. Високий рівень контамінації мантиї мідій  $10^2 - 10^5$  КУО/г сирової маси демонструє здатність молюсків акумулювати ці бактерії у внутрішніх органах за рахунок фільтрації води. Відсутність значних коливань чисельності ковзних бактерій на поверхні та в мантиї мідій, пов'язаних з сезонністю та місцем мешкання молюсків, дає підстави припускати, що вони репрезентують природних мешканців цих гідробіонтів.

Рівень контамінації мідій ковзними бактеріями на досліджених станціях не однаковий, хоча чітких закономірностей у відмінностях між

Контамінація ковзними бактеріями мідій Одеського прибережжя  
влітку 1991 року

Станція	Мантія (КУО/г) $\times 10^2$	Поверхня (КУО/см <sup>2</sup> ) $\times 10^2$
Лузанівка	3500 $\pm$ 544	130 $\pm$ 39
Гавань	1700 $\pm$ 1350	76 $\pm$ 7
Ланжерон	1600 $\pm$ 936	63 $\pm$ 14
Дельфін	4700 $\pm$ 836	8 $\pm$ 2
Біостанція	1200 $\pm$ 465	300 $\pm$ 60
Аркадія	3000 $\pm$ 814	400 $\pm$ 39
10-а ст. В.Фонтану	1800 $\pm$ 751	3000 $\pm$ 492
16-а ст.В.Фонтану	3000 $\pm$ 725	260 $\pm$ 78

станціями за цим показником встановити не вдається.

Контамінація мідій ковзними бактеріями на досліджених станціях не однакова, хоча чітких закономірностей у відмінностях між станціями встановити не вдається. Спостерігається дещо вищий вміст цих бактерій в мідіях, зібраних на 10-й станції Великого Фонтану.

#### 4. Еколого-фізіологічні особливості морських ковзних бактерій

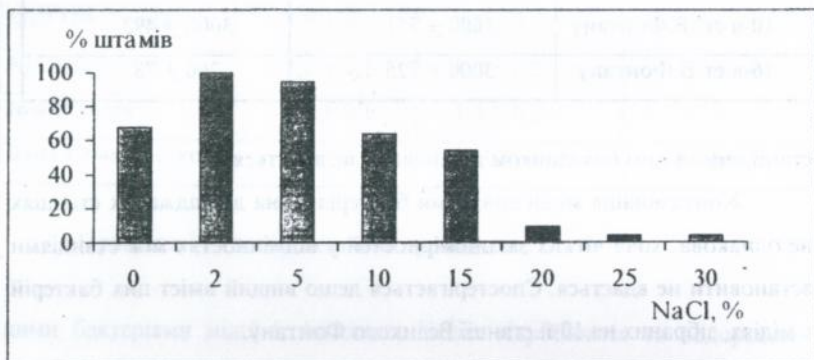
Проведено вивчення спектру еколого-фізіологічних особливостей 115 штамів гетеротрофних ковзних бактерій, вилучених з різних джерел морського середовища. Всі вони є грамнегативні прямі або вигнуті палички, завдовжки 0,8-10 мкм і товщиною 0,5 мкм. Ізольовані штами утворюють колонії частіше жовтого або рожевого кольору з характерним дуже тонким краєм, що поширюються по поверхні середовища.

Завдяки спостереженням за рухом клітин в рідкому середовищі

зроблено висновок, що ковзний рух бактерій ґрунтується на різних механізмах.

Вивчення еколого-фізіологічних особливостей ковзних бактерій дозволило розробити підходи і методи диференціації автохтонних і алохтонних морських бактерій. Однією з таких ознак, що дозволяє відрізняти морських представників від неморських, є залежність їх росту і пересування від  $\text{Na}^+$ .

Значна частина (32%) досліджених штамів морських ковзних бактерій виявила повну залежність від  $\text{NaCl}$ . Вони росли при 15% і навіть 20-30%  $\text{NaCl}$  (мал. 2). Вперше показана залежність рухливості ковзних бактерій від концентрації  $\text{NaCl}$  і морської солі. Для більшості ізольованих

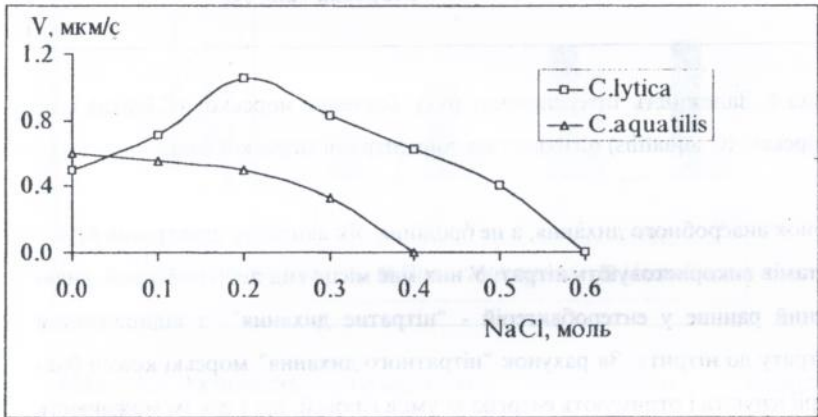


Мал.2. Ріст ковзних бактерій в залежності від концентрації  $\text{NaCl}$ .

штамів характерна закономірність, встановлена для морської *S.lytica* ВКМВ 1344 і зображена на малюнках 3 і 4. Найвища інтенсивність руху усіх досліджених морських бактерій спостерігається при 0.2 М  $\text{NaCl}$ , а також 3% морської солі. Максимальна рухливість прісноводних цитофаг встановлена за умов відсутності  $\text{NaCl}$  і морської солі і має чітку тенденцію до зниження при збільшенні концентрації солей.

Для рухливості морських бактерій необхідні йони  $K^+$ . Максимальної швидкості бактерії сягають при 0,2 М КСІ.

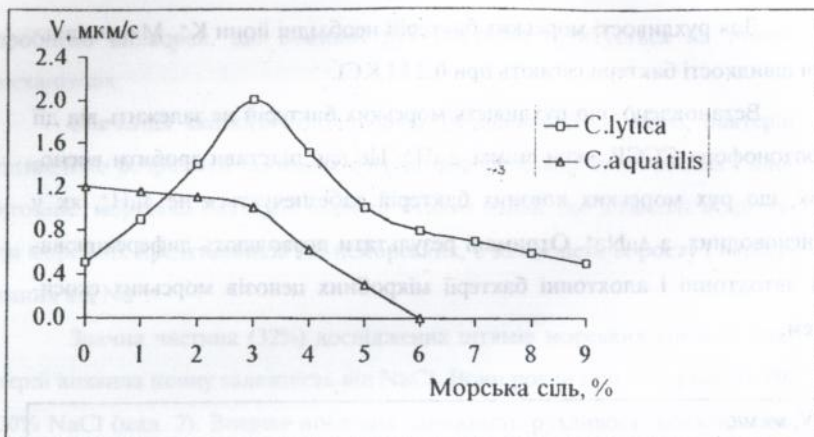
Встановлено, що рухливість морських бактерій не залежить від дії протонифора СССР, який знімає  $\Delta\mu H^+$ . Це дає підстави зробити висновок, що рух морських ковзних бактерій забезпечується не  $\Delta\mu H^+$ , як у прісноводних, а  $\Delta\mu Na^+$ . Отримані результати дозволяють диференціювати автохтонні і алохтонні бактерії мікробних ценозів морських екосистем.



