

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЧОРНОГО МОРЯ



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЧОРНОГО МОРЯ

МОНОГРАФІЯ

Під редакцією

чл.-кор. НАН України, д-ра біол. наук, проф. В.О. ІВАНИЦІ

ОДЕСА
ОНУ
2021

УДК 579.68-047.37(262.5)

M597

DOI: <https://www.doi.org/10.18524/978-617-689-454-4>

Автори:

Іваниця В. О., Гудзенко Т. В., Страшнова І. В., Васильєва Н. Ю., Штеніков М. Д., Коротаєва Н. В., Лісютін Г. В., Горшкова О. Г., Воловач О. В., Потапенко К. С., Боброва О. Є., Іваниця Т. В., Філіпова Т. О., Чабан М. М.

Редактор: Іваниця В. О., чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.

Рецензенти:

О. М. Нікіпелова, доктор хімічних наук, професор Одеського державного екологічного університету

Б. Н. Мілкус, доктор біологічних наук, професор Одеського державного аграрного університету

І. І. Романовська, доктор біологічних наук, професор Фізико-хімічного інституту імені В.О. Богатського НАН України

Рекомендовано до друку Вченою радою ОНУ імені І. І. Мечникова
Протокол № 4 від 16 листопада 2021 р.

M597

Мікробіологічні дослідження Чорного моря: монографія / В.О. Іваниця, Т.В. Гудзенко, І.В. Страшнова, Н.Ю. Васильєва, М.Д. Штеніков, Н.В. Коротаєва, Г.В. Лісютін, О.Г. Горшкова, О.В. Воловач, К.С. Потапенко, О.Є. Боброва, Т.В. Іваниця, Т.О. Філіпова, М.М. Чабан; ред. В.О. Іваниця – Одеса: ОНУ, 2021 – 282 с.
ISBN 978-617-689-454-4

В монографії узагальнено результати багаторічних мікробіологічних досліджень Чорного моря, здійснених науковцями Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. З використанням класичних методів і метагеномного аналізу визначено таксономічний склад мікробіомів прибережних вод Одеської затоки, акваторії острова Зміїний і охарактеризовано біологічну різноманітність прокаріот основних відділів доменів Bacteria та Archaea. Наведено характеристику представників окремих таксономічних і фізіологічних груп мікроорганізмів чорноморської мікробіоти. Значну увагу приділено актинобактеріям, ізольованим з води Одеської затоки та факультативно-анаеробним споровітним бактеріям, виявленим вперше в глибоководних осадах Чорного моря, характеристиці геномів, екзометаболітів та їх біотехнологічному потенціалу.

Монографія розрахована на науковців морських мікробіологів, екологів, біотехнологів, а також аспірантів та студентів, які навчаються за спеціальностями мікробіологія, біологія та біотехнологія.

УДК 579.68-047.37(262.5)
M597

ISBN 978-617-689-454-4

© Іваниця В.О., Гудзенко Т. В., Страшнова І.В.,
Васильєва Н.Ю., Штеніков М.Д., Коротаєва Н.В. та ін., 2021
© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2021

ЗМІСТ

Передмова	6
Розділ 1. Мікробіологічна та вірусологічна характеристика морської води Одеської затоки та акваторії острова Зміїний	9
1.1. Методи дослідження	11
1.1.1. Методи санітарно-мікробіологічного дослідження	17
1.1.2. Виділення тіонових бактерій	19
1.1.3. Виявлення анаммокс бактерій	19
1.1.4. Виявлення міксобактерій	20
1.1.5. Визначення чисельності споротвірних бактерій	20
1.1.6. Виявлення алохтонних вірусів	21
1.1.7. Оцінка фізико-хімічних характеристик морської води	22
1.1.8. Оцінка генотоксичного і мутагенного впливу забруднення морської води	23
1.1.9. Статистична обробка даних	24
1.2. Мікробіологічні, вірусологічні та санітарно-екологічні дослідження морської води Одеської затоки	24
1.2.1. Санітарно-мікробіологічне дослідження води	24
1.2.2. Вміст гетеротрофних бактерій	27
1.2.2.1. Ковзні бактерії	28
1.2.2.2. Тіонові бактерії	30
1.2.2.3. Анаммокс бактерії	33
1.2.2.4. Бактерії, що утворюють ендоспори	36
1.2.3. Алохтонні віруси	38
1.2.4. Фізико-хімічні показники морської та порової води	42
1.2.5. Рівень генотоксичної та мутагенної активності забруднення морської води Одеської затоки	49
1.3. Мікробіологічні, вірусологічні та санітарно-екологічні дослідження морської води акваторії о. Зміїний	55
1.3.1. Санітарно-мікробіологічні дослідження морської води акваторії о. Зміїний	55
1.3.2. Протеолітичні бактерії в морській воді о. Зміїний	58
1.3.3. Ліполітичні мікроорганізми в морській воді о. Зміїний	60

1.3.4. Мікроорганізми, що окиснюють нафтопродукти і фенол	61
1.3.5. Морські дріжджі	66
1.3.6. Вірусологічні дослідження акваторії о. Зміїний	69
1.3.7. Фізико-хімічні показники проб морської води акваторії о. Зміїний	69
1.3.8. Рівень генотоксичної та мутагенної активності забруднення морської води акваторії о. Зміїний	75
Список використаної літератури	83

Розділ 2. Метагеномний аналіз мікробіоти прибережних вод Одеської затоки, острова Зміїний та причорноморських лиманів	
2.1. Методи дослідження	102
2.2. Мікробна різноманітність прибережних вод о. Зміїний	105
2.3. Мікробна різноманітність в воді причорноморських лиманів	114
2.4. Мікробна різноманітність в прибережних водах Одеської затоки	120
Список використаної літератури	133

Розділ 3. Актинобактерії Одеської затоки Чорного моря	
3.1. Методи дослідження	142
3.2. Морфологічна характеристика актинобактерій	144
3.3. Фізіолого-біохімічні властивості актинобактерій	153
3.4. Ідентифікація та спектри жирних кислот актинобактерій	160
Список використаної літератури	169

Розділ 4. Аеробні споротвірні бактерії глибоководних осадів Чорного моря	
4.1. Методи дослідження	184
4.1.1. Використані штами мікроорганізмів	184
4.1.2. Скринінг високоактивних антагоністів	186
4.1.3. Аналіз спектрів жирних кислот	186
4.1.4. Визначення фізіолого-біохімічних властивостей бактерій	187

4.1.5. Аналіз спектрів моносахаридів	188
4.1.6. Аналіз спектрів амінокислот	188
4.1.7. Аналіз спектрів екзометаболітів	189
4.1.8. Методи виділення та секвенування геномної ДНК	190
4.1.9. Збірка та аналіз загальних характеристик геномів	190
4.2. Мікробіота глибоководних донних відкладень Чорного моря	191
4.2.1. Чисельність спороутворювальних бактерій	191
4.2.2. Видова різноманітність споротвірних бактерій	199
4.3. Антимікробна активність спороутворювальних бактерій	203
4.4. Біологічна характеристика <i>B. velezensis</i> ONU 553, <i>B. pumilus</i> ONU 554, <i>B. subtilis</i> ONU 559	211
4.4.1. Культуральна та морфологічна характеристика	211
4.4.2. Фізіолого-біохімічні властивості	215
4.5. Біохімічний склад <i>B. velezensis</i> ONU 553, <i>B. pumilus</i> ONU 554, <i>B. subtilis</i> ONU 559	218
4.5.1. Спектри жирних кислот	218
4.5.2. Амінокислотний склад	220
4.5.3. Спектри моноцукрів	222
4.6. Характеристика геномів <i>B. velezensis</i> ONU 553, <i>B. pumilus</i> ONU 554, <i>B. subtilis</i> ONU 559	224
4.6.1. Загальна характеристика геномів <i>B. velezensis</i> ONU 553, <i>B. pumilus</i> ONU 554, <i>B. subtilis</i> ONU 559	224
4.6.2. Характеристика геному штаму <i>B. subtilis</i> ONU 559	229
4.6.3. Характеристика геному <i>Bacillus pumilus</i> ONU 554	233
4.6.4. Характеристика геному <i>B. velezensis</i> ONU 553	238
4.7. Характеристика екзометаболітів <i>B. velezensis</i> ONU 553, <i>B. pumilus</i> ONU 554, <i>B. subtilis</i> ONU 559	244
Список використаної літератури	265

ПЕРЕДМОВА

З тих пір, як в кінці дев'ятнадцятого століття розпочалися дослідження мікробного світу та його значення в житті людини, мікробіологи задалися питанням про різноманітність мікробного життя в морі, його ролі в океані, процесів взаємодії з морською флорою і фауною та його важливості для людей. Однак, незважаючи на новаторську роботу мікробіологів більшість морських дослідників до цього часу належним чином не усвідомлюють значення цієї області дослідження. Успіхи науковців на початку двадцять першого століття підняли морську мікробіологію на передній край науки, яка стрімко розвивається. Нові потужні інструменти, особливо в молекулярній біології і біоінформатиці привели до дивовижних відкриттів багатства і різноманітності морського мікробного життя і його ролі в глобальній екології. Стала зрозумілою фундаментальна роль, яку морські мікроби відіграють в біосфері.

Дослідження взаємодії морських мікробів з іншими гідробіонтами забезпечують інтригуючу можливість проникнення в суть таких явищ як харчові ланцюги та симбіоз. Оскільки деякі морські мікроби здатні викликати хвороби або пошкодження, їх потрібно вивчати і розробляти способи подолання їх.

Нарешті, у морських мікроорганізмів є корисні властивості, такі як виробництво нових продуктів і розробка нових процесів в області морської біотехнології. Морський мікробіом став непересічним ресурсом біологічної різноманітності та генетичного біотехнологічного потенціалу для блакитної біотехнології. Термін "мікробіом" став модним і використовується для опису всієї мікробної спільноти, тобто всіх мікроорганізмів та їх генетичної інформації в певному середовищі існування. Морський мікробіом включає всю сукупність одноклітинних організмів (бактерій, архей, мікроскопічних грибів, найпростіших, мікроскопічних водоростей) і вірусів, що мешкають в океані, його морях, лиманах, бухтах і фіордах.

Морський мікробіом відіграє основну роль у біогеохімічному колообігу елементів, у знешкодженні антропогенного хімічного забруднення, лежить в основі морської харчової мережі та важ-

ливий для регулювання клімату. Науковці також зробили великі відкриття біоактивних сполук, що синтезують морські мікроорганізми, які знайшли застосування в біотехнології, біоенергетиці та фармації, їх діяльність знайшла застосування в біоремедіації. Ми усвідомлюємо, що знаємо менше одного відсотка мікроорганізмів із усього мікробного різноманіття, тому морська мікробіологія обіцяє нам ще багато нових відкриттів.

Чорне море є унікальною та до цього часу мало вивченою позицією мікробіології морською водоймою з сірководневим шаром глибинних вод, що займають біля 90% його об'єму. Унікальність його підтверджується виявленням за останні роки все нових геологічних, біологічних та екологічних особливостей: виявлено крупні поклади газогідратів, відкрито глибоководні грязеві вулкани, струйні метанові газовиділення, карбонатні коралоподібні споруди, що пов'язані з невідомим раніше механізмом бактеріального окиснення метану. Комплексне дослідження та оцінка таксономічної різноманітності мікробіоти унікальної екосистеми Чорного моря сучасними метагеномними мікробіологічними методами дослідження до цього часу майже не проводилося.

Дані літератури щодо біологічної різноманітності мікробіоти Чорного моря на цей час дуже фрагментарні та стосуються лише окремих представників гетеротрофних мікроорганізмів, яких виявляють переважно в прибережній частині поверхневих вод моря. В першу чергу це стосується інформації про метанутворювальні та метанокиснювальні бактерії та оцінки їх вкладу в процеси утворення та окиснення метану, як важливого енергетичного продукту, карбонатні споруди біогенного походження та сульфатредукуювальні бактерії.

У цій монографії зібрано та наведено результати багаторічних досліджень акваторій Одеської затоки Чорного моря та острова Зміїний і тісно пов'язаних з ними причорноморських лиманів, які були здійснені мікробіологами кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології та Наукового центру морської біології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова в межах наукових проєктів, що були профінансовані Міністерством освіти і науки України.

Автори висловлюють вдячність керівникові Наукового центру інтегрованого моніторингу та екологічних досліджень к.ф.-м.н., с.н.с. Медінцю В.І. за організацію експедиційних досліджень на базі НДС Острів Зміїний, директору Морської гідробіологічної станції к.б.н., доц. Ковтуну О.О. за відбір проб гідробіонтів, води і морських відкладень в Одеській затоці, директорці Центру колективного користування наукового обладнанням за напрямом "Морська біологія, екологія та біотехнологія" Ракітській С. І. за матеріально-технічне забезпечення досліджень.

РОЗДІЛ 1. МІКРОБІОЛОГІЧНА ТА ВІРУСОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА МОРСЬКОЇ ВОДИ ОДЕСЬКОЇ ЗАТОКИ ТА АКВАТОРІЇ ОСТРОВА ЗМІЇНИЙ

**Гудзенко Т.В., Горшкова О.Г., Волювач О.В.,
Васильєва Н.Ю., Лісютін Г.В., Чабан М.М.,
Іваниця Т.В., Філіпова Т.О., Іваниця В.О.**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

Анотація

Комплексні мікробіологічні, вірусологічні, санітарно–екологічні та генотоксикологічні дослідження морської води Одеської затоки Чорного моря та акваторії острова Зміїний дозволили виявити вміст умовно-патогенних і санітарно-показових бактерій та вірусів в контактній зоні моря. Вперше з акваторії острова Зміїний виділено та ідентифіковано дріжджі, які віднесено до видів *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus neoformans*, *Aerobasidium pullulans*, *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium paludigenum*. Показано, що до складу домінуючих гетеротрофних бактерій входять представники малодослідженої групи ковзних бактерій. Ліполітичні бактерії, що здатні брати участь у процесах самоочищення морського середовища, виявлено в прибережній зоні о. Зміїний. Найбільша чисельність тіонових бактерій зереєстрована в районі Дачі Ковалевського - у місці з значним антропогенним навантаженням. Визначено вміст органічних і неорганічних токсикантів, а з використанням бактеріальних тест-систем *Salmonella typhimurium* TA100 та *Salmonella typhimurium* TA98 встановлено генотоксичний та мутагенний потенціал забруднення прибережних вод Одеської затоки та акваторії острова Зміїний.