Мал.3. Залежність інтенсивності руху морської (*C.lytica*) і неморської (*C.aquaticus*) цитофаг від концентрації NaCl.

Визначено, що морські ковзні бактерії відносяться до мезофілів з оптимальною температурою росту 20-25°C, які здатні рости при температурі води морської товщі (+4°C). Ізольовані штами ковзних бактерій ростуть в широкому діапазоні pH 5,0-9,0 з оптимальним pH 7,0.

Морські ковзні бактерії мають окисний тип метаболізму. За умов відсутності кисню морські ковзні бактерії отримують енергію за ра-



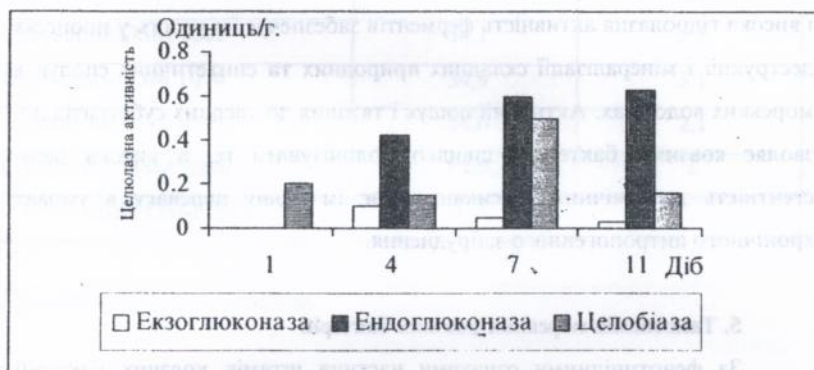
Мал.4. Залежність інтенсивності руху бактерій морської (*C.lytica*) і не морської (*C.aquatilis*) цитофаг від концентрації морської солі.

хунок анаеробного дихання, а не бродиння. Як акцептор електронів 61% штамів використовують нітрат. У них має місце вид денітрифікації, виявлений раніше у ентеробактерій - "нітратне дихання", з відновленням нітрату до нітриту. За рахунок "нітратного дихання" морські ковзні бактерії існують і отримують енергію за умов гіпоксії, що і дає їм можливість повсюдно поширюватися в морському середовищі на значні глибини.

Встановлено, що вітаміни групи В не слугують факторами росту морським ковзним бактеріям. Досліджувані штами утилізують як джерела вуглецю і енергії різні цукри і органічні кислоти.

Ковзні бактерії виявили високу гідролазну активність щодо колагена (62%), фібрини (65%), желатини (65%), казеїна (64%), крохмалю (50%), агару (41%), целюлози (19%). Вони є чи не основними мікроорганізмами, що відповідають за розклад целюлозних матеріалів в морському середовищі і, таким чином, відіграють важливу роль у біопшкодженнях целюлозомістких технічних матеріалів, які використовують в морській справі.

Рівень деструктивної активності бактерій корелює з целюлазною активністю, при цьому деякі штами накопичують в середовищі до 80 мкг/мл редуруючих цукрів. Міцність льняної пряжі за 30 діб знижується під дією цитофаг на 97%. Визначено, що до складу целюлазного комплексу ковзних бактерій входить ендоглюконаза, екзоглюконаза і целобіаза (мал. 5). Співвідношення цих компонентів і рівень їх активності змінюються у часі і залежать від екологічних чинників.



Мал. 5. Активність компонентів целюлазного комплексу *Cytophaga* sp T6-8.

Ковзні бактерії здатні до лізису клітин інших бактерій (*E.coli*) і мають високу активність відносно утилізації N-ацетилглюкозаміну, що свідчить про участь ковзних бактерій в регулюванні чисельного складу мікробних ценозів і процесах самоочищення води.

Досліджені штами ковзних бактерій утилізують детергент - додецилсульфат Na, проте не виявляють деструктивної активності до пестицидів (хлорофос, байлетон, тилт, цимбуш) і азабарвників.

Визначені модальні значення і діапазони МІК пестицидів і важких металів свідчать про високу резистентність ковзних бактерій до органіч-

них і неорганічних токсикантів.

На моделі культур клітин мідій, яка була спеціально розроблена для цих досліджень, показано відсутність патогенних властивостей у ковзних бактерій, що уможливило віднести їх до сапрофітних мікроорганізмів.

Отже, зважаючи на те, що ковзні бактерії, входять до складу домінуючої мікробіоти, вони завдяки своїм еколого-фізіологічним властивостям відіграють важливу роль в морських біоценозах. Широкий спектр і висока гідролазна активність ферментів забезпечує їм участь у процесах деструкції і мінералізації складних природних та синтетичних сполук в морських водоймах. Активний пошук і тяжіння до твердих субстратів дозволяє ковзним бактеріям швидко колонізувати їх, а висока резистентність до хімічних токсикантів дає їм певну перевагу в умовах хронічного антропогенного забруднення.

#### **5. Таксономія морських ковзних бактерій**

За фенотипічними ознаками частина штамів ковзних бактерій віднесена до видів: *Cytophaga lytica*, *C.salmonicolor*, *C.fermentans*, *C.flevensis*, *C."marina"*, *C."marinoflava"*, *C.aquaticilis* і *Microscilla marina*.

Таксономічні дослідження решти ізольованих штамів і колекційних штамів було проведено методами геносистематики і хемотаксономії.

Встановлено варіювання вмісту ГЦ-пар в ДНК колекційних штамів цитофаг від 33,3% до 46,7% (табл. 6). Розміри їх геномів помітно відрізняються і становлять від 2,1 до 3,8 x 10<sup>9</sup> Да.

Низький рівень гібридизації ДНК (6%) між морськими і прісноводними членами роду *Cytophaga* свідчить про необхідність таксономічного розподілу морських і прісноводних представників. Вузкий діапазон ГЦ - пар (33,3 - 34,0 мол. %), схожі розміри геномів (3,2 - 3,8 x 10<sup>9</sup> Да) і 22 - 37% гомології ДНК свідчать про спорідненість між ви-

Геномні характеристики колекційних штамів видів *Cytophaga*

Штам	Вміст ГЦ пар,	Розмір генома,
	мол.%	$\times 10^9$ Да
<i>C.johnsonae</i> DSM 425	33,4	3,8
<i>C.saccharophila</i> DSM 1181	33,3	3,2
<i>C.pectinovora</i> DSM 6368	34,0	3,5
<i>C.aquaticus</i> DSM 2063	34,1	2,5
<i>C.flevensis</i> DSM 1076	34,9	3,1
<i>C.lytica</i> ATCC 23178	34,0	2,1
<i>C.heparina</i> DSM 2366	45,0	-
<i>C.arvensicola</i> DSM 2588	46,7	-

Примітка: "-" - не визначали

дами *C.johnsonae*, *C.pectinovora*, *C.saccharophila*. Низький рівень гібридизації ДНК (3 - 7%) штамів видів *incertae sedis* (*C.arvensicola* і *C.heparina*) зі штамми видів, що згідно Визначника Бергі (1984) входять до роду *Cytophaga*, підтверджує необхідність винесення цих видів за межі роду.

Частина неідентифікованих ковзних бактерій продемонструвала високий рівень вмісту ГЦ-пар (46,5 - 68,7 мол.%), що унеможливило розгляд їх в межах родини *Cytophagaceae*.

Неідентифіковані бактерії з низьким рівнем ГЦ (34,3-42,5 мол.%) за наявності специфічного пігменту флексірубіну (ознака належності до прісноводних ковзних бактерій) і здатністю до гідролізу агару (характерна ознака для морських цитофаг) були розділені на 4 кластери:

- кластер А включає флексірубінопозитивні штамми, що не гідролізують агар, з вмістом ГЦ 34,3 - 35,5 мол.% (табл.7);

- кластер В об'єднує флексірубінпозитивні штами, що демонструють агаролітичну активність, з вмістом ГЦ - 37,5 - 39,8 мол.%;

Таблиця 7.

## Геномні характеристики штамів кластера А

Штам	ГЦ, мол.%	Геном $\times 10^9$ Да	Гомологія ДНК (%) у відношенні до штама				
			37	18	124	123	66
37	34,3	2,9	100				
18	35,5	2,7	80	100			
124	35,0	3,6	-	41	100		
123	35,1	3,6	-	46	75	100	
66	35,1	2,1	-	39	47	43	100

Примітка: "-" - дослідження не проводили.

- кластер С включає флексірубіннегативні штами, що гідролізують агар, з рівнем ГЦ 36,5 - 42,3 мол.% (табл. 8);

- кластер D репрезентують флексірубіннегативні штами, що не гідролізують агар, з вмістом ГЦ 42,5 мол.%.

Низький рівень гомології ДНК штамів, ізольованих із морського середовища, і колекційних штамів (до 12%) свідчить за те, що вони не відносяться до роду *Cytophaga*.

В середині кластерів визначені високі рівні гомології ДНК (табл. 7 і 9). Особливий інтерес являє кластер С, представники якого показали найвищий рівень гібридизації з морською *S.lutica*. Вони кількісно переважають серед досліджуваної групи і складають, очевидно, ядро нового роду флексірубіннегативних агаролітичних морських ковзних бактерій

Таблиця 8.

## Геномні характеристики штамів кластера С

Штам	ГЦ, мол.%	Геном x 10 <sup>9</sup> Да	Штам	ГЦ, мол.%	Геном x 10 <sup>9</sup> Да
5	40,9	2,6	81	38,0	2,1
7	39,0	3,0	82	38,8	2,2
8	40,1	3,1	83	39,2	2,3
15	40,0	2,4	92	39,5	2,3
41	37,1	2,5	93	37,5	2,3
42	38,6	2,5	106	37,4	2,1
44	36,5	2,1	116	42,3	1,8
45	38,6	2,1	117	41,5	1,9

Таблиця 9.

## Рівень гомології ДНК штамів субкластерів кластера С

Субкластер, Штам	Гомологія ДНК (%) у відношенні до штама				
	41	83	7	8	116
С1, штам 41	100				
С2, штам 83	40	100			
С3, штам 7	41	41	100		
С4, штам 8	28	29	48	100	
С5, штам 116	45	38	36	41	100

"Agarophaga". Є всі підстави вважати, що кластери А, В і D мають складати також нові роди в межах родини Cytophagaceae.

Вивчення жирнокислотних спектрів колекційних штамів Cyto-

phaga показало, що у складі жирних кислот домінує  $i\text{-C}_{15}$ : - 12,0 - 25,7%. Загальна доля розгалужених кислот становить 37,8 - 41,8%. Ненасичені жирні кислоти складають 11,7 - 19,0%. Показано значний вміст оксикислот - 9,0 - 21,0%. Привертають увагу оксикислоти з розгалуженим ланцюгом. Вони рідко виявляються у бактерій і можуть розглядатися як хемотаксономічні маркери. Гідроксильну групу виявлено в положенні 3: 3-ОН- $i\text{-C}_{14:0}$ , 3-ОН- $i\text{-C}_{15:0}$ , 3-ОН- $i\text{-C}_{16:0}$ . Заслужує уваги факт виявлення у більшості цитофаг метиленгексадеканової кислоти ( $\text{C}_{17\Delta}$ ).

Показана схожість жирнокислотних спектрів штамів *S.johnsonae*, *S.pectinovora*, *S.saccharophila*, а також відмінність між морськими (*S.lytica*) і прісноводними (*S.aquatilis*) ковзними бактеріями.

До складу жирних кислот ізольованих штамів морських бактерій, що складають кластер А, входять в значній кількості розгалужені (19,0 - 56,0%), ненасичені (13,2 - 24,7%) і оксикислоти (4,9 - 15,4%). Циклопропанові сполуки відсутні.

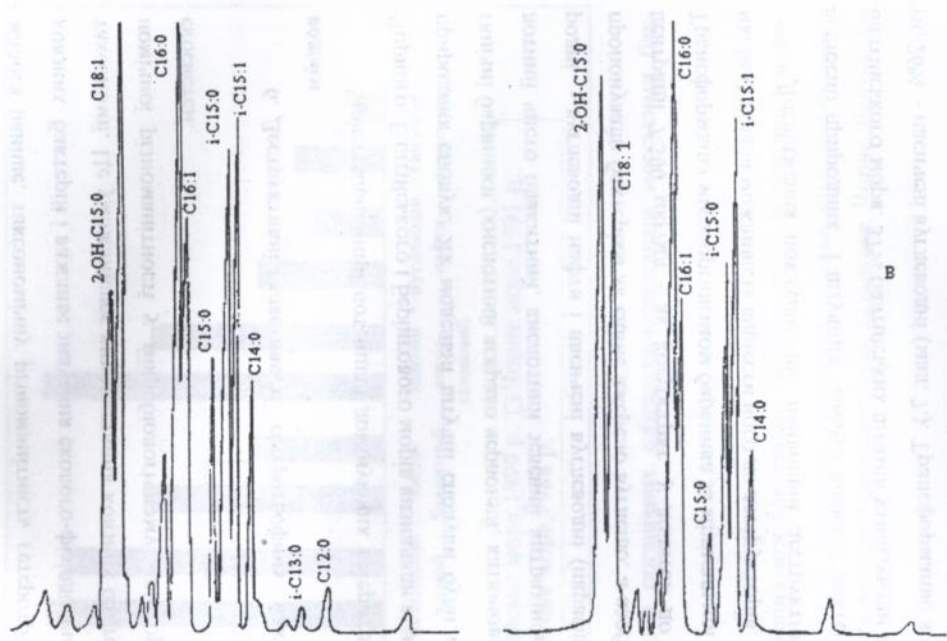
Показано значні розбіжності в складі жирних кислот штамів кластера В як між собою, так і порівняно з іншими штамми. У них виявлені циклопропанові сполуки ( $\text{C}_{17\Delta}$  і  $\text{C}_{19\Delta}$ ), відсутні  $\text{C}_{13:0}$  і 2-ОН- $\text{C}_{14:0}$ . Незвичайним є домінування 2-ОН- $\text{C}_{15:0}$ .

Жирні кислоти штамів кластера С репрезентовані звичайним для ковзних бактерій спектром (мал. 6). В них переважають розгалужені (13,2 - 41,7%) і ненасичені (16,2 - 26,9%) кислоти. Значним є вміст оксикислот (7,8 - 18,3%). Основні ненасичені кислоти -  $\text{C}_{16:0}$ ,  $i\text{-C}_{15:0}$ . Помітна перевага 2-ОН- $\text{C}_{15:0}$  над іншими оксикислотами. Деякі штами містять  $\text{C}_{17\Delta}$ .

Серед насичених жирних кислот кластера D домінує гексадеканова (9,3%), серед ненасичених - гексадеценава (13,0%), з розгалужених -  $i\text{-C}_{15:0}$  (44,1%) кислоти. Циклопропанові сполуки відсутні.