Ключові слова: мікробіологічні, вірусологічні, хімічні, генотоксичні характеристики морської води, Чорне море, острів Зміїний

Вступ

Особливу увагу дослідників привертають проблеми екологічних ефектів, обумовлених діяльністю мікроорганізмів [38]. Відомо, що вони відповідають за утворення у водній товщі Чорного моря сірководню, а у верхній кисневій зоні – за його окиснення, так само мікроорганізми продукують та окиснюють метан. За рахунок цих процесів мікробіота фактично формує умови існування для інших морських організмів [15, 34, 107]. Проведені на глибоководних станціях в Каламітській затоці Чорного моря дослідження визначили чисельність окремих фізіологічних груп бактерій, що беруть участь в процесах кругообігу вуглецю, азоту, сірки і фосфору в поверхневому шарі води та в донних відкладеннях [15, 34]. Показано масове поширення анаеробних гетеротрофних, ліполітичних, вуглеводень окиснювальних, азотфіксувальних та сульфатвідновлювальних бактерій [107, 109].

Антропогенна діяльність інтенсивно позначається на стані водних ресурсів особливо в прибережних густонаселених районах Чорного моря, що значно погіршує їх рекреаційну привабливість та умови проживання місцевого населення. Актуальність проблеми базується на значному погіршенні в останні роки екологічного та мікробіологічного стану пляжів та морської води в прибережних районах української частини Чорного моря. Це в свою чергу знижує рекреаційну якість приморських районів, призводить до зменшення кількості відпочиваючих і туристів та, відповідно, до значних економічних збитків держави та місцевого населення [13, 17, 29, 100, 109].

В останні роки особливо екологічна ситуація погіршилася в рекреаційних районах Одеського прибережжя, де вода не відповідає нормативам за мікробіологічними показниками, спостерігається масовий ріст в воді мікро- та макроводоростей, а пляжі перетворилися на гнійник через масовий викид водоростей на берег. З іншого боку, перехід від традиційного використання природних біологічних ресурсів до їх цілеспрямованого вирощування (аквакультура) також вимагає створення вискоєфективної системи біологічного контролю та технологій для дотримання якості не лише природних вод, а й гідробіонтів, у першу чергу молюсків, які використовуються як харчові продукти, тому що їх біологічне

забруднення є небезпечним перш за все з епідеміологічних позицій [13, 16, 29]. Особливо важливим є виявлення екологічних резервуарів вірулентних штамів мікроорганізмів у молюсків, зоопланктону і т.ін.) [12, 14, 53, 60, 90, 106, 107].

У результаті природного добору дія хімічних полютантів призводить до розквіту домінуючих форм мікроорганізмів, які адаптувалися до нових умов і витіснили з біоценозів форми, що не пристосовані до дії сторонніх для морського середовища сполук. Солоність, температура, наявність світла, евтрофікація, сумісна дія різних ксенобіотиків (важкі метали, СПАР та ін.) впливають на виживаність патогенної мікробіоти [16, 42, 45]. Сучасні стандарти якості води базуються на визначенні концентрації бактерій-індикаторів забруднення, таких як *E. coli* і ентерококи.

Отже результати комплексних мікробіологічних, вірусологічних, генотоксикологічних та санітарно-екологічних досліджень прибережних морських акваторій є вкрай важливими для встановлення закономірностей поширення, складу й чисельності мікробного планктону і бентосу та внесення ясності у розуміння процесів змін, як на рівні гетеротрофного ценозу, так і на рівні окремих представників, під дією генотоксичних полютантів.

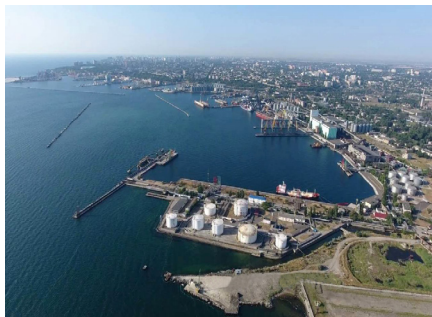
1.1. Методи дослідження

Матеріалом для дослідження були проби морської та порової води інтерстиціальних порожнин зони псамоконтуру (зона заплеску), відібрані у період з 2010 по 2015 роки в прибережних водах Одеської затоки з різним рівнем антропогенного забруднення: **a** - Лузанівка (у цьому районі здійснюється скид стічних вод із станції біологічного очищення "Північна", м. Одеса), **b** - Нафтова гавань Одеського порту, **c** - Гідробіологічна станція Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, **d** - Дача Ковалевського (у районі випуску стічних вод станції біологічної очистки "Південна", м. Одеса) (рис. 1.1, 1.2).

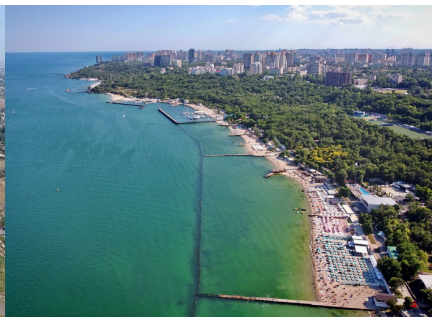
Географічне позиціонування станцій відбору проб проводили за допомогою GPS-навігаційної системи Garmin 12. Координати місць розташування станцій відбору проб морської води в Одеській затоці наведені в таблиці 1.1.



a



b



c



d

Рис. 1.1. Райони відбору проб морської води в Одеській затоці
 Позначення: *a* - Лузанівка, *b* - Нафтова гавань Одеського порту,
c - Гідробіологічна станція, *d* - Дача Ковалевського

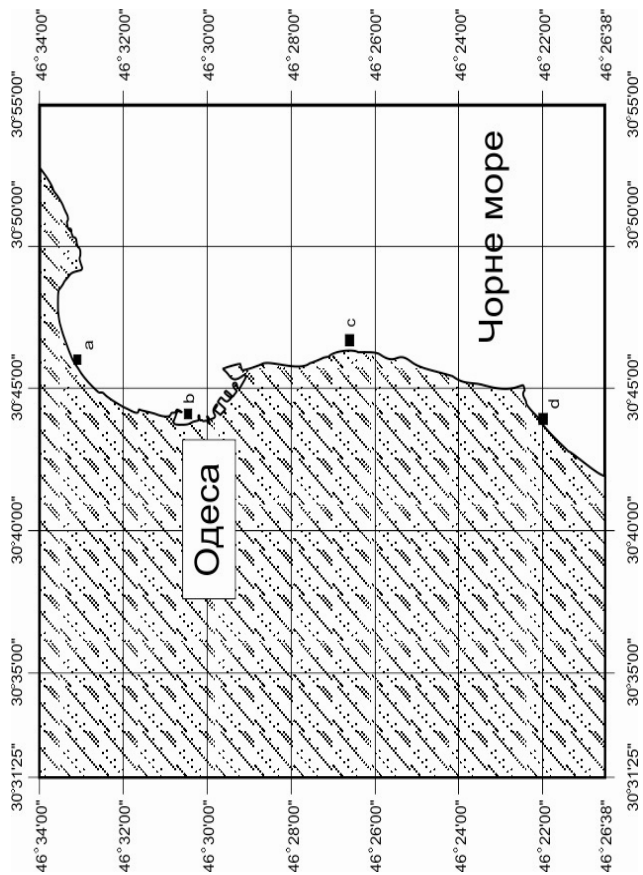


Рис. 1.2. Карта-схема розташування станцій відбору проб в прибережних водах Одеси
Позначення: *a* - Лузанівка, *b* - Нафтова гавань, *c* - Гідробіологічна станція, *d* - Дача Ковалевського

Таблиця 1.1

**Координати станцій відбору проб морської води
в Одеській затоці**

Станція	Район	Широта	Довгота
<i>a</i>	Лузанівка	46°33'05"	30°45'55"
<i>b</i>	Нафтова гавань	46°30'38"	30°43'59"
<i>c</i>	Гідробіологічна станція	46°26'28"	30°46'21"
<i>d</i>	Дача Ковалевського	46°22'01"	30°43'50"

Проби морської води відбирали на відстані 15 м від урізу води з поверхневого горизонту (50 см). Порову воду інтерстиціальних порожнин зони псамоконтуру відбирали в зоні заплеску з горизонту 50 см на відстані 2 м вище урізу води.

У ході комплексних експедицій на острів Зміїний у 2010 - 2015 році проби морської води відбирали на станціях - *a, b, c, d, e, f, m*, віддалених на 100 м від берега, та прибережних станціях - *g, h, i, j, k, l* на відстані 2–15 м від урізу води з поверхневого горизонту (50 см) (рис. 1.3, 1.4).



Рис. 1.3. Острів Зміїний

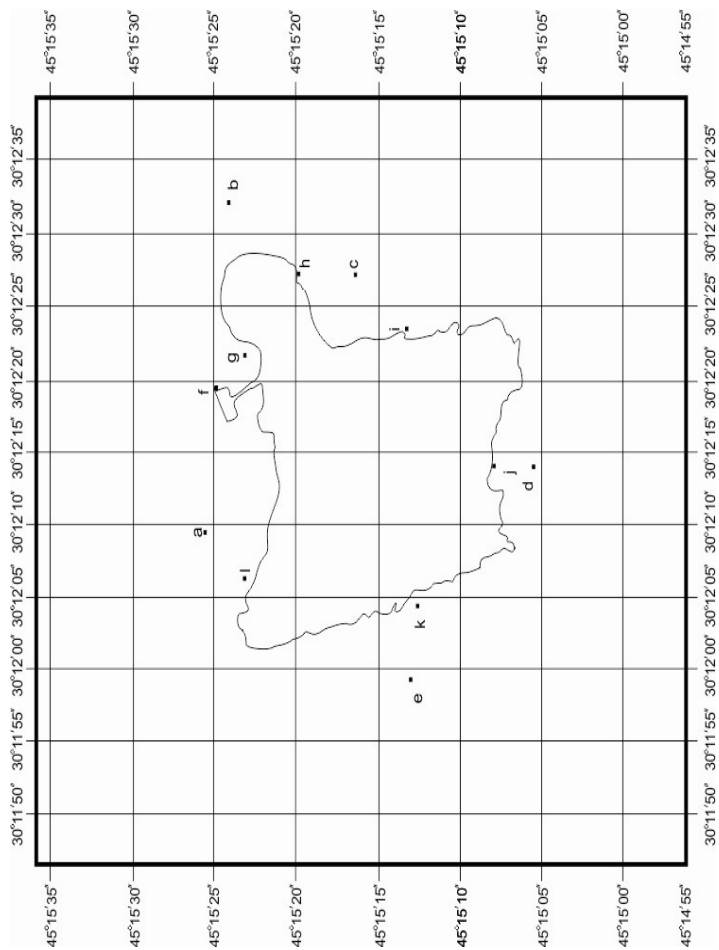


Рис. 1.4. Карта-схема станцій відбору проб в акваторії острова Змийний

Координати місць розташування станцій відбору проб морської води в акваторії о. Зміїний наведені в таблиці 1.2. Для відбору проб води для мікробіологічних досліджень використовували стерильні скляні ємності об'ємом 0,5 л і 3 л. Після відбору води ємності герметично закорковували.

Таблиця 1.2

Координати станцій відбору проб морської води в акваторії острова Зміїний

Станція	Широта	Довгота
Віддалені від берега станції		
<i>a</i>	45°15'44,0"	30°12'15,0"
<i>b</i>	45°15'44,0"	30°12'51,0"
<i>c</i>	45°15'31,0"	30°12'45,0"
<i>d</i>	45°15'13,0"	30°12'21,0"
<i>e</i>	45°15'25,0"	30°11'96,0"
<i>f</i>	45°15'26,7"	30°12'17,9"
<i>m</i>	45°17'30,0"	30°06'50,0"
Прибережні станції		
<i>g</i>	45°15'24,2"	30°12'19,7"
<i>h</i>	45°15'21,8"	30°12'27,0"
<i>i</i>	45°15'14,2"	30°12'21,4"
<i>j</i>	45°15'09,9"	30°12'11,0"
<i>k</i>	45°15'25,0"	30°11'97,0"
<i>l</i>	45°15'25,1"	30°12'04,1"

Проби морської води для аналітичного хімічного аналізу відбирали в скляні ємності (0,75 л), які заповнювали до країв і герметично закривали. Проби води консервували додаванням 1 мл 35% розчину азотної кислоти. До лабораторії проби транспортували у сумках-холодильниках при 4–5 °С впродовж до 2 год.

1.1.1. Методи санітарно-мікробіологічного дослідження

Санітарно-мікробіологічні дослідження морської води проводили у 2015 році за показниками: індекс лактозо-позитивних кишкових паличок (ЛКП), індекс *E.coli*, індекс ентерококів, індекс стафілококів, наявність колифагів, патогенних мікроорганізмів [75].

Для ідентифікації мікроорганізмів використовували загальновідомі комерційні поживні середовища: м'ясо-пептоний агар, м'ясо-пептоний бульон (МПБ) з 1% глюкози, вісмут-сульфітний агар, середовища Ендо, Сабуро, Гіса, Олькеницького, тіогліколеве, а також елективні та диференціально-діагностичні поживні середовища та системи індикаторні паперові (СП), сироватки аглютинуючі типові холерні, полівалентні ешеріхіозні та сальмонельозні (ABCDE) адсорбовані для реакції аглютинації, аглютинуючі адсорбовані О полівалентні сальмонельозні рідких груп [68, 70, 71].