Отже, проведені вперше дослідження геномних характеристик, складу жирних кислот, гомології ДНК показали значно більшу, ніж вва

Мал. 6. Спектр жирних кислот морських ковзних бактерій кластера С (А - штамп 41, В - штамп В1).



жалося раніше, таксономічну різноманітність гетеротрофних морських ковзних бактерій і важливе значення еколого-фізіологічних ознак для їх таксономії. Це уможливило використання ковзних бактерій та їх таксономічної різноманітності у мікробіологічному моніторингу морських екосистем.

#### **6. Деструктивні властивості гетеротрофних бактерій морських водойм**

Біодеградаційний потенціал домінуючих гетеротрофних бактерій Чорного, Балтійського і Берінгового морів визначали відносно штучних і природних сполук. Як модельні штучні сполуки були використані органічні барвники (кислотний яскраво червоний, катіоновий чорний, кислотний чисто блакитний, кислотний зелений антрахіноновий), як природні - вуглеводні нафти і насичені вуглеводні (парафіни). Вуглеводні пропонували бактеріям як єдине джерело вуглецю, а азобарвники у концентрації 7-300 мкг/мл - як косубстрат, у додаток до 0,1% глюкози. Трансформація мікроорганізмом барвника за мінімальної концентрації (7 мкг/мл) давала можливість віднести його до деструкторів.

Дослідження показали, що найвищий деструктивний потенціал відносно природних і штучних сполук виявили бактерії, ізольовані з Балтійського моря. 37% балтійських штамів утилізували вуглеводні нафти, 26% - насичені вуглеводні (мал. 7.). Трансформацію яскраво червоного барвника вели 90%, катіонового чорного - 99%, чисто блакитного - 70%, зеленого антрахінонового - 100% балтійських штамів. В той же час вуглеводні нафти і насичені вуглеводні утилізують лише 20% і 8,7%, відповідно, берінгоморських гетеротрофних бактерій. Яскраво червоний барвник трансформують 79%, катіоновий чорний - 93%, чисто блакитний - 38%, зелений антрахіноновий - 68% бактерій Берінгового моря. Бактерії Чорного моря за біодеградаційним потенціалом займають



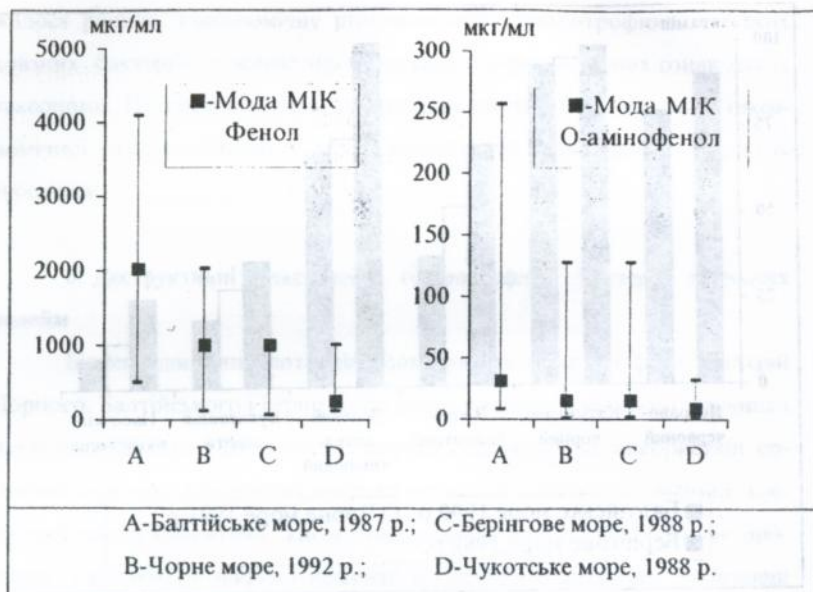
Мал.7. Деструкція органічних субстратів-полутантів морськими бактеріями.

проміжне положення між бактеріями Балтійського і Берингового морів. Тобто, деструктивний потенціал мікробних ценозів стосовно складних органічних сполук зростає в ряду акваторій: Берингове, Чорне, Балтійське моря.

### 7. Резистентність морських бактерій до органічних токсикантів

У цій главі викладені результати проведених вперше досліджень резистентності гетеротрофної мікробіоти Балтійського, Берингового, Чорного і Чукотського морів до токсикантів органічної природи.

Проведені дослідження показали (мал. 8.), що бактерії, ізольовані з Балтійського моря, виявили найвищий рівень резистентності до дослід-



Мал. 8. Резистентність морських бактерій до органічних токсикантів.

жених органічних токсикантів. Найбільш чутливими виявилися бактерії, ізолювані з Чукотського моря.

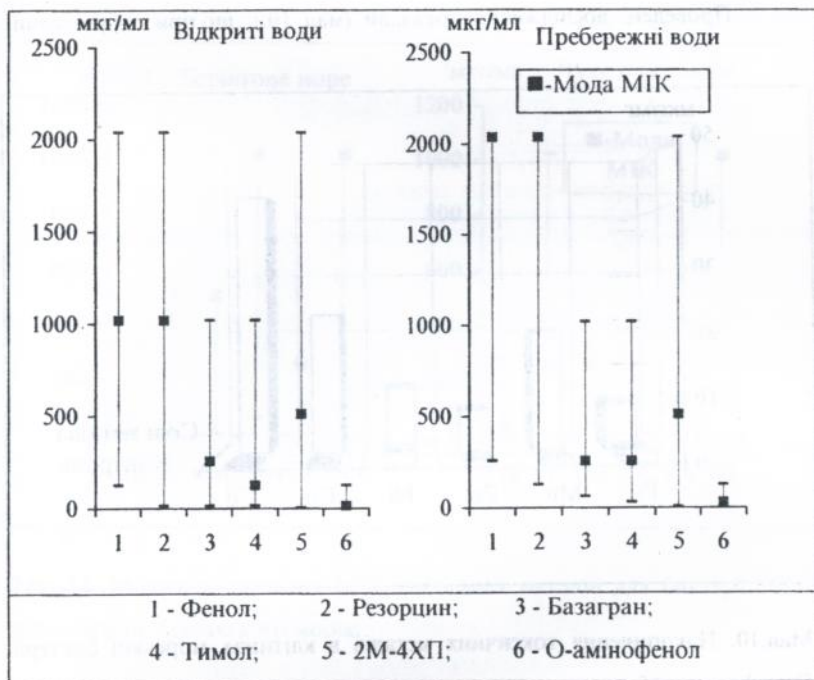
Діапазон значень МІК фенолу для бактерій Балтійського моря має зсув у бік високих концентрацій (510 - 4080 мкг/мл), а для бактерій Берінгового і Чукотського морів - у бік низьких концентрацій (65 - 1020 мкг/мл). Найбільше модальне значення МІК фенолу характерне для домінуючої мікробіоти Балтійського моря (2040 мкг/мл), а найменше для Чукотського моря (255 мкг/л).

Діапазон МІК ортоамінофенолу для балтійських бактерій зсунутий у бік максимальних значень (8 - 255 мкг/мл), а для чукотських бактерій - у бік мінімальних значень (2 - 32 мкг/мл). Найбільше модальне значення МІК ортоамінофенолу дорівнює 32 мкг/мл для балтійських

штамів, а найменше - для чукотських - 2 мкг/мл.

Таким чином, домінуючі бактерії Берінгового моря більш стійкі до органічних токсикантів, ніж Чукотського моря, а бактерії Балтійського моря - більш резистентні, ніж чорноморські.

Гетеротрофні бактерії мікробних ценозів прибережних вод в дослідженнях, проведених на прикладі Чорного моря, виявили більший



Мал. 9. Резистентність до органічних токсикантів бактерій, ізольованих із відкритих і прибережних вод Чорного моря.

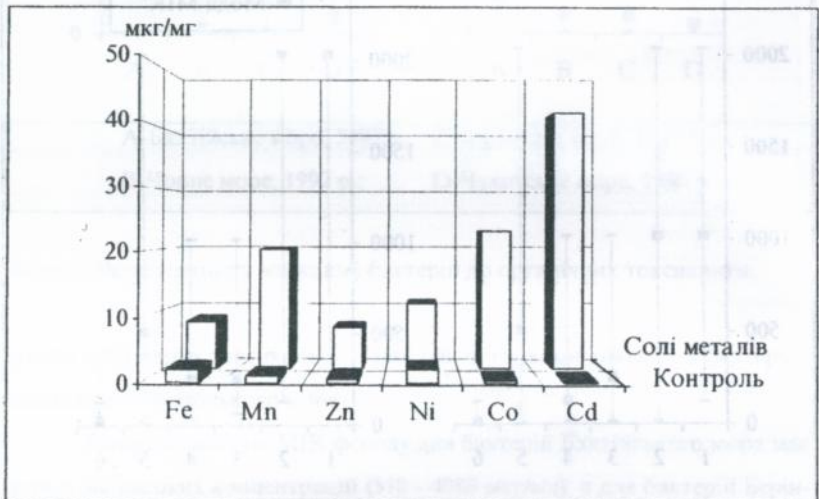
потенціал резистентності до органічних токсичних сполук-поліутантів порівняно з бактеріальним населенням відкритих районів моря (мал. 9).

Модальні значення МІК фенолу ( 2040 мкг/мл ), резорцину (2040 мкг/мл), тимолу (255 мкг/мл), ортоамінофенолу (32 мкг/мл) були у два рази вищі для мікроорганізмів, ізольованих з прибережної смуги моря.

### 8. Резистентність морських бактерій до токсичних металів

Вміст металів у воді різних морів змінюється в широкому діапазоні і концентрація їх визначається слідовими значеннями.

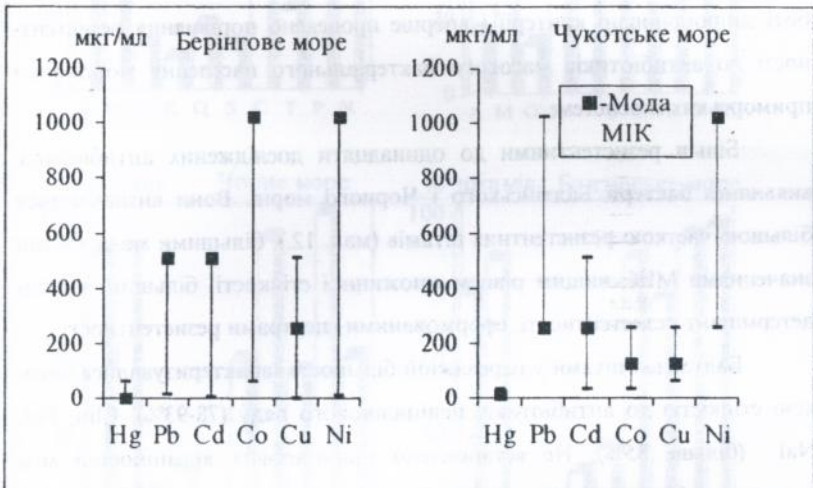
Проведені дослідження показали (мал. 10.), що при забрудненні



Мал.10. Накопичення токсичних металів в клітинах морської бактерії *Cytophaga sp. 15*.

морської води токсичними металами вміст їх у клітинах більшості бактерій збільшується у 2 - 5 разів (для деяких штамів на один-два порядки). Вміст Fe в клітинах сягає 50 мкг/мг, Mn - 88 мкг/мг, Zn - 24 мкг/мг, Ni - 44 мкг/мг, Co - 158 мкг/мг, Cd - 190 мкг/мг.

Установлено, що МІК токсичних металів для гетеротрофних бактерій морських біоценозів різних районів Світового океану коливається в досить широких межах (мал. 11.). Максимальні значення моди МІК Cu (255 мкг/мл) виявлені для бактерій Балтійського, Чорного і Берінгового морів; Ni (1024 мкг/мл) - для бактерій Чорного, Берінгового, Чукотського морів; Pb (512 мкг/мл) - для Чорного, Берінгового морів, Hg (64 мкг/мл) - для Чорного моря, Co і Cd (512 мкг/мл) - для Берінгового моря. Згідно з



Мал.11. Модальні значення МІК токсичних металів для бактерій Балтійського та Чукотського морів.

модальними значеннями МІК металів для бактерій, моря можуть бути розташовані у наступному порядку: Берінгове, Чорне, Балтійське, Чукотське. Тобто, берінгоморські бактерії більш стійкі до токсичних металів, ніж бактеріальне населення Чукотського моря.

Порівняльний аналіз діапазонів і модальних значень МІК металів для гетеротрофних бактерій причорноморських водойм показав, що

найбільш стійкі до токсичних металів є бактерії оз. Ялпуг і Кугурлуй та Дністровського лиману, а найбільш чутливі - бактерії плавневих озер, що цілком узгоджується з рівнем забруднення цих водойм.

### 9. Резистентність морських бактерій до антибіотиків

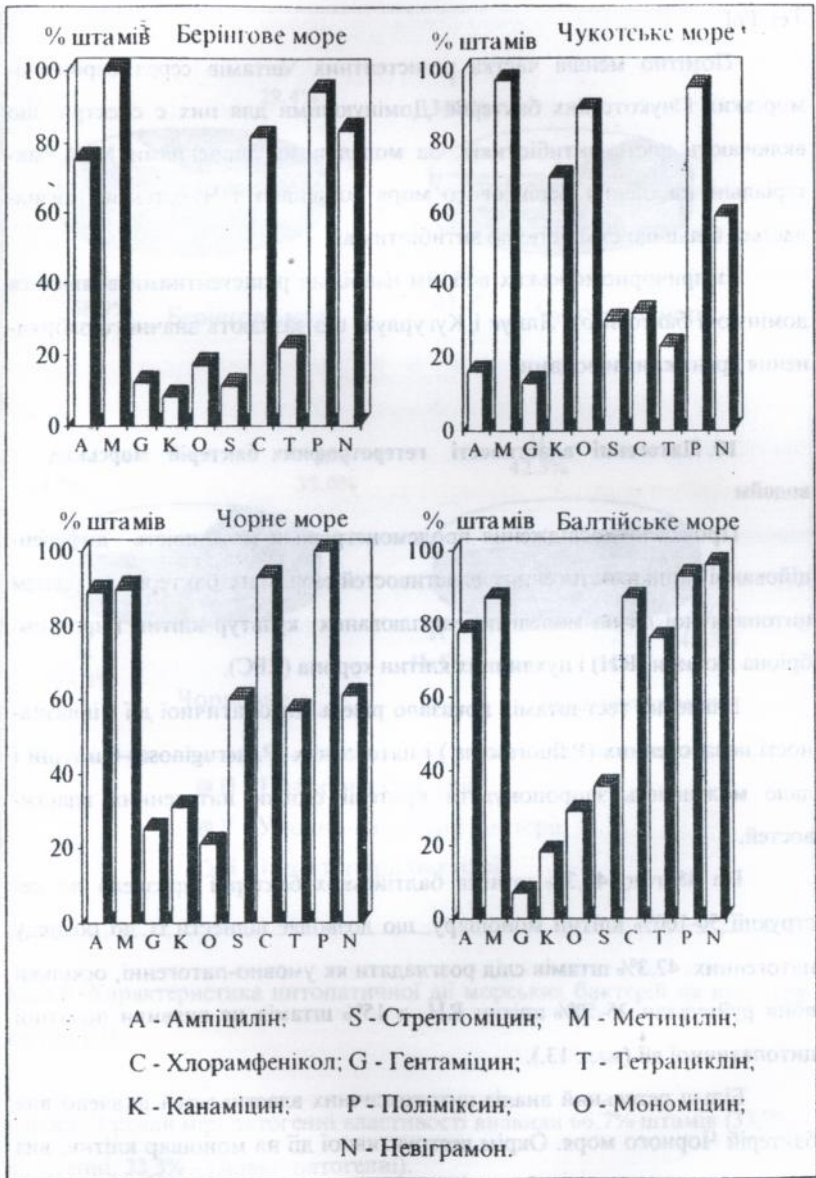
Резистентність до антибіотиків, як і резистентність до органічних і неорганічних токсикантів є еколого-фізіологічною ознакою, яка широко розповсюджена серед мікроорганізмів різних таксономічних груп. В роботі запропоновані критерії і вперше проведено порівняння резистентності до антибіотиків масового бактеріального населення морських і приморських екосистем.