Відповідно до „Санітарних правил та норм охорони поверхневих вод від забруднення”, вода у водоймах, що використовуються для рекреації, повинна відповідати наступним вимогам: індекс ЛКП не повинен перевищувати 500 кл/л, *E. coli* – 1000 кл/л, ентерококів – 500 кл/л, стафілококів – 100 кл/л і бляшкоутворюючих одиниць (БУО) колифагів – 1000 БУО/л [75].

Загальне мікробне число (ЗМЧ) визначали методом глибинного посіву серійних розведень води у поживне середовище і враховували усі колонії мікроорганізмів, що виростили при температурі 37 °С протягом 24 год чи при 22 °С протягом 48 год. За результатами визначали середньоарифметичне значення числа колоній [68].

Для якісного виявлення аміаку (NH_3), що виробляється в результаті життєдіяльності амоніфікаторів, використовувався реактив Неслера - лужний розчин дегідрату тетраїодомеркурату (II) калію ($\text{K}_2[\text{Hg}_4(\text{H}_2\text{O})_2]$). Реактив додавали в пробірки по 500 мкл, при взаємодії з аміаком утворювався червоно-коричневий осад (Hg_2N)I x H_2O [71, 96].

Визначення найбільш ймовірного числа бактерій в одиниці об'єму висіву вихідної проби морської води здійснювали в 3-х повторях в 6 розведеннях, кратних 10. Для обчислення користу-

валися таблицею Мак-Креді. Отримані значення найбільш вірогідного числа бактерій перераховували на 1 л та переводили в колі-титр [71, 87].

У якості основного показника ступеня фекального забруднення води водойми визначали лактозопозитивні кишкові палички (ЛКП), до яких відносяться грамнегативні, неспороутворювальні палички, що ферментують лактозу до кислоти і газу при температурі 37 °С протягом 24 год, з негативним оксидазним тестом. Число лактозопозитивних кишкових паличок визначали титраційним методом [68].

До групи кишкових паличок (БГКП), відносили лактозопозитивні кишкові палички, які ферментують лактозу при температурі 44,5 °С і утворюють індол при даній температурі. При оцінці одержаних даних мало значення число БГКП у воді та їх відношення до лактозопозитивних кишкових паличок. Наявність у воді *E. coli* більше 1000 в 1 л свідчить про нещодавне надходження господарсько-фекального забруднення, про незавершені процеси самоочищення, про недотримання вимог до очищення стічних вод і т.ін. [68, 85].

Ентерококи виявляли для підтвердження характеру забруднення. При індексі ентерококів більше 500 припускається попадання свіжого фекального забруднення. У групу ентерококів відносять два вида фекальних стрептококів: *S. faecalis*, що має основне індикаторне значення, і *S. faecium*. Позитивним результатом вважали наявність аспідно-чорних опуклих великих з металевим блиском колоній і сіруватих дрібних колоній [70].

Стафілококи визначали у воді водойм, що використовуються для купання, як показник забруднення води мікробіотою верхніх дихальних шляхів і шкірних покривів людини. При оцінці якості води індикаторними вважають стафілококи, що володіють лецитиназною активністю, в основному *S. aureus*. Сигнальне значення для регламентації навантаження на зону купання має наявність понад 100 бактерій стафілококів у 1 л води. Наявність стафілококів визначали титраційним методом посівом у стерильну сольову пептонну воду. Посіви інкубували при температурі 37 °С протягом 48 год. Висів з посівів робили на молочно-жовточно-сольовий агар [68].

Ідентифікацію сальмонел здійснювали шляхом вивчення колоній на щільних диференційно-діагностичних поживних середовищах Ендо та вісмут-сульфітному агарі. Відібрані колонії засівали штрихом по скошеному агару й уколом у стовпчик комбінованого середовища Олькеницького для первинної ідентифікації та здійснювали ідентифікацію культур рухливих грамнегативних паличок, які не ферментують сахарозу, не розщеплюють сечовину, ферментують глюкозу з газоутворенням, не утворюють індол і утворюють сірководень [70].

1.1.2 Виділення тіонових бактерій

Виділення та культивування тіонових бактерій здійснювали на щільних середовищах Бейерінка та Натанзона [87]. Середовище Бейерінка вважається універсальним для виділення нейтрофільних тіонових бактерій, а середовище Натанзона - для виділення нейтрофільних галофільних тіонових бактерій. При приготуванні середовищ враховували солоність морської води. Наявність росту спостерігали протягом 7 - 10 діб. Облік кількості колоній, проводили методом прямого підрахунку колоній, що виросли на щільному середовищі після висіву з відповідних розведень [9, 87].

1.1.3 Виявлення анаммокс бактерій

Для виявлення анаммокс бактерій (анаеробне хемолітотрофне окиснення амонію) використовували мінеральне поживне середовище [112, 139] наступного складу (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,0514; NaNO_2 – 0,024; NaNO_3 – 0,010; KHCO_3 – 1,248; NaH_2PO_4 – 0,05; CaCl_2 – 0,3; MgSO_4 – 0,2; FeSO_4 – 0,006; EDTA – 0,006 [118, 119]. Посіви інкубували 4 доби (на четверту добу визначали кількість газу, що виділився) та визначали концентрацію амонія і нітриту [79, 140, 141]. Для ідентифікації анаммокс бактерій використовували метод FISH аналізу з використанням специфічних зондів [66, 126], що наведено у таблиці 1.3.

Зонди, використані для виявлення анамокс бактерій

Зонд	Послідовність 5' – 3'	Специфічність	Джерело
Amx368F	CCTTTCGGGCATTGCGAA	Yci Anammox	Schmid et al.(2003)
Amx820R	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	<i>Brocadia and Kuenenia</i>	Schmid et al.(2000)
Kts1275	TCGGCTTTATAGGTTTCGCA	<i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	Schmid et al.(2000)

1.1.4 Виявлення міксобактерій

Для виділення міксобактерій з проб морської води з зони заплеску використовували метод висіву на бактеріальні круги [37, 43, 46]. На поверхню голодного агару наносили добові культури кормових бактерій (*Escherichia coli* або *Bacillus subtilis*) та розподіляли по поверхні поживного середовища у вигляді кругів діаметром 2-3 см. У центр круга наносили 10 мкл морської води та інкубували при 28 °C упродовж 18 діб. Починаючи з 3 доби інкубації, ріст культур контролювали за допомогою мікроскопу два рази на добу. У разі виявлення плодових тіл міксобактерій, їх збирали та переносили на чашки Петрі з голодним агаром, збагаченим 10⁹ КУО\чашка дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та інкубували впродовж 7 діб. Після інкубації проводили підрахунок плодових тіл міксобактерій [46, 52, 65].

1.1.5 Визначення чисельності бактерій, що утворюють ендоспори

Для визначення загального мікробного числа ендоспороутворювальних бактерій та чисельності ендоспор 100 мкл проби без розведення висівали на МПА та середовище Горбенко на штучній морській воді (18% морської солі). Для виявлення ендоспор аліквоту проби піддавали пастеризації у режимі +80 °C впродовж 10 хв [79, 121].

Інкубацію інокульованих чашок проводили за температури 25 °C для підрахунку КУО мезофілів та +5 °C - для психрофілів та психротолерантних мікроорганізмів, відповідно. Трива-

лість інкубації складала 2 доби для визначення мезофілів та 7 діб для визначення психрофілів та психротолерантних бактерій [122, 124].

1.1.6. Виявлення алохтонних вірусів в морській воді

Дослідження проводили у 2015 році згідно методичних рекомендацій [69], для чого використовували серологічні, вірусологічні та молекулярно-генетичні (полімеразну ланцюгову реакцію) методи досліджень. Серологічні методи (імуно-ферментний аналіз) проводили на діагностичних тест-системах з метою виявлення антигенів вірусу гепатиту А та ротавірусів групи А. Полімеразну ланцюгову реакцію (тест-системи «Амплі-Сенс») використовували з метою виявлення ДНК аденовірусів, РНК астровірусів, РНК ентеровірусів, РНК каліцівірусів, РНК норовірусів. Вірусологічні дослідження проводили на перещеплюваних лініях культури клітин RD, L20B, Hep2. Концентрацію вірусів у пробах води визначали за допомогою гідрогелю метилкремнієвої кислоти (ГГМКК) та аеросилу [4, 5, 18-20, 69].

Для вірусологічних досліджень проби морської води відбирали у стерильний посуд. Для відбору проб води використовували скляні ємності об'ємом 3 л. Кожну пробу маркували з позначенням місця відбору, точки відбору, найменування проби, дати та часу відбору та зберігали на холоду при температурі 4 – 8 °С.

Аденовіруси концентрували шляхом адсорбції за допомогою аміноетоксіяеросила і його антигенів при рН 4,5-5,0. Відділення сорбенту з адсорбованим на ньому вірусом чи антигеном від інших компонентів суспензії і елюцію в трис-буферний розчин проводили при слабколужному значенні рН (7,8-8,2). Для обстеження води використовували також методику збору і концентрування вірусів за допомогою пакета з макропористим склом. Концентрацію вірусів визначали, базуючись на принципі сорбції вірусних часток сорбентом класу кремнеземів – макропористим склом марки МПС 1000 ВГХ і наступною десорбцією їх невеликим обсягом елюентів [35, 36, 120].

Для концентрації ентеровірусів у пробах води використовували спосіб концентрації на ультрафільтраційній системі „Мінітан” з використанням фільтрів „Millipore” чи „Sinpore”. Пробу

води пропускали через пластини з діаметром пор 0,45-0,80 мкм чи мікропористі капронові мембрани з діаметром пор 0,20 мкм із подальшою адсорбцією вірусу на фільтрах і одержанням концентрату вірусу з фільтрів шляхом рециркуляції води.

У процесі проведення моніторингу поширення циркуляції кишкових вірусів у водному середовищі для визначення антигенів коро-, рота-, рео-, аденовірусів і ВГА використовували експрес-метод імуноферментного аналізу (ІФА), для виявлення РНК ентеровірусів, астровіруса, ротавіруса, норовіруса 1 і 2 типів і ДНК аденовірусів використовували ПЛР [19, 20, 59, 72].

1.1.7. Оцінка фізико-хімічних характеристик морської води

Оцінку фізико-хімічних характеристик морської води здійснювали у 2015 році за питомою електропровідністю, значенням рН, величиною поверхневого натягу. Значення рН реєстрували йономіром типу ЄВ-74 за допомогою скляного електроду, допоміжного електроду, термокомпенсатору, не пізніше, ніж через 2 год після відбору проби. Величину поверхневого натягу (σ) відносно контролю – $(\sigma(\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}))_{18} = 73,05 \text{ мН/м}$ визначали за методом Вільгельмі [75].

Концентрації амонію, нітриту та нітрату в морській воді визначали електрофотометрично з використанням хімічної реакції йонів на реактив Несслера, реактив Гріса та фенолсульфідокислоти [6, 7].

Для виявлення іонів важких металів (ІВМ) у пробах морської води їх попередньо консервували 3 мл HCl на 1 л проби при аналізі на вміст Al , Fe , Cu , Ni тощо; 3 мл HNO_3 на 1 л проби при аналізі на вміст Pb , Se , Sr тощо. Концентрацію ІВМ (хром, цинк, мідь, кадмій, свинець) визначали методом електротермічної ААС з використанням приладу «Сатурн-2» у полум'ї суміші «повітря – пропан – бутан» при довжині хвилі 324,7 нм для Cu ; 228,8 нм для Cd ; 213,9 нм для Zn ; 283,3 нм для Pb тощо. Концентрацію Hg визначали методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії [75].

Вміст гідрокарбонат-іонів визначали титриметричним методом; хлорид-іонів - осаджувальним аргентометричним методом та перевіряли додатково меркурометричним титруванням; іонів магнію та кальцію – комплексонометричним титруванням; іонів

натрію та калію – полум'яно-фотометричним методом; сульфат-іонів – осаджувальним титруванням [33].

За вмістом хлорид-іонів, користуючись розширеним рівнянням Кнудсена (1), або спрощеним його виразом (2), визначали солоність (S у проміле - ‰):

$$S\text{‰} = 0,030 + 1,805\text{Cl‰}. \quad (1)$$

$$S\text{‰} = 1,80655\text{Cl‰}. \quad (2)$$

1.1.8 Оцінка генотоксичного і мутагенного впливу забруднення морської води у тест-системі *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100

Генотоксичну активність відібраних зразків проб води визначали у 2015 році за основними методиками [10, 11, 102, 103]. Для визначення токсичності (властивість або якість, що приводить до загибелі живих організмів) і мутагенності (властивість або якість, що характеризує перебудови у генетичному апараті) об'єктів навколишнього природного середовища використовували методи біотестування [104, 105, 125, 127, 134].

У наших дослідженнях як тест-об'єкт використовували мутантні штами *Salmonella typhimurium* TA 100 та *Salmonella typhimurium* TA 98. При біотестуванні на токсичність основною функцією тест-організму було виживання, а інтегральним показником – чисельність життєздатних клітин. При оцінці мутагенної активності функцією тест-організму обрана індукція мутацій, а відносним показником – кількість His⁺ ревертантів. Усі дослідження проводили у п'яти повторах. Використаний для біотестування мутантний штам *S. typhimurium* TA 100 дефектний за системою синтезу гістидину та біотину, і, внаслідок цього, неспроможний до самостійного розмноження поза лабораторних умов. Використання вказаного штаму дозволяє реєструвати токсичну дію і виявляти мутації, що виникають за типом заміни пар основ, обумовлені плазмідною *his D* 33052 [10, 11].

Мутантний штам *Salmonella typhimurium* TA 98 дозволяє реєструвати індуковані мутації типу зсуву рамки прочитування, що забезпечує мутація *his G* 46. Як методична основа біотестування на токсичність і мутагенність за допомогою *S. typhimurium* TA 100 та TA 98 використовували уніфіковану методику [10, 11, 102].