Більш резистентними до одинадцяти досліджених антибіотиків виявилися бактерії Балтійського і Чорного морів. Вони визначаються більшою часткою резистентних штамів (мал. 12.), більшими модальними значеннями МІК, вищим рівнем множинної стійкості, більшим числом детермінант резистентності, сформованими спектрами резистентності.

Балтійські штами у переважній більшості характеризувалися високою стійкістю до антибіотиків пеніцилінового ряду (78-93%), Clm, Pol, Nal (більше 85%). Не встановлено принципових відмінностей між частками стійких штамів, вилучених у 1987 та 1990 роках. Переважній більшості балтійських бактерій властива множинна стійкість до антибіотиків. Спектри резистентності репрезентовані 21 (1987 р.) і 23 (1990 р.) варіантами. Для 42,2% балтійських штамів 1987 р. характерним є спектр Amp, Ben, Met, Clm, Tet, Pol, Nal. За кількістю детермінант домінують спектри, представлені 10 (1990 р.) і 7 (1987 р.) антибіотиками.

Близькою до Балтійського моря є частка резистентних до антибіотиків бактерій Чорного моря. Їм також властива множина стійкість.

Спектри резистентності складають 21 комбінацію. Домінуючим є спектр, що включає вісім антибіотиків: Amp, Ben, Met, Gen, Str, Clm,



Мал.12. Частка штамів морських бактерій резистентних до антибіотиків.

Тет. Pol.

Помітно менша частка резистентних штамів серед берінгово-морських і чукотських бактерій. Домінуючими для них є спектри, що включають шість антибіотиків. За модальними значеннями МІК бактеріальне населення Берінгового моря порівняно з Чукотським визначається більшою стійкістю до антибіотиків.

Із причорноморських водойм найбільш резистентними виявилися домінуючі бактерії оз. Ялпуг і Кугурлуй, що зазнають значного забруднення дренажними водами.

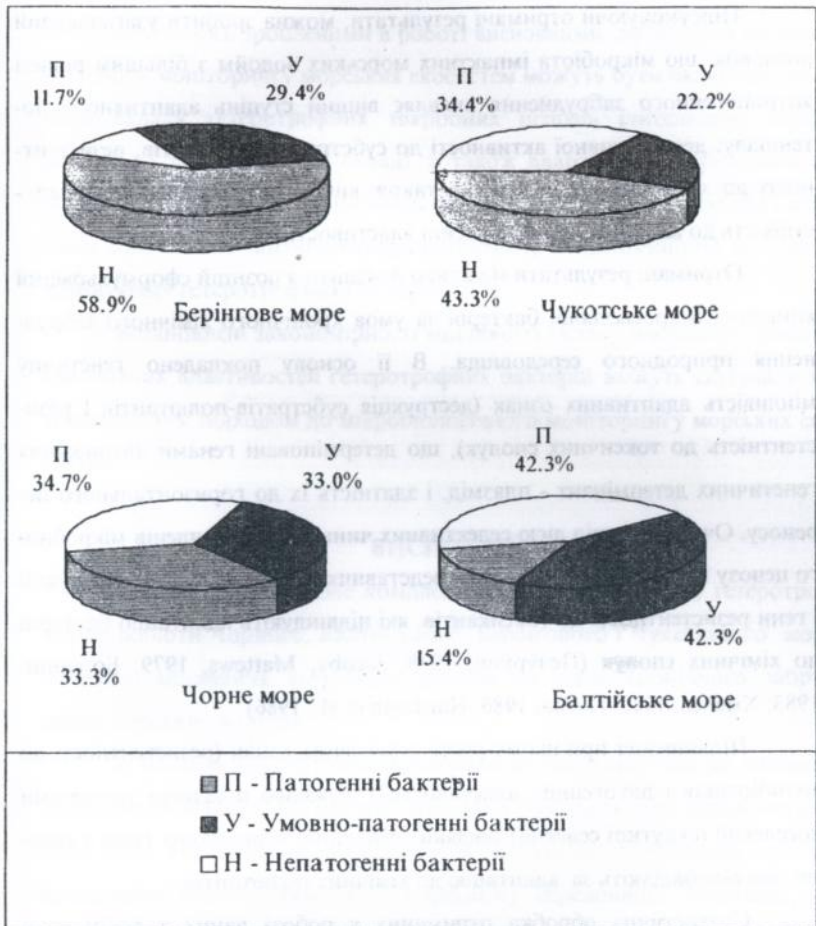
#### **10. Патогенні властивості гетеротрофних бактерій морських водойм**

Проведені дослідження продемонстрували можливість диференційованої оцінки патогенних властивостей морських бактерій за рівнем цитопатичної дії на моделі перещеплюваних культур клітин нирок ембріона людини (RH) і пухлинних клітин коропа (EPC).

Вивчення тест-штамів показало рівень цитопатичної дії і інвазивності непатогенних (*P.fluorescens*) і патогенних (*P. aeruginosa*) бактерій і дало можливість запропонувати критерії оцінки патогенних властивостей.

На 48 год. 42,3% штамів балтійських бактерій призвели до деструкції 50-100% клітин моношару, що дозволяє віднести їх до розряду патогенних. 42,3% штамів слід розглядати як умовно-патогенні, оскільки вони руйнували 25-50% клітин RH, а 15% штамів не виявили помітної цитопатичної дії (мал. 13.).

Більш ретельний аналіз цитотоксичних властивостей вивчено для бактерій Чорного моря. Окрім деструктивної дії на моношар клітин, визначено вплив морських бактерій на мітотичну активність клітин RH, співвідношення фаз мітозу, число симпластів, утворення гігантських



Мал.8. Характеристика цитопатичної дії морських бактерій на культуру клітин RH.

клітин. В різній мірі патогенні властивості виявили 66,7% штамів (33,7% - патогенні, 33,3% - умовно-патогенні).

Менша частка штамів, що виявили цитопатичну дію, була серед чукотських (56,7%) і берінгоморських (41,1%) бактерій.