Показником токсичної дії була кількість клітин, що вижили, в досліді (%) в порівнянні з контролем. Критерієм токсичної дії при оцінці в тест-системі *Salmonella typhimurium* TA 100 та *Salmonella typhimurium* TA 98 слугувало статистично достовірне зменшення кількості життєздатних клітин. Класифікацію токсичної дії проводили за шкалою [11]: - на 50 та > % - потужна токсична дія; - на 35-50% - помірна токсична дія; - на 15-35% - слабка токсична дія; - на 15 та < % - відсутність токсичної дії.

Показник мутагенної дії розраховували за формулою: $N = T_{\text{сac}}/T_{\text{мпа}}$; де N - концентрація мутацій; $T_{\text{сac}}$ - кількість бактерій-ревертантів, що вирости на середовищі САС; $T_{\text{мпа}}$ - кількість клітин, що вирости на повноцінному середовищі МПА. Показники мутагенної дії групували за наступної шкалою: слабка мутагенна дія - перевищення рівня спонтанного мутагенезу менше ніж у 2 рази; помірна мутагенна дія - перевищення рівня спонтанного мутагенезу від 2 до 5 разів; потужна мутагенна дія - перевищення рівня спонтанного мутагенезу від 5 до 10 разів та більше. Контролем слугувала дистильована вода з додаванням морської солі.

1.1.9 Статистична обробка даних

Статистичну обробку даних проводили за стандартними методиками з використанням програмного пакета Microsoft Excel XP 2007. Набір і макетування тексту здійснювали з використанням текстового редактора Microsoft Word XP 2007. Висновки зроблені з урахуванням рівня значимості $\alpha = 0,05$.

1.2. Мікробіологічні, вірусологічні та санітарно-екологічні дослідження морської води Одеської затоки

1.2.1. Санітарно-мікробіологічне дослідження води

Відомо, що мікробіота прибережної зони моря піддається складному впливу кліматичних та антропогенних факторів, що спричиняють періодичні різкі зміни їх якісного та кількісного складу. Важливим таким фактором є винесення в море з суходолу біогенних елементів та мікроорганізмів разом з водними потоками, що спричинені опадами [115]. Екосистема порових вод інтерстиціальних порожнин зони псамоконтуру (зона заплеску)

пісчаних пляжів берегів Одеси може відігравати роль фільтру для такого потоку, затримуючи клітини мікроорганізмів на їх шляху до моря.

Фундатором вчення про псамоконтур є видатний український вчений гідробіолог академік НАН України, д.б.н., професор Ювеналій Петрович Зайцев. Масштаби контурних біотопів, по Зайцеву, вимірюються метровими відстанями, а видова різноманітність, чисельність, біомаса і продуктивність організмів, що їх населяють (контуробіонтів), у свою чергу, істотно перевищує ці показники мешканців контактних зон моря. У зв'язку з граничним положенням контурні спільноти виявились «екологічними мішенями» для різних негативних факторів [38-41, 137, 138].

Підтвердження даної гіпотези важливо як для раціоналізації процесу функціонування пляжів так і з фундаментально-наукової точки зору. Зона контакту трьох середовищ – піску, води та повітря – псамоконтур – являє собою маловивчений морський біотоп, і зокрема з точки зору його ролі у функціонуванні екосистеми моря [38 – 41, 114, 138].

Результати санітарно-мікробіологічного дослідження морської та порової води інтерстиціальних порожнин зони псамоконтуру (зона заплеску) прибережної зони Чорного моря наведено у табл. 1.4.

Морська вода, відібрана навесні у рекреаційних зонах Одеського узбережжя – у районі Дачі Ковалевського та Гідробіологічній станції ОНУ імені І.І. Мечникова, не відповідала нормативам за індексом лактозопозитивних кишкових паличок - індекс ЛКП у 2,0–3,7 рази перевищував гранично припустимий показник – 1000 кл/л.

У морській воді, відібраній на станції Дача Ковалевського у районі скиду господарсько-фекальних стічних вод, індекс *E. coli* сягав 1300 кл/л, що свідчить про незавершені процеси самоочищення води [24, 54, 56].

У поровій воді зони псамоконтуру, відібраній навесні у районі Дачі Ковалевського і на Гідробіологічній станції, індекс ЛКП у 240 разів перевищував нормативний показник. Про високий ступінь мікробного забруднення порової води свідчить також виділення бактерій роду *Proteus*.

Таблиця 1.4

Мікробіологічні показники морської та порової води прибережної зони Одеської затоки

Місце відбору		Мікробіологічні показники					
		Індекс ЛКП, кл/л $\times 10^2$	Індекс Е. сої, кл/л	Індекс ентеро-коків, кл/л	Індекс стафіло-коків, кл/л	Колі-фаги	Патогенна мікробіота
Весна							
d - Дача Ковалевського	Морська	20 $\pm$ 3	1300	<500	<50	0	0
	Порова	2400 $\pm$ 20	<500	<500	<50	0	протей
c - Гідробіологічна станція	Морська	37 $\pm$ 6	<500	<500	<50	0	0
	Порова	2400 $\pm$ 50	<500	<500	<50	0	протей
Літо							
d - Дача Ковалевського	Морська	50 $\pm$ 4	600	<500	<50	0	0
	Порова	2400 $\pm$ 30	6200	<500	<50	0	0
c - Гідробіологічна станція	Морська	2400 $\pm$ 20	2300	<500	<50	0	0
	Порова	2400 $\pm$ 50	2300	<500	<50	0	0
Осінь							
d - Дача Ковалевського	Морська	28 $\pm$ 5	<500	<500	<50	0	0
	Порова	2400 $\pm$ 30	2300	<500	<50	0	0
c - Гідробіологічна станція	Морська	6 $\pm$ 1	<500	600	<50	0	0
	Порова	37 $\pm$ 5	<500	<500	<50	0	0

Влітку високий рівень фекального забруднення був зареєстрований у морській та поровій воді з Гідробіологічної станції - індекс ЛКП та індекс *E.coli* сягали, відповідно, $2400 \pm 20 \times 10^2$ кл/л та 2300 кл/л, інші санітарно-бактеріологічні показники були у межах норми.

Максимальний індекс ЛКП був зареєстрований влітку у поровій воді зони заплеску, відібраній у районі Дачі Ковалевського, індекс *E.coli* у 12,4 разів перевищував нормативний показник. У морській воді, що відібрана на відстані 15 м від берега, індекс ЛКП не перевищував 500 кл/л, а індекс *E.coli* – 600 кл/л. Восени високим рівнем фекального забруднення характеризувалася порова вода зони псамоконтуру з Дачі Ковалевського, показники індексів ЛКП та *E. coli* були максимальними та сягали, відповідно, 2400 кл/л і 2300 кл/л.

Санітарно-бактеріологічні показники морської води у районі Гідробіологічної станції ОНУ восени практично відповідали нормі, у той час як у поровій воді цей показник перевищував норматив у 3,7 рази. Таким чином, результати наших досліджень збігаються з даними літератури [22, 51, 61, 74, 92, 95, 128] та свідчать про велике значення зони псамоконтуру в очищенні морської води від алохтонних санітарно-показових мікроорганізмів [61].

1.2.2. Вміст гетеротрофних бактерій

Гетеротрофні бактерії є потужним агентом трансформації і акумуляції практично всіх видів забруднюючих речовин [22, 25, 51]. Одним з критеріїв оцінки екологічного стану морської прибережної зони служать аеробні гетеротрофні бактерії зони заплеску, як показник нейтралізації антропогенного забруднення. Тому важливим є порівняльний аналіз частоти виділення окремих груп гетеротрофних мікроорганізмів з морської та порової води псамоконтуру.

Проведені дослідження дозволили констатувати, що найбільша чисельність гетеротрофних бактерій Чорного моря концентрується в контактній зоні моря. Це - прибережні райони, лимани, естуарії [45, 46, 47, 117].

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 поступово зменшується до 10^2 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.

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"), м. Чорноморська та портів [38, 44, 98, 133].

1.2.2.1. Ковзні бактерії

Дослідження таксономічного складу мікробного ценозу Одеської затоки показало, що до складу домінуючих гетеротрофних бактерій входять представники малодослідженої групи ковзних бактерій, що отримали свою назву завдяки специфічному виду пересування [52, 65, 83]. Ковзні бактерії в Чорному морі, зокрема в районі Одеського прибережжя були виявлені в наших попередніх дослідженнях (табл. 1.5) [37].

Встановлено, що чисельність ковзних бактерій коливається в середньому від 10^2 до 10^4 КУО/мл. Максимальні значення зареєстровано в дельті Дунаю, Одеській затоці, Дністровському лимані [37].

Чисельність цитофаг у воді Одеської затоки в середньому сягає 3,0-5,0 тис. КУО/мл. Число цитофаг у поверхневих та придонних шарах води на більшості станцій Одеського прибережжя було відносно однаковим.

Тяжіння ковзних бактерій до щільних субстратів, завдяки специфічному механізму пересування, визначає високий рівень контамінації цими бактеріями мушлі мідій. Чисельність їх на поверхні стулук у деяких випадках сягала 10^5 КУО/см² (табл. 1.6).

Високий рівень контамінації мантиї мідій 10^2 - 10^5 КУО/г си-рої маси демонструє здатність молюсків акумулювати ці бактерії

Таблиця 1.5

**Вміст цитофаг у воді та ґрунті прибережної зони
Одеської затоки восени (тис. КУО/мл)**

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

Примітка: * - дослідження не проводили

Таблиця 1.6

Контамінація мідій ковзними бактеріями

Станція	Мантія (КУО/г) $\times 10^2$	Поверхня (КУО/см ²) $\times 10^2$
Лузанівка	3500 ± 54	130 ± 19
Гавань	1700 ± 135	76 ± 7
Ланжерон	1600 ± 93	63 ± 14
Дельфін	4700 ± 83	8 ± 2
Біостанція	1200 ± 46	300 ± 20
Аркадія	3000 ± 81	400 ± 19
10-а ст. В.Фонтану	1800 ± 75	3000 ± 49
16-а ст.В.Фонтану	3000 ± 72	260 ± 71

у внутрішніх органах за рахунок фільтрації води. Відсутність значних коливань чисельності ковзних бактерій на поверхні та в мантії мідій, зумовлених місцем мешкання молюсків, дає підстави припускати, що вони репрезентують природних мешканців цих гідробіонтів.

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 на стулках мідій, зібраних на 10-й станції Великого Фонтану.

Для виділення міксобактерій з проб морської води з зони заплеску використовували метод висіву на бактеріальні круги. Отримані результати свідчать про те, що в поровій воді інтерстиціальних порожнин зони псамоконтуру, відібраний влітку на Гідробіологічній станції, міксобактерії не виявили [43-45]. У пробах порової води зони заплеску, відібраних влітку на Дачі Ковалевського, були виявлені міксобактерії, які за формою плодових тіл та наявності характерного жовтого пігменту були ідентифіковані як *Mucococcus xantus*. Можливо наявність цих алохтонних для морської води мікроорганізмів можна пояснити потраплянням міксобактерій з прибережного ґрунту [77].

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 [37, 77].

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.

1.2.2.2. Тіонові бактерії

Вибір для дослідження зони заплеску був обґрунтованим деякими факторами. По-перше, біологічні та фізико-хімічні процеси на межі розділу фаз визначають повноту деструкції речовин різної хімічної природи, які потрапляють з водної товщі, та вносять свій вклад в кругообіг хімічних елементів і зміну трофності морського середовища [136]. По друге, саме сапрофітна мікробіота циклу азоту і сірки грають особливу роль в цьому процесі, як найбільш пристосовані до трансформації речовин складові мікророспільства [76, 84, 88].

Тіонові бактерії, які беруть участь в циклі сірки, володіють ще однією унікальною особливістю - здатністю пристосовуватись до змін умов проживання. Дослідження цієї групи мікроорганізмів були ускладнені їх особливостями росту – малими розмірами колоній (до 0,1 мм в діаметрі), відсутністю явної пігментації колоній, що робить їх "невидимими" на поверхні агару і достатньо довгим періодом утворення колоній після посіву.

Виділення та культивування штамів тіонових бактерій здійснювали на щільних середовищах Бейерінка та Натанзона [87]. При приготуванні середовищ враховували солоність морської води. Наявність росту спостерігали протягом 7-10 днів. Відомо, що чисельність тіонових бактерій Чорного моря, культивованих при аеробних і анаеробних умовах практично не відрізняється [6], тому культивування проводили в аеробних умовах.

На рис. 1.5 наведена кількість нейтрофільних тіонових бактерій, які вирости на щільних середовищах Бейерінку та Натанзона з проб води та зони заплеску, що були відібрані влітку та восени у районі Дачі Ковалевського та Гідробіологічної станції.

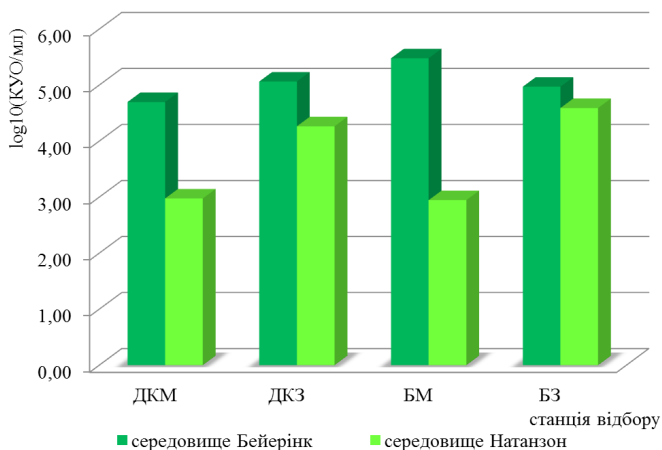
Максимальна кількість тіонових бактерій ($3,01 \pm 0,11 \times 10^5$ КУО/мл), що вирости на щільному середовищі Бейерінка, була зареєстрована у воді прибережної зони у районі Гідробіологічної станції. Чисельність тіонових бактерій у зоні заплеску біля Гідробіологічної станції була нижчою - $9,37 \pm 0,57 \times 10^4$ КУО/мл.

Мінімальною була чисельність тіонових бактерій влітку у прибережній морській та поровій воді біля Дачі Ковалевського – $5,00 \pm 0,56 \times 10^4$ КУО/мл, $1,16 \pm 0,09 \times 10^5$ КУО/мл, відповідно.

Для визначення галофільних тіонових бактерій використовували середовище Натанзону, до складу якого входить 30,0 г NaCl. Чисельність галофільних тіонових бактерій була мінімальною в прибережних водах, причому різниця між показниками чисельності тіонових бактерій, що вирости на середовищі Натанзона з проби води, відібраної біля Дачі Ковалевського та Гідробіологічної станції, була незначною – $9,47 \pm 0,16 \times 10^2$ КУО/мл та $8,87 \pm 0,10 \times 10^2$ КУО/мл, відповідно.

У воді зони заплеску чисельність галофільних тіонових бактерій була більшою у пробі води з Гідробіологічної станції – $3,90 \pm 0,22 \times 10^4$ КУО/мл. Кількість бактерій, які вирости на щільно-

1



2

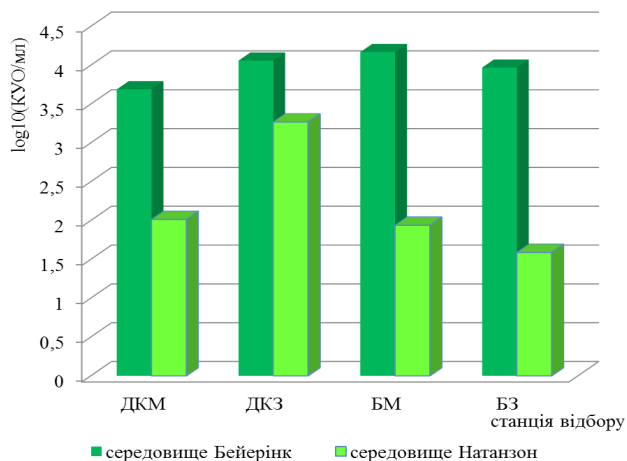


Рис. 1.5. Вміст нейтрофільних тіонових бактерій у морській та порівій воді зони заплеску влітку (1) та восени (2)

Примітка: ДК - Дача Ковалевського, Б - Гідробіологічна станція

му середовищі Натанзона, при висіві з проби, відібраної з зони заплеску в районі Дачі Ковалевського склала $1,87 \pm 0,15 \times 10^4$ КУО/мл.

Кількість бактерій, що вирости на щільному середовищі Бейерінка, при висіві з проби, відібраної в районі Дачі Ковалевського склала $5,0 \pm 0,19 \times 10^3$ КУО/мл. Висів проби води з зони заплеску показав наявність $1,2 \pm 0,02 \times 10^4$ КУО тіонових бактерій в

одному мілілітрі. Приблизно таку ж кількість колоній тіонових бактерій реєстрували в морській воді, відібраній в районі Гідробіологічної станції – $1,5 \pm 0,1 \times 10^4$ КУО/мл, а в зоні заплеску кількість бактерій, що вирости на середовищі Бейерінка, була дещо меншою – $9,4 \pm 0,2 \times 10^3$ КУО/мл.

При висіві з проби, відібраної в районі Дачі Ковалевського з морської води кількість галофільних тіонових бактерій, що вирости на чашках з середовищем Натанзона становила $1,04 \pm 0,05 \times 10^2$ КУО/мл, з зони заплеску – $1,90 \pm 0,01 \times 10^3$ КУО/мл. В той час як кількість галофільних тіонових бактерій у морській воді та зоні заплеску біля Гідробіологічної станції була незначною ($8,80 \pm 0,15 \times 10^1$ КУО/мл та $3,9 \pm 0,1 \times 10^1$ КУО/мл, відповідно).

Отримані результати щодо чисельності тіонових бактерій у прибережній воді Одеської затоки, узгоджуються з даними літератури. За результатами дослідження Бурдіян Н. В. [8], чисельність тіонових бактерій в прибережних водах варіювала до $4,5 \times 10^4$ КУО/мл. При цьому показано, що найбільша чисельність тіонових бактерій була зареєстрована у місцях, де спостерігають значне антропогенне навантаження.

Таким чином, найбільша кількість нейтрофільних тіонових бактерій була характерна для води, відібраної в районі Дачі Ковалевського у зоні заплеску – $1,16 \pm 0,09 \times 10^5$ КУО/мл влітку та $1,20 \pm 0,02 \times 10^4$ КУО/мл - восени, та морської води з акваторії Гідробіологічної станції – $3,01 \pm 0,11 \times 10^5$ КУО/мл влітку і $1,50 \pm 0,04 \times 10^4$ КУО/мл восени. Максимальна кількість галофільних тіонових бактерій зареєстрована в зоні заплеску в районі Гідробіологічної станції влітку – $3,90 \pm 0,12 \times 10^4$ КУО/мл, та Дачі Ковалевського – $1,9 \pm 0,02 \times 10^3$ КУО/мл восени.

Як відомо з літературних джерел максимальна кількість тіонових бактерій спостерігається в зонах з підвищеним антропогенним тиском [8]. Район Дачі Ковалевського - це район, який є найбільш забрудненим побутовими стоками в акваторії Одеської затоки, чим і пояснюється висока чисельність тіонових бактерій.

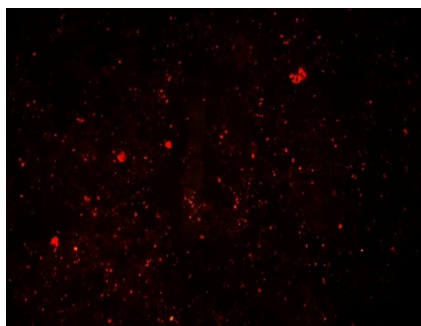
1.2.2.3. Анаммокс бактерії

Пройшло близько 20 років з моменту відкриття бактерій, які відповідають за АНАММОКС (ANAMMOX) *Anaerobic*

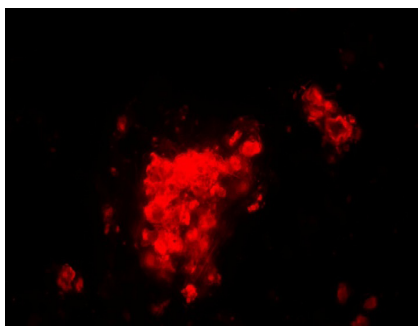
AMMonium OXidation процес – анаеробне окиснення аміаку з використанням нітриту як акцептора електронів з виділенням в навколишнє середовище молекулярного азоту та нітрату [118, 119]. На сьогодні, завдяки молекулярно-генетичним дослідженням анаммокс мікроорганізмів, їх виділено у п'ять родів, які були віднесені до нового створеного порядку *Candidatus Brocadiales* класу *Planctomycetia* [110, 139, 141]. Дослідження реакції анаммокс бактерій до зміни різних фізичних факторів показало їх здатність адаптуватися до змін температури і pH [66, 99, 129, 140].

Використана у наших дослідженнях гібридизація із зондом *Amx368F* показала, що порова вода зони псамоконтуру відібрана влітку на Гідробіологічній станції, містить велику кількість анаммокс бактерій, колонії яких у люмінесцентному мікроскопі виглядають як яскраво червоні конгломерати, що світяться (рис. 4).

FISH аналіз з використанням видоспецифічного зонду *Ktx1275* [129] показав, що влітку у основній масі анаммокс бактерії у поровій воді зони заплеску на Гідробіологічній станції були представлені видом *Kuenenia stuttgartiensis* (рис. 1.6, 1.7).



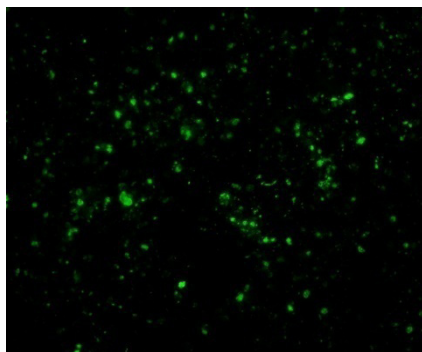
(x100)



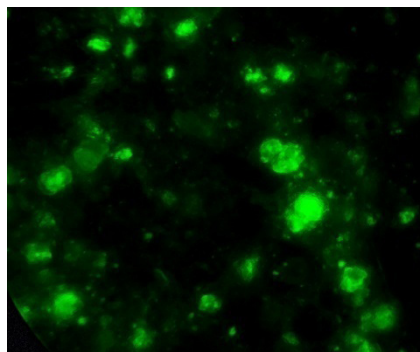
(x400)

Рис. 1.6. Колонії анаммокс бактерій при гібридизації із зондом *Amx368F*

При гібридизації з зондом *Ktx1275* у люмінесцентному мікроскопі колонії бактерій *Kuenenia stuttgartiensis* виглядали як яскраво зелені конгломерати, що світяться.

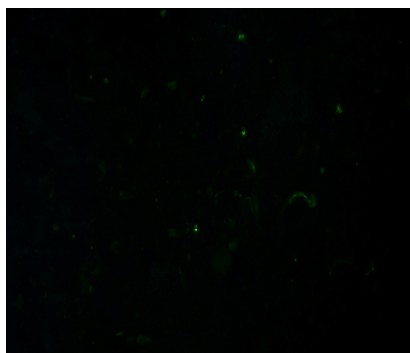


А (x100)



Б (x400)

Kuenenia stuttgartiensis



В (x100)

Brocadia

Рис. 1.7. Колонії бактерій *Kuenenia stuttgartiensis* (А, Б) при гібридизації з зондом Kts1275 та роду *Brocadia* (В) при гібридизації із зондом Amx820R

Використання родоспецифічного зонду Amx820R показало, що у поровій воді чисельність представників роду *Brocadia* значно менша ніж бактерій роду *Kuenenia* (виду *Kuenenia stuttgartiensis*).

Отримані дані щодо залишкового амонію та нітриту у поєднанні з FISH мікроскопією підтверджують наявність анаммокс бактерій в поровій воді зони псамоконтуру, що відібрана влітку на Гідробіологічній станції, а їх концентрація в пробі, проаналі-

зованої методом FISH, свідчить про те, що на глибині 50 см зони заплеску є усі необхідні умови для існування цієї групи мікроорганізмів [99, 110, 139].

1.2.2.4. Бактерії, що утворюють ендоспори

Частиною майже всіх аеробних мікробіот планети Земля є факультативно-анаеробні ендоспороутворювальні бактерії (ФАЕБ). Дві особливості біології цих мікроорганізмів забезпечують їм космополітичне поширення у біосфері: це надзвичайно різноманітна та гнучка фізіологія, що дає представникам цієї групи широкі можливості по адаптації до різноманітних умов та здатність до утворення ендоспор [115, 116, 133].

Ендоспора являє собою унікальний феномен не лише у світі прокариот, а й у живій природі взагалі – практично позбавлена вільної води та АТФ структура, що на багато порядків більш резистентна за вегетативну клітину до дії практично всіх небезпечних факторів довкілля і може зберігати життєздатність протягом тисяч років, і що не менш важливо – швидко проростати одразу після потрапляння до сприятливих умов. Функції ендоспори полягають не лише у збереженні виду за несприятливих умов, а й у поширенні через конвективні потоки води, повітря та механічне перенесення іншими живими істотами [121].

ФАЕБ являють собою яскравих представників зимогенної мікробіоти, що активно ростуть лише за наявності високо сприятливих умов довкілля (в першу чергу – наявності великої кількості досяжних поживних речовин) та по мірі вичерпання ресурсу переходять у стан ендоспори, в якому і проводять більшу частину свого життєвого циклу [122, 124].

Результати досліджень спороутворювальних бактерій представлені у табл. 1.7. та на рис 1.8. З яких видно, що навесні, влітку та восени у морській воді, відібраний в 15 м від берега, спори мезофільних ендоспороутворювальних бактерій не виявлялися.

Навесні в поровій воді псамоконтуру на станції Дача Ковалевського ендоспори мезофільних бактерій також не були виявлені у той час як влітку їх чисельність була максимальною. Восени цей показник знижувався. Це можна пояснити поступовим вимиванням ендоспор мезофілів з зони псамоконтуру наприкінці

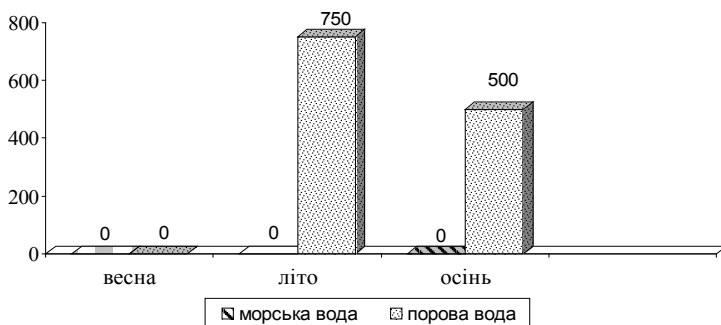


Рис. 1.8. Чисельність ендоспор (КЮО/мл) мезофільних бактерій у морській та поровій воді дачі Ковалевського навесні, влітку та восени

Таблиця 1.7.

Загальне мікробне число та чисельність ендоспор мезофільних та психрофільних бактерій у морській та поровій воді (КЮО/мл $\times 10^2$)

Точка відбору проб води		Мезофіли		Психрофіли	
		ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори
d - Дача Ковалевського	Морська	4388 $\pm$ 105	0	440 $\pm$ 11	20 $\pm$ 1,2
	Порова	4068 $\pm$ 58	5 $\pm$ 1	219,15 $\pm$ 10,2	0
c - Гідробіологічна станція	Морська	54,8 $\pm$ 3,1	0,35 $\pm$ 0,01	3,15 $\pm$ 1,10	0
	Порова	34 $\pm$ 4,2	41,8 $\pm$ 2,2	6,15 $\pm$ 0,70	0

теплого сезону [124]. Восени показники загального мікробного числа мезофільних бактерій у морській та поровій воді на станції Дача Ковалевського були максимальними та відрізнялися один від одного незначно.