Підсумовуючи отримані результати, можна зробити узагальнений висновок, що мікробіота імпактних морських водойм з більшим рівнем антропогенного забруднення виявляє вищий ступінь адаптивного потенціалу: деструктивної активності до субстратів-полютантів, резистентності до хімічних токсикантів, а також вищий агресивний потенціал - стійкість до антибіотиків і патогенні властивості.

Отримані результати можливо пояснити з позицій сформульованої концепції мікроеволюції бактерій за умов хронічного хімічного забруднення природного середовища. В її основу покладено генетичну мінливість адаптивних ознак (деструкція субстратів-полютантів і резистентність до токсичних сполук), що детерміновані генами автономних генетичних детермінант - плазмід, і здатність їх до горизонтального переносу. Очевидно, під дією селективних чинників серед членів мікробного ценозу набувають поширення представники, що несуть гени деструкції і гени резистентності до токсикантів, які підвищують адаптацію бактерій до хімічних сполук (Печуркин, 1978; Jacoby, Mattews, 1979; Боронин, 1983; Хмелев, 1985; Пехов, 1986; Hardman et al., 1986).

Підвищення при цьому рівня агресивних ознак (резистентності до антибіотиків і патогенних властивостей) можливо пояснити процесами коселекції (супутної селекції) завдяки зчепленню відповідних генів з генами, що відповідають за адаптацію до хімічних полютантів.

Статистична обробка отриманих у роботі даних з допомогою процедури покрової селекції змінних величин показала високі значення коефіцієнтів зчеплення ознак резистентності до токсичних металів і антибіотиків у бактерій досліджуваних водойм.

Така спрямованість мікроеволюції може призводити до появи нових небезпечних мікроорганізмів. У зв'язку з цим мікробіологічний моніторинг за станом екосистем морських водойм набуває нового значення і усвідомлення.

Керуючись зробленими в роботі висновками, до системи мікробіологічного моніторингу морських екосистем можуть бути включені показники складу гетеротрофних мікробних ценозів (чисельний, морфологічний і таксономічний склад), а також адаптивні (деструктивна активність до субстратів-полутантів, резистентність до токсикантів) і агресивні властивості (антибіотикорезистентність і патогенність) популяцій домінуючих гетеротрофних бактерій.

Встановлені закономірності мінливості складу мікробних ценозів і адаптивних властивостей гетеротрофних бактерій можуть слугувати методологічним підходом до мікробіологічного моніторингу морських екосистем.

## ВИСНОВКИ

1. Широкомасштабне комплексне дослідження стану гетеротрофної мікробіоти Чорного, Балтійського, Берінгового і Чукотського морів показало мінливість мікробних ценозів за умов хронічного забруднення морських водойм.

2. Встановлено чутливість бактерій до генотоксичної дії хімічного забруднення в дозах, що реально існують в прибережних і відкритих районах моря. На прикладі Чорного моря визначено глобальний характер поширення генотоксикантів у морському середовищі. Показано, що морські мікроорганізми продукують метаболіти з мутагенною дією і масовий розвиток їх, підсилює генотоксичний прес хімічного забруднення на мікроорганізми.

3. Мікробні ценози морських водойм, що знаходяться під значним впливом антропогенного забруднення, мають менший коефіцієнт таксономічної різноманітності, який залишається стабільним у часі для усіх досліджених морів, більшу частку паличкових, грамнегативних і непігментованих форм бактерій. Серед масового бактеріального насе

лення домінує рід *Pseudomonas*.

4. Встановлено повсюдне поширення гетеротрофних ковзних бактерій у водах Світового океану і їх входження до складу домінуючих планктонних бактерій і нормальної мікробіоти гідробіонтів. Еколого-фізіологічні особливості, широкий спектр і висока активність позаклітинних ферментів забезпечують ковзним бактеріям важливу роль в процесах мінералізації високомолекулярних природних сполук в морських водоймах.

5. Методами геносистематики і хемотаксономії показано широку таксономічну гетерогенність морських ковзних бактерій. Вони визначаються широким діапазоном ГЦ-пар (33,4 - 46,7 мол.%), розміром генома ( $1,3 - 3,8 \times 10^9$  Да), низьким рівнем гомології ДНК з відомими видами роду *Cytophaga*.

6. У широкому спектрі жирних кислот ковзних бактерій переважають розгалужені, ненасичені і оксикислоти. Основні ненасичені кислоти -  $C_{16:0}$ ,  $i-C_{15:0}$ . Оксикислоти з розгалуженим ланцюгом можуть розглядатися як хемотаксономічні маркери. Показано наявність оксикислот і циклопропанових сполук ( $C_{17\Delta}$  і  $C_{19\Delta}$ ).

7. Встановлено, що домінуюча гетеротрофна мікробіота імпактних районів Світового океану порівняно з фоновими позначається більш високими рівнями адаптивного потенціалу - деструктивної активності стосовно субстратів-полютантів і резистентності до органічних і неорганічних токсикантів.

8. Показано, що гетеротрофні бактерії Балтійського і Чорного морів мають більш високий ступінь агресивних властивостей - антибіотикорезистентності і цитопатичної дії на перещеплювані культури клітин (RH, EPC) порівняно з фоновими - Берінговим і Чукотським.

9. На підґрунті порівняльного аналізу результатів вивчення деструктивного потенціалу, резистентності до токсикантів, антибіотиків і

патогенних властивостей домінуючої мікробіоти Чорного, Балтійського, Берінгового, Чукотського морів сформульовано концепцію мінливості мікроорганізмів за умов хронічного хімічного забруднення у напрямку зростання і появи нових агресивних властивостей.

10. Встановлена закономірність мінливості складу мікробних ценозів і еколого-фізіологічних властивостей домінуючої мікробіоти може бути використана як методологічний підхід у комплексному екологічному моніторингу морських екосистем.

Основні роботи, надруковані за темою дисертації:

1.Иваница В.А., Юргелайтис Н.Г., Кушниренко Е.К., Багаева О.С. Идентификация скользящих бактерий-деструкторов целлюлозосодержащих материалов // В сб.: Проблемы идентификации микроскопических грибов и других микроорганизмов. Вильнюс, 1987, с. 38-39.

2.Иваница В.А., Елинская Н.А. Численность и распределение скользящих бактерий в воде и грунте Одесского залива //Микробиол. ж. - 1988 .-50, №6 .-С.3-5.

3.Иваница В.А., Багаева О.С., Кушниренко Е.К. Деструктивная активность некоторых штаммов цитофаг по отношению к льняному волокну //В сб.:Актуальные проблемы биологических повреждений и защиты материалов, изделий и повреждений. М., 1989. - С.102-110.

4.Иваница В.А. Скользящие бактерии порядков Muxobacterales и Cytophagales // Успехи микробиол. -1990. - №24. - С.65-87.

5.Иваница В.А., Юргелайтис Н.Г., Елинская Н.А., Кошелева О.В. Проблемы выделения и идентификации бактерий группы цитофага-флавобактериум//В сб.: Выделение, идентификация и хранение микромицетов и других микроорганизмов. Вильнюс, 1990. - С.61-62.

6.Иваница В.А., Кушниренко Е.К. Разработка методов хранения целлюлозолитических скользящих бактерий //В сб.: Выделение, иденти

фикация и хранение микромицетов и других микроорганизмов. Вильнюс, 1990. - С.57-60.

7.Иваница В.А., Ворохова Е.Л. Некоторые проблемы сохранения жизнеспособности коллекционных культур бактерий. //В сб.:Выделение, идентификация и хранение микромицетов и других микроорганизмов. Вильнюс, 1990. - С.55-56.