Число вегетативних клітин психрофільних бактерій у морській воді на станції Дача Ковалевського у 2 рази перевершувало цей показник у поровій воді. Чисельність ендоспор психрофільних ендоспороутворювальних бактерій у морській воді, навпаки була максимальною.

У поровій воді псамоконтуру на станції Дача Ковалевського ендоспори психрофільних бактерій не були виявлені. Восени у морській та поровій воді на Гідробіологічній станції загальне мікробне число мезофільних та психрофільних бактерій було на два порядки менше ніж на станції Дача Ковалевського. Чисельність спор мезофільних ендоспороутворювальних бактерій у поровій воді на Гідробіологічній станції більше ніж у 100 разів була вище ніж у морській воді. При цьому спори психрофільних бактерій у морській та поровій воді практично не виявляли.

В цілому, найбільш виразними є дві тенденції: це перевага концентрації вегетативних форм над ендоспорами та більш висока концентрація обох форм бактерій у псамоконтурі у порівнянні з морською водою. Перше може бути пояснено, по-перше, зимогенним характером екофізіології ендоспороутворювальних бактерій, по-друге, все ще відносно високою температурою води в даний період року (жовтень) [122]. З останнього також виходить пояснення іншої тенденції – перевага концентрації мезофільних бактерій над психрофільними, що спостерігалася у всіх пробах води, крім однієї. Мікробота псамоконтуру має проміжний характер між мікробіотами морської води та ґрунту, і містить певну кількість ендоспороутворювальних бактерій.

Таким чином, можна стверджувати, що псамоконтур відіграє роль природнього фільтру, який певною мірою звільнює потік води з суходолу від надлишку біогенних елементів та аллохтонних мікроорганізмів [116].

1.2.3. Алохтонні віруси

Забруднення об'єктів навколишнього середовища патогенними алохтонними вірусами відбувається переважно через неочищені, недостатньо очищені та знезаражені господарсько-побутові стічні води. Є багато доказів щодо ролі водного фактора у поширенні вірусів поліомієліту, гепатиту А та описано епідеміологічні спалахи водного характеру. Відомо, що через воду можуть розповсюджуватися віруси гепатиту А, ентеровіруси, ротавіруси, аденовіруси, каліцівіруси, астровіруси [4, 36, 57, 58, 67, 69, 72, 89, 97]. Зростаюче антропогенне біологічне навантаження на гідросферу сприяє збільшенню їх кількості у воді, а отже це має важли-

ве епідемічне значення, так як віруси відіграють важливу роль в інфекційній патології людей.

Для України особливо важливим є екологічний стан Чорного моря, яке є практично «закритою» водоймою і тому особливо чутливою до біологічного забруднення. Вплив найбільш повноводних рік, що впадають у Чорне море теж дуже важливий при розповсюдженні вірусів і мікроорганізмів. Ріки Дунай, Дніпро, Дністер, Південний Буг привносять у море значну кількість алохтонних вірусів патогенних для людини. Завдяки своїй екологічній пластичності, патогенні віруси з суші здатні адаптуватися до нових умов гідросфери з освоєнням нових хазяїв [36].

Алохтонні віруси потрапляють у водойми зі антропогенними стоками. Морські мешканці Чорного моря є носіями вірусів багатьох хвороб тварин і людини, а вживання морепродуктів призводить до спалахів різних важких захворювань. Вірусологічні та серологічні дослідження чорноморських савців виявили контакти їх не тільки з вірусом гепатиту, але і з вірусом птишиного грипу та морбіллівірусами [89]. Антропогенне забруднення Чорного моря (води і донних осади) і гідробіонтів патогенними для людей вірусами призводить до придбання нових, більш вірулентних, властивостей. Встановлено циркулювання патогенних вірусів в організмі чорноморських молюсків-фільтраторів [73]. Здатність кишкових вірусів не тільки зберігатися, але і розмножуватися в організмах деяких видів найпростіших свідчить про вплив біоти, що заповнює з суші екологічну нішу гідросфери та гідробіонтів патогенними вірусами людини і тварин [89].

Проведені санітарно-вірусологічні дослідження в морській воді з Дачі Ковалевського у районі скиду стічних вод виявили вірус гепатиту А (табл. 1.8).

Виявлення антигену ВГА навесні та восені, може бути пов'язано з тим, що віруси краще зберігаються у навколишньому середовищі при низьких температурах. Вірус гепатиту А може зберігатися у воді від 3 до 10 місяців [35, 73]. Внаслідок порушення правил очистки та знезараження стічних вод, які скидаються у відкриті водойми, відбувається їх забруднення. Влітку у досліджених пробах морської та порової води ДНК аденовірусів, РНК астровірусів, РНК ентеровірусів, РНК каліцівірусів, РНК норові-

Таблиця 1.8.
Вірусологічні показники морської та порової води зони заплеску прибережної зони
Одеської затоки

Місце відбору проби води	Вірусологічні показники							
	ДНК адено- вірусів	РНК астро- вірусів	РНК ВГА	РНК ентеро- вірусів	РНК каліці- вірусів	РНК Норо- вірусів	РНК рота- вірусів	
Весна								
<i>d</i> - Дача Ковалевського	Морська	-	-	+	-	-	-	-
	Порова	-	-	-	-	-	-	-
<i>c</i> - Гідробіологічна станція	Морська	-	-	-	-	-	-	-
	Порова	-	-	-	-	-	-	-
Літо								
<i>d</i> - Дача Ковалевського	Морська	-	-	-	-	-	-	-
	Порова	-	-	-	-	-	-	-
<i>c</i> - Гідробіологічна станція	Морська	-	-	-	-	-	-	-
	Порова	-	-	-	-	-	-	-
Осінь								
<i>d</i> - Дача Ковалевського	Морська	-	-	-	-	-	-	-
	Порова	-	-	-	-	-	-	+
<i>c</i> - Гідробіологічна станція	Морська	-	-	-	-	-	-	-
	Порова	-	-	-	-	-	-	-

Примітка: - не виявлено, + виявлено

русів, а також вірус гепатиту А і ротавіруси не виявлено. Восени у пробі порової води зони псамоконтуру на Дачі Ковалевського виявлено антиген ротавірусу групи А, який поширений у всьому світі [5, 24, 120].

Результати наших досліджень свідчать про велике значення зони псамоконтуру в очищенні морської води від санітарно-показових мікроорганізмів. У розпал купального сезону на пляжі багато відпочиваючих, що збільшує антропогенне навантаження на морське середовище. У рекреаційних зонах узбережжя Чорного моря з різним рівнем антропогенного забруднення - у районі випуска стічних вод у море на Дачі Ковалевського та в умовно чистому районі узбережжя – на Гідробіологічній станції реєструється велика кількість мікроорганізмів різних систематичних груп.

Піщані береги як величезні біофільтри затримують не лише алохтонні, у тому числі патогенні та санітарно-патогенні бактерії, але й автохтонні мікроорганізми, тому у морській воді на відстані 15 м від берегу реєструється значно менший ніж у прибережній зоні рівень мікробного забруднення [19, 59].

Вірусологічні дослідження морської води Одеського узбережжя показали, що морська вода не є виключенням, і також забруднена цими вірусами, хоча і має певну віруліцидну дію. У морській воді виявлені ротавіруси та вірус гепатиту А. Епідеміологічними особливостями досліджуваних вірусів було те, що вірус гепатиту А в стічних водах виділявся лише взимку, а ротавіруси - восени і взимку. Аналіз сезонної динаміки частоти виявлення найбільш розповсюджених вірусів: вірусу гепатиту А та ротавірусу показав, що найбільша частота виявлення гепатиту А та ротавірусу спостерігається у осінній період. Взимку відмічається спад частоти виявлення як вірусу гепатиту А, так і ротавірусів. А весною вони практично не реєструються або реєструються в окремих випадках.

Таким чином, результати наших досліджень свідчать про необхідність проводити постійний ретельний моніторинг санітарно- вірусологічного стану прибережної морської води Одеської затоки для попередження виникнення спалахів таких інфекцій як гепатит А, ротавірусної та ентеровірусної інфекції.

1.2.4. Фізико-хімічні показники морської та порової води

Чорне море є унікальним середовищем, яке піддається антропогенному впливу [7, 33, 40]. Близько 90% об'єму морської води позбавлено кисню. Через насиченість глибинних шарів води сірководнем там існують лише деякі види анаеробних бактерій. Найбільші ріки Чорноморського басейну (Дунай, Дніпр, Південний Буг та Дністр) визначають стан живих біологічних ресурсів усього Чорного моря та вносять ~80% забруднюючих речовин [111, 131, 132, 135].

Склад морської води, відібраної з акваторії Гідробіологічної станції та Дачі Ковалевського в різні пори 2015 року, наведений у табл. 1.9 -1.11 і на рис. 1.10 – 1.12, показує, що концентрація йонів NO_3^- не перевищувала норм ГДК: нітрати добре розчинні у воді, а тому вони добре видаляються із неї в результаті ефективної діяльності мікроорганізмів.

Нітрат-йони виявлено в осінній період, причому більше в морській воді, ніж у поровій. В усіх дослідних пробах води були відсутні нітрит-йони. Вміст сульфат-йонів в осінній період в районі Дачі Ковалевського зріс в 1,8 і 2,0 рази в прибережній зоні (морська вода) та в зоні заплеску (порова вода); та в 1,2 рази – в прибережній зоні (морська вода) в районі Гідробіологічної станції. Вміст гідрокарбонат-йонів в морській та поровій воді перевищував їх вміст в літній та осінній період [6, 26, 27, 81, 101].

Основною екологічною проблемою Чорного моря є забруднення різними високотоксичними політантами: йонами важких металів (ВМ), нафтою і нафтопродуктами, детергентами, хлорорганічними сполуками та іншими [113, 123, 130].

Дослідження показали, що в усіх досліджуваних пробах морської та порової води переважали йони: Zn (II) – $56,5 \pm 3,0$ мкг / дм^3 (порова вода Дачі Ковалевського, осінь); Cr (VI) – $44,10 \pm 3,0$ мкг / дм^3 (порова вода Дачі Ковалевського, осінь); Cu (II) – $32,0 \pm 2,0$ (порова вода Дачі Ковалевського, осінь); Pb (II) – $5,8 \pm 0,7$ мкг/ дм^3 (морська вода в районі Гідробіологічної станції, весна); Cd (II) – $0,18 \pm 0,03$ мкг/ дм^3 (морська вода в районі Дачі Ковалевського, весна) [54].

Незалежно від пори року і моніторингової зони спостерігали наступний ряд йонів ВМ по збільшенню їх концентрації:

Таблиця 1.9

Фізико-хімічні показники проб морської та порової води прибережної зони

Показник		Гідробіологічна станція - с				Дача Ковалевського - d			
		весна		літо		осінь		весна	
		морська	порова	морська	порова	морська	порова	морська	порова
Фізико-хімічні	Водневий показник (рН _{сер})	8,38± 0,1	8,05± 0,1	7,80± 0,1	7,45± 0,1	8,14± 0,05	8,01± 0,05	8,26± 0,1	7,97± 0,1
	Питома електропровідність	31,8	31,8	31,2	31,3	не визначено		32,0	31,4
		3,18x10 ⁻³	3,18x10 ⁻²	3,12x10 ⁻²	3,13x10 ⁻²	не визначено		3,20x10 ⁻²	3,14x10 ⁻²
Вміст N-вмісних неорганічних йонів	Нітрат-йони (NO ₃ ⁻)	26,0± 2,20	відсутн	відсутн	відсутн	9,75± 0,10	2,25± 0,21	відсутн	34,7± 2,50
	Нітрит-йони (NO ₂ ⁻)	відсутн	відсутн	відсутн	відсутн	відсутн	відсутн	відсутн	відсутн
	Йони амонію (NH ₄ ⁺)	17,2± 1,20	23,3± 2,20	11,5± 1,40	12,58± 1,40	не визначено		99,7± 8,5	20,4± 2,1
								17,96± 1,2	12,0± 1,80
								0,095± 0,007	0,095± 0,006
								0,45± 0,05	0,48± 0,04

Примітка: ГДК нітрат-йонів, нітрит-йонів та азоту амонійного для рибо-господарських водойм складає 40; 0,08 і 2,9 мг/дм³, відповідно

Таблиця 1.10

Компонентний склад морської та порової води зони заплеску прибережної зони

Вміст йонів, мг/дм ³	Гідробіологічна станція - с						Дача Ковалевського - d					
	весна		літо		осінь		весна		літо		осінь	
	морська	порова	морська	порова	морська	порова	морська	порова	морська	порова	морська	порова
Хлорид-йони (Cl ⁻)	9369± 872	12586± 1145	9310± 743	9364± 827	9205± 786	8700± 644	10289± 973	13118± 1239	11036± 984	9452± 851	18270± 1540	20569± 1765
Сульфат-йони (SO ₄ ²⁻)	1435± 127	1915± 143	1422± 96	1419± 138	1923± 169	1414± 115	1589± 109	2061± 183	1642± 156	1450± 98	2870± 174	3025± 224
Гідрокарбонат-йони (HCO ₃ ⁻)	397±28	366±31	320±17	305±24	244±16	336±23	427±29	472,8±34	275±18	366±26	244±19	214±13
Бромід-йони (Br ⁻)	4,3±0,2	20,0±3	24,0±2	25,5±2,1	9,24±1,4	5,43±0,7	89,0±7	34,0±5	23,17±1,8	23,76±2,2	17,20±1,4	16,0±1,3
Йони кальцію (Ca ²⁺)	255±18	342±23	248±21	263±19	280±24	300±25	278±26	366±22	301±17	195±14	280±18	306±24
Йони магнію (Mg ²⁺)	664±51	872±62	625±43	637±38	633±41	679±49	710±54	920±61	750±63	696±56	640±48	695±39
Йони натрію (Na ⁺)	5104± 432	6895± 541	3010± 276	2962± 179	4945± 346	5333± 397	5451± 478	7321± 572	5825± 476	5033± 408	5440± 437	5522± 396
Йони калію (K ⁺)	197±17	266±15	200±12	195±18	185±13	204±16	274±24	284±19	216±14	318±21	190±12	204±9