8.Иваница В.А., Джахуди А.Г., Гомонюк В.В. Скользящая микрофлора мидий прибрежной зоны Одесского залива //Микробиол. ж.-1992 - 54, №5. - С.10-16.

9.Иваница В.А., Гудзенко Т.В., Джахуди А.Г. Изучение патогенных свойств скользящих бактерий на модели культуры клеток мантии мидий //Микробиол. ж.-1992 .-№5.-С. 17-21.

10.Цыбань А.В., Иваница В.А., Худченко Г.В., Панов Г.В. Биологические характеристики морских микроорганизмов // В кн.: Исследование экосистем Берингова и Чукотского морей, под ред. Израэля Ю.А., Цыбань А.В. Гидрометеиздат, С.-П., 1992. - С.193-211.

11.Цыбань А.В., Иваница В.А., Худченко Г.В., Панов Г.В. Характеристика доминирующей микрофлоры открытой части Берингова моря // В кн.: Исследование экосистемы Берингова и Чукотского морей под ред. Израэля Ю.А., Цыбань А.В. Гидрометеиздат, С.-П., 1992. - С.642-650.

12.Цыбань А.В., Иваница В.А., Худченко Г.В., Панов Г.В., Барина С.П. Таксономический состав гетеротрофных бактерий //В кн.: Исследование экосистемы Берингова и Чукотского морей, под ред. Израэля Ю.А., Цыбань А.В. Гидрометеиздат, С.-П., 1992. - С.166-171.

13.Tsyban A.V., Panov G.V., Ivanitsa V.A., Khudchenko G.V. Biological Features and Genotoxic Properties of Microorganismis // In Results of the Third Joint US-USSR Bering and Chukchi Seas Expedition (BERPAC), Summer, 1988, Nagel, P.A. (ed.) US Fish and Wild life Service, Washington D.C. 1992. - P.103-110.

14. Tsyban A.V., Panov G.V., Ivanitsa V.A., Khudchenko G.V. Taxonomic Composition of heterotrophic bacteria. // In Results of the Third Joint US-USSR Bering and Chukchi Seas Expedition (BERPAC), Summer, 1988, Nagel P.A.(ed.) US Fish and Wild life Service, Washington, D.C. 1992. - P.87-90.

15. Іваниця В.О. Стан і мінливість мікробних ценозів в умовах антропогенного забруднення прісноводних і морських екосистем. // Мікробіол. ж., 1994, -56, №1.-61с.

16. Иваница В.А., Худченко Г.В., Панченко Н.Н., Бухтияров А.Е., Мединец В.И. Микробиологические исследования прибрежных вод Черного моря на участке от устья Дуная до устья Днепра. // В сб. научных трудов, УкрЭНЦЕМ, вып.1, 1994. - С.54-67.

17. Іваниця В.О., Єлінська Н.О., Бугайцова Ж.А., Ворохова О.Л., Гомонюк В.В., Чердинцева Т.А. Екологія, біологічні властивості, таксономія і колекція гетеротрофних колових бактерій. //Мікробіол. ж., 1994, -56, №1. -С.114-115.

18. Лысенко А.М., Бугайцова Ж.А., Иваница В.А. Уровень гомологии ДНК некоторых видов рода Cytophaga. // Микробиол. ж. 1995, 57, №3 - С.48-53.

19. Николенко С.И., Иваница В.А. Использование миксобактерий в качестве индикаторов сельскохозяйственного загрязнения природных ресурсов. //Медицинская реабилитация, физиотерапия . 1995, №1. - С.53-55.

20. Иваница В.А., Худченко Г.В., Бурлака Т.В., Нгуен Тхи Тху Ха. Биологические особенности гетеротрофных бактерий Балтийского моря // Одесса, 1995. - 25 с. - Деп. в ВИНТИ.

21. Иваница В.А., Худченко Г.В., Бурлака Т.В., Нгуен Тхи Тху Ха. Биологические особенности гетеротрофных бактерий Берингова моря. // Одесса, 1995. - 19с. -Деп. в ВИНТИ.

22.Елинская Н.А., Худченко Г.В., Иваница В.А. Биологические свойства *Cytophaga lytica*, выделенной из морской среды //Матер. науч. конф. мол. ученых Одес. ун-та, Одесса, 22-23 сент., 1989. С.Биол./Одес. ун-т.-Одесса, 1989. - С.171-175.

23.Кушниренко Е.К., Елинская Н.А., Иваница В.А. Распространение скользящих бактерий в пресных водоемах Украины //Материалы науч. конф. мол. ученых Одес. ун-та, Одесса, 22-23 сент., 1989. С.Биол./Одес. ун-т.-Одесса, 1989. - С.191-195.

24.Иваница В.А. Микробиологические методы экологического мониторинга морской среды. // Тез. докл. республиканской научно-практической конференции (9-11 октября 1990 г.Одесса), Киев, 1990. - С.46-47.

25.Ivanitsa V.A., Khudchenko G.V., Buchtiarov A.E., Medinets V.I. Ecology-microbiological monitoring of coastal waters in north-western part of the Blac Sea.//Blac Sea Regional Conference on Environment protection Technologies for coastal areas. Union of Scientists in Bulgaria, 1995, - pp 79-86.

26.Ivanitsa V.A., Panchenko N.N., Buchtiarov A.E., Resistance of geterotrophic microbiota of the river Danube and its lakes to toxicants and antibiotics./ In Symposium on ecological chemistry, Kishinev, 1995. -p.98.

27.Vasilyeva T.V., Panchenko N.N., Vasilyeva N.Y., Khachirova S.D., Ivanitsa V.A. Genotoxic estimation of water and soil Quality by biotesting methods./ In: Symposium on ecological chemistry. Kishinev, 1995. -p.121.

Ivanitsa V.A. The state and variability of microbial coenoses of marine ecosystems.

Doctor of Sciences Dissertation, specialization 03.00.07 - Microbiology, Institute Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1996.

The material of 46 scientific publications on the complex investigation of microbial coenoses of marine ecosystems of the world's ocean is defended.

Sensibility of the bacteria genetic system to the mutagenic effect of chemical contamination in coastal waters and open sea has been shown. The mode of mutability of microbial coenoses composition, increase of their destructive and resistant potential as well as antibioticresistance and pathogenicity of saprorhytic bacteria under the conditions of permanent antropogenic contamination of marine ecosystems have been established.

Иваница В.А. Состояние и изменчивость микробных ценозов морских экосистем.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.07. - микробиология, Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 1996.

Защищается 46 работ, которые содержат материалы комплексных исследований микробных ценозов морских экосистем Мирового океана. Показана чувствительность генетического аппарата бактерий к мутагенному действию химического загрязнения в дозах, которые реально существуют в прибрежных и открытых районах морских водоемов. Установлены закономерности изменчивости микробных ценозов и возрастание деструктивного и резистентного потенциала, а также антибиотикорезистентности и патогенности сапрофитных бактерий в условиях хронического антропогенного загрязнения морских экосистем.

Ключові слова: морські екосистеми, мікробні ценози, таксономічний склад, гетеротрофні бактерії, ковзні бактерії, деструктивна активність, резистентність до токсикантів, антибіотикорезистентність, патогенність.



45243

Ав 33.727  
**АВ 33.727**

Подписано в печать 10.01.96. Формат 60x84/16  
Усл.печ.л.2,79. Зак.№ 12. Тираж 150 экз.  
Отпечатано с макета автора

---

АО БАХВА, 270009, г.Одесса, ул.Черняховского,6