Примітка: ГДК_{шкідливості} (Cl⁻)=11,9 г/дм³; ГДК_{шкідливості} (SO₄²⁻)=3,5 г/дм³

Таблиця 1.11

Вміст неорганічних і органічних поллютантів у морській та поровій воді прибережної зони

Поллютант	Гідробіологічна станція - с						Дача Ковалевського - д					
	весна		літо		осінь		весна		літо		осінь	
	морська	порова	морська	порова	морська	порова	морська	порова	морська	порова	морська	порова
Вміст неорганічних поллютантів, мкг/дм ³												
Кадмій Сd (II), ГДК _{сд} = 10,0 мкг/дм ³	0,11± 0,02	0,12± 0,02	0,011± 0,004	0,012± 0,004	0,011± 0,004	0,011± 0,004	0,18± 0,03	0,18± 0,03	0,014± 0,004	0,017± 0,005	0,016± 0,003	0,023± 0,004
Свинець Рb (II), ГДК _{рб} = 10,0 мкг/дм ³	5,80± 0,70	3,80± 0,40	0,012± 0,005	0,015± 0,005	0,015± 0,003	0,015± 0,003	4,10± 0,45	4,10± 0,45	0,019± 0,004	0,022± 0,004	0,018± 0,004	0,024± 0,003
Мідь Cu (II), ГДК _{су} = 5,0 мкг/дм ³	8,50± 0,85	8,70± 0,85	20,00± 4,00	21,00± 4,00	22,00± 2,00	29,00± 2,00	3,20± 0,40	7,40± 0,60	24,00± 3,00	27,00± 3,00	24,00± 3,00	32,00± 2,00
Хром (VI), ГДК _{св(в)} = 1,0 мкг/дм ³	2,10± 0,30	8,70± 0,40	0,020± 0,002	0,020± 0,002	0,020± 0,003	0,020± 0,003	10,70± 1,50	4,30± 0,40	0,020± 0,003	0,02± 0,002	20,00± 3,00	44,10± 3,00
Цинк Zn (II), ГДК _{zn} = 50,0 мкг/дм ³	6,60± 0,45	10,90± 1,20	0,037± 0,004	0,037± 0,004	0,030± 0,003	0,035± 0,003	12,1± 2,00	40,2± 4,00	0,041± 0,004	0,044± 0,003	42,0± 4,00	56,5± 2,00
Σ Me (Zn+Cu+Pb)	20,90	23,40	20,10	21,10	22,05	29,05	19,40	51,3	24,07	27,08	66,02	88,52
Вміст органічних поллютантів, мг/дм ³												
Нафтопродукти, ГДК = 0,05 мг/дм ³	0,04± 0,005	прат. відсутн	3,40± 0,40	відсутн	0,05± 0,005	0,05± 0,005	0,38± 0,04	0,05± 0,005	0,15± 0,05	0,20± 0,03	0,05± 0,005	0,05± 0,005
Аніонні ПАР ГДК = 0,5 мг/дм ³	1,70± 0,25	1,70± 0,18	1,50± 0,20	1,60± 0,18	2,40± 0,25	2,20± 0,25	1,50± 0,20	2,00± 0,30	1,50± 0,17	1,90± 0,15	2,20± 0,35	2,40± 0,25

$Cd(II) < Pb(II) < Cu(II) < Cr(VI) < Zn(II)$. Виявлено найбільше перебільшення ГДК по йонам міді та йонам хрому шестивалентного та йонам цинку. Щодо йонів кадмію та свинцю, то протягом сезонного моніторингу морської та порової води в районах Гідробіологічної станції та Дачі Ковалевського їх концентрація не перевищувала норм ГДК.

Не дивлячись на мікрограмові кількості $Cd(II)$ та $Pb(II)$ їх концентрація у весняний період у морській та поровій воді в районі Гідробіологічної станції ($0,11 \pm 0,02$ мкг/дм³ – наприклад, по $Cd(II)$) та в районі Дачі Ковалевського ($0,18 \pm 0,03$ мкг/дм³ теж по $Cd(II)$) була на порядок вищою порівняно із літнім і осіннім сезоном по моніторинговим районам (рис. 1.9, А, Б).

Отже, морська і порова вода в районі Гідробіологічної станції та Дачі Ковалевського забруднена йонами міді, причому вони в більшій мірі містились в зоні заплеску.

Найбільший вміст йонів міді виявлено у поровій воді в районі Дачі Ковалевського. В цілому, моніторингові сезонні спостереження показали тенденцію до накопичення цього важкого металу, особливо в поровій воді (зона заплеску) Гідробіологічної станції і Дачі Ковалевського (рис. 1.9, В).

Йони міді досить швидко поглинаються гетеротрофними мікроорганізмами, які потім можуть осаджуватися на завислих речовинах і накопичуватися в донних відкладеннях. При цьому концентрація йонів міді у воді може бути значно нижче початкової. Згодом мікроорганізми можуть десорбувати йони міді і тим самим викликати повторне забруднення води, що може бути викликано зміною рН середовища, порою року, викидами тощо [26, 27]. Зазвичай, концентрація йонів міді у морській воді коливається від 0,5 до 3,5 мкг/дм³. Така концентрація $3,2 \pm 0,04$ мкг/дм³ була виявлена лише в одній пробі морської води, відібраної навесні 2015 року в районі Дачі Ковалевського.

Навесні концентрація йонів шестивалентного хрому в морській та поровій воді в районі Гідробіологічної станції та в районі Дачі Ковалевського перевищувала норму ГДК відповідно у 8,7 та 10,7 разів (рис. 1.9, Г).

Водорозчинні сполуки цинку також становлять велику загрозу для екосистеми. В осінній період послідовність накопичення

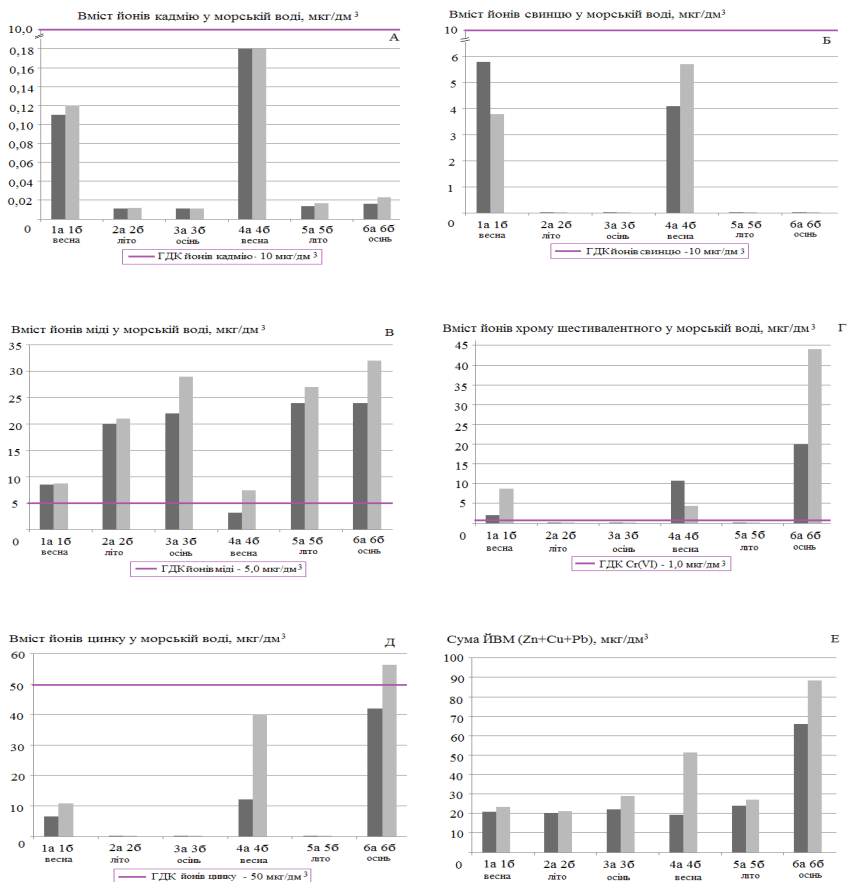


Рис. 1.9. Сезонна динаміка вмісту (у мкг/дм³) йонів важких металів: кадмію (А), свинцю (Б), міді (В), хрому шестивалентного (Г), цинку (Д), суми йонів ВМ Σ (Zn+Cu+Pb) (Е) (а – морська вода, б – порова вода), що відібрана 2015 року в районі Гідробіологічної станції (1, 2, 3) і Дачі Ковалевського (4, 5, 6)

йонів важких металів у поровій воді в районі Дачі Ковалевського становила: Cd (II) > Pb (II) > Cu (II) > Cr (VI) > Zn (II). По перевищенню концентрації йонів ВМ вище ГДК спостерігалась така закономірність: Zn < Cu < Cr. Загальна сума катіонів важких металів (Zn+Cu+Pb) в різні пори року була майже незмінною в морській воді Гідробіологічної станції (20,10-22,05) мкг/дм³, в по-

ровій воді зростала з 21,10 до 29,05 мг/дм³; у поровій воді Дачі Ковалевського зростала восени у три рази - до 88,52 мг/дм³.

В пробах морської та порової води поллютанти органічної природи: нафтопродукти і синтетичні поверхнево-активні речовини (ПАР) містились у концентраціях, що в декілька разів перевищують ГДК [26, 27]. Концентрація вуглеводнів нафти у морській та поровій воді в районі Гідробіологічної станції у весняний і осінній період не перевищувала ГДК 0,05 мг/дм³ – для морського середовища. В районі Дачі Ковалевського спостерігали протилежну тенденцію до накопичення вуглеводнів нафти у поровій воді в зоні заплеску; концентрація нафтопродуктів у декілька разів перевищувала норму ГДК (рис. 1.10, А).

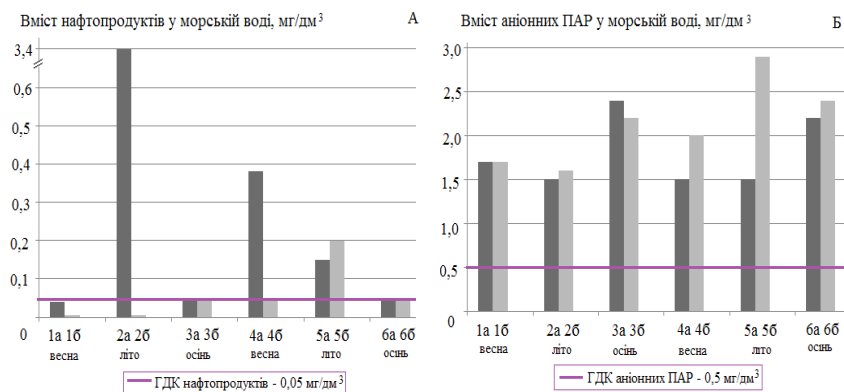


Рис. 1. 10. Сезонна динаміка вмісту (у мг/дм³) нафтопродуктів (А), аніонних ПАР (Б) в морській воді (а – морська вода, б – порова вода), що відібрана в районі Гідробіологічної станції (1, 2, 3), Дачі Ковалевського (4, 5, 6)

Проведений екстракційно-фотометричний аналіз проб морської води показав наявність аніонних ПАР (рис. 1.10, Б). Концентрація аніонних ПАР в морській та поровій воді в районі Гідробіологічної станції та Дачі Ковалевського протягом всього періоду досліджень становила в межах від 2,2 до 2,4 мг/дм³ [ГДК (аніонних ПАР) = 0,5 мг/дм³]. Виявлене свідчить про постійне надходження цих органічних речовин у морське середовище [26, 27].

Резюмуючи викладене вище, слід зазначити, що в осінній період найбільший вміст важких металів виявлено в поровій воді в районі Дачі Ковалевського (рН середовища 6,4 - 6,45): в поровій морській воді містились аніонні ПАР, нітрит-йони та йони хрому шестивалентного, міді та цинку (у концентрації вище за ГДК) [27, 54].

1.2.5. Рівень генотоксичної та мутагенної активності забруднення морської води Одеської затоки

Проведений у рамках комплексного моніторингу хімічний аналіз морської та порової води, відібраної у районах Одеської затоки з різним рівнем антропогенного навантаження, показав наявність у досліджених пробах морської води токсичних політантів органічної та неорганічної природи, що можуть викликати у морських мікроорганізмів небажані генотоксичні та мутагенні ефекти. Тому у тесті Еймса було оцінено рівень генотоксичної та мутагенної активності забруднення морської води Одеської затоки.

На генотоксичну активність відібрані зразки аналізували за основними методиками [10, 11, 102, 103]. Для визначення токсичності (властивість або якість, що приводить до загибелі живих організмів) і мутагенності (властивість або якість, що характеризує перебудови у генетичному апараті) об'єктів навколишнього природного середовища (води, донних відкладень, ґрунту) використовували методи біотестування [104, 105, 125, 127, 134]. У наших дослідженнях як тест-об'єкт використовували мутантні штами *Salmonella typhimurium* TA 100 та *Salmonella typhimurium* TA 98.

В тест-системі *Salmonella typhimurium* TA 100 більшість зразків морської води, відібраної влітку, викликала потужну токсичну дію. Найбільш токсичною виявилась вода, відібрана в районі Дачі Ковалевського. Відібрана в зоні заплеску проба морської води, викликала загибель більше 85,0% життєздатних клітин (табл. 1.12), що відповідає рівню потужної токсичної дії. Саме цей зразок морської води викликав мутагенну активність, яка у $4,03 \pm 0,075$ рази перевищувала контрольні показники (табл. 1.12), що відповідає рівню помірної мутагенної дії. Зразок морської води, відібраний біля берега в районі Дачі Ковалевського,

викликав загибель 77,0% життєздатних клітин бактерій. Мутагенна активність для цього зразка морської води відповідала рівню «слабка мутагенна дія» ($1,1 \pm 0,10$ від од.).

Проба морської води, яка була відібрана з заплеску в районі Гідробіологічної станції також володіла потужною токсичною дією. У цьому випадку загибель життєздатних клітин досягала 70,0% у порівнянні з контролем. Проба морської води, що була відібрана біля берега в районі Гідробіологічної станції, навпаки, викликала значну стимуляцію росту клітин сальмонели у тесті на життєздатність. Перевищення контрольних показників становило 317,3%.

Мутагенна активність в тест-системі *Salmonella typhimurium* TA 100 для морської води з Гідробіологічної станції влітку не була зафіксована (табл. 1.13). Результати біотестування цих проб води з використанням бактеріальної тест-системи *Salmonella typhimurium* TA 98 були подібними за деякими показниками. Так, зразок морської води, відібраний в районі Дачі Ковалевського з зони заплеску найбільш негативно впливав на бактеріальні клітини тест-системи *Salmonella typhimurium* TA 98. Саме для цієї проби встановлена загибель 65,0% життєздатних клітин сальмонели, що відповідає рівню «потужної токсичної дії», відповідно обраної нами шкали токсичності. Одночасно реєстрували значну мутагенну активність, яка склала $6,03 \pm 0,21$ відносних одиниць у порівнянні з контролем. Токсичність морської води біля берега в районі Дачі Ковалевського також викликала загибель життєздатних клітин тест-системи *Salmonella typhimurium* TA 98. Однак, у порівнянні з тест- системою *Salmonella typhimurium* TA 100 рівень токсичності був дещо менший і загибель життєздатних клітин не перевищувала 35,0%. Рівень мутагенної активності становив $2,14 \pm 0,13$ відносних одиниць у порівнянні з контролем (табл. 1.13). Зразок морської води, відібраний біля берега в районі Гідробіологічної станції, викликав потужну мутагенну активність ($5,73 \pm 0,09$ від. од.) з одночасною потужною токсичністю – загибель більше 50,0% життєздатних клітин. Цій зразок води був єдиним, що принципово відрізнявся за показниками біотестування від результатів, отриманих при використанні тест-системи *Salmonella typhimurium* TA 100.

Таблиця 1.12

**Вплив забруднення морської та порової води на життєздатність
бактерій *Salmonella typhimurium***

Станція	Salmonella typhimurium TA98			Salmonella typhimurium TA100	
	Кількість колоній на середовищі МПА, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$ ($\times 10^6$)	Токсичність, (кратність по відношенню до контролю, %)	Кількість колоній на середовищі МПА, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$ ($\times 10^6$)	Токсичність, (кратність по відношенню до контролю, %)	
Літо					
Контроль		382,7 $\pm$ 5,23	100,0 $\pm$ 5,23	26,67 $\pm$ 2,36	100 $\pm$ 2,36
с - Гідробіологічна станція	морська	189,3 $\pm$ 11,39	49,4 $\pm$ 2,18	111,3 $\pm$ 3,64	417,3 $\pm$ 1,54
	порова	289,3 $\pm$ 18,29	75,6 $\pm$ 1,61	8,0 $\pm$ 1,13	29,9 $\pm$ 0,48
d - Дача Ковалевського	морська	245,3 $\pm$ 15,9	64,0 $\pm$ 0,87	6,0 $\pm$ 1,13	22,5 $\pm$ 0,48
	порова	133,3 $\pm$ 11,39	34,8 $\pm$ 0,72	3,67 $\pm$ 1,31	13,7 $\pm$ 0,55
Осінь					
Контроль		382,7 $\pm$ 5,23	100,0 $\pm$ 5,23	26,67 $\pm$ 2,36	100 $\pm$ 2,36
с - Гідробіологічна станція	морська	244,0 $\pm$ 4,53	63,7 $\pm$ 0,40	3,67 $\pm$ 1,31	13,7 $\pm$ 0,55
	порова	138,7 $\pm$ 9,42	36,2 $\pm$ 2,08	77,67 $\pm$ 2,36	291,25 $\pm$ 1,00
d - Дача Ковалевського	морська	213,3 $\pm$ 11,39	55,7 $\pm$ 1,21	38,67 $\pm$ 1,31	145,0 $\pm$ 0,55
	порова	325,3 $\pm$ 6,91	85,0 $\pm$ 0,61	11,67 $\pm$ 0,35	43,75 $\pm$ 0,27

Таблиця 1.13

Рівень індукції мутацій за впливу забруднень морської та порової води

Станція	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98		<i>Salmonella typhimurium</i> TA100		
	Кількість колоній на середовищі САС, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$	Мутагенна активність (кратність по відношенню до контролю)	Кількість колоній на середовищі САС, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$	Мутагенна активність (кратність по відношенню до контролю)	
Літо					
Контроль		32,67±1,73	1,00±0,31	57,67±3,46	1,00±0,14
	морська	92,67±3,46	5,73±0,09	44,00±1,13	0,18±0,021
<i>c</i> - Гідробіологічна станція	порова	24,00±1,96	0,92±0,04	6,33±1,31	0,366±0,037
	морська	45,00±2,26	2,14±0,13	14,33±1,31	1,10±0,10
<i>d</i> - Дача Ковалевського	порова	68,67±3,46	6,03±0,21	32,00±1,13	4,04±0,075
Осінь					
Контроль		32,67±1,73	1,00±0,31	57,67±3,46	1,00±0,14
	морська	66,00±4,08	3,16±0,30	24,67±2,85	3,11±0,25
<i>c</i> - Гідробіологічна станція	порова	24,67±2,36	2,08±0,03	30,33±3,46	0,18±0,06
	морська	37,33±2,85	2,05±0,10	42,00±2,99	0,50±0,15
<i>d</i> - Дача Ковалевського	порова	26,33±2,36	0,94±0,14	37,00±1,13	1,46±0,07

Проба морської води з зони заплеску біля Гідробіологічної станції викликала помірну токсичну дію – загиньба життєздатних клітин не перевищувала 50,0%. Мутагенна активність для морської води не була зареєстрована (рис. 1.11).

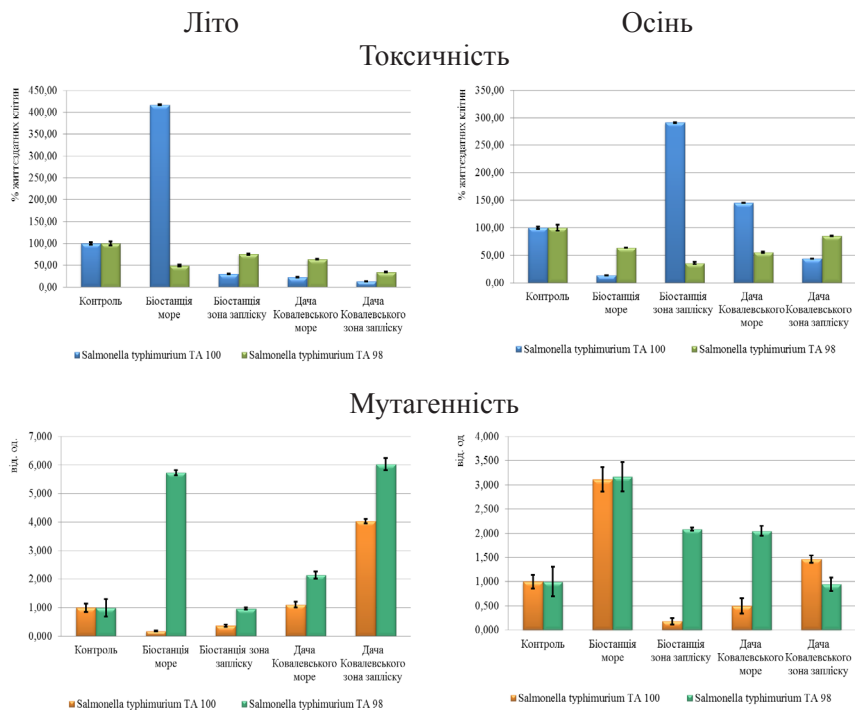


Рис. 1.11. Рівень токсичності та мутагенності забруднень морської води Одеської затоки з використанням бактеріальних тест-систем *Salmonella typhimurium* TA 100 та *Salmonella typhimurium* TA 98

Біотестування морської води відібраної в прибережній зоні Одеської затоки та води з зони заплеску показало, що досліджені проби викликають різноманітні біологічні відгуки в бактеріальних тест-системах *Salmonella typhimurium* TA 100 та *Salmonella typhimurium* TA 98, що свідчить про різноманітність забруднювачів, які знаходяться у морській воді. Влітку майже всі проби викликали загиньба життєздатних клітин тест-штаму *Salmonella*

typhimurium TA 100. Максимальні негативні генотоксичні показники були характерні для проб з Дачі Ковалевського. Найбільш потужними негативними показниками по результатам біотестування володіла вода з зони заплеску Дачі Ковалевського. При використанні тест-штаму *Salmonella typhimurium* TA 98 була зареєстрована значна токсична дія усіх проб води. Також, майже для всіх проб реєстрували мутагенну активність (виключенням була вода з зони заплеску в районі Гідробіологічної станції).

Найбільшу токсичність (загибель більш 50% життєздатних клітин), та одночасно мутагенну активність, яка досягала $6,03 \pm 0,21$ від. од. викликала морська вода, відібрана з зони заплеску Дачі Ковалевського.

Єдиним зразком морської води, котрий викликав одночасно і токсичну і мутагенну дію в обох тест-системах був зразок порової води, відібраний з Дачі Ковалевського. При використанні тест-штаму *Salmonella typhimurium* TA 100 для біотестування проб морської води та порової води, відібраних восени показано, що показники генотоксичності були більш різноманітними. Для деяких проб зареєстрована значна стимуляція росту бактеріальних клітин. Максимальні показники перевищували контрольні на 45,0 – 91,0%. Найбільш вираженою генотоксичною активністю володіла вода, відібрана з зони заплеску біля Дачі Ковалевського.

Стимуляція росту бактеріальних клітин і відсутність мутагенної активності влітку, змінилися на потужну токсичність (загибель 86,0% життєздатних клітин,) та помірну мутагенну активність ($3,11 \pm 0,25$ від. од.), що свідчить про інтенсивність процесів трансформації поліутантів морської води Одеської затоки, які призводять до утворення вторинних метаболітів, що можуть бути потенційно небезпечними для довкілля та здоров'я.

Показники генотоксичності, отриманні при використанні тест-штаму *Salmonella typhimurium* TA 98, для біотестування проб, відібраних восени, свідчили про негативні біологічні властивості морської води.

Максимальні показники токсичності при проведенні теста на життєздатність в тест-системі *Salmonella typhimurium* TA 98 реєстрували для морської води з зони заплеску біля Гідробіологічної станції. Кількість загиблих бактеріальних клітин досягала

64,0% у порівнянні з контролем. Для цієї ж точки реєстрували максимальний показник мутагенної активності, який перевищує контроль у $2,08 \pm 0,03$ рази, що відповідає за вибраною шкалою помірній мутагенній дії.

Максимальна мутагенна активність була зареєстрована для морської води, відібраної з Дачі Ковалевського – $3,16 \pm 0,30$ від. од. Аналізуючи усі отриманні дані можна припустити, що з літа по осінь у морській воді накопичуються біологічно небезпечні речовини різноманітного походження, про що свідчить зростання кількості проб з негативними показниками генотоксичності, виявлені у бактеріальних тест-системах *Salmonella typhimurium* TA 100 та *Salmonella typhimurium* TA 98.

Наведені результати, ще раз підкреслюють, що морська вода в досліджених районах Одеської затоки викликає різні біологічні відгуки в модельних організмах, що свідчить про різноманіття забруднювачів, які знаходяться у морській воді.

1.3. Мікробіологічні, вірусологічні та санітарно-екологічні дослідження морської води акваторії острова Зміїний

Острів Зміїний із загальною площею близько 20,5 га розташований у північно-західній частині акваторії Чорного моря. У різні історичні епохи він незмінно був об'єктом охоронно-стратегічного призначення. У Чорному морі, у тому числі і довкола Зміїного, залягає четверта частина усіх національних запасів газу і третя частина нафти. Острів Зміїний з його непорушеною природою передбачається використовувати з туристичною метою. Зважаючи на невеликі розміри острова, зростаюче антропогенне навантаження на нього та прибережні води може призвести до значного забруднення прибережних вод та знищити їх рекреаційну цінність [86].

1.3.1. Санітарно-мікробіологічні дослідження морської води акваторії о. Зміїний

Встановлено, що навесні всі зразки води відповідали нормам за індексом лактозопозитивних паличок та індексом *E. coli*. Умовно-патогенні ентеробактерії, в тому числі сальмонели, у

зразках води у травні виявлено не було (табл. 1.14, рис. 1.12). Загальне мікробне число автохтонної і алохтонної мікробіоти у зразках води, відібраної на станціях **h**, **f**, **b** на Дамському пляжі та причалі не перевищували нормативні показники, і свідчили, що за санітарним станом ці ділянки моря навесні характеризувалися як олігосапробні. Весною у воді на станції **j** Золотого пляжу загальне мікробне число алохтонної мікробіоти незначно переверщувало показник норми, тому її віднесено до мезосапробної зони. Цікаво відмітити, що у цей період часу загальна кількість автохтонної мікробіоти перевищувала загальне мікробне число алохтонної мікробіоти, що також свідчить про якісний стан води в цьому районі навесні.

Встановлено, що літом санітарно-гігієнічна ситуація різко змінилася. Індекс ЛКП у зразках води, відібраної на станції **h** на Дамському пляжі дорівнював 2300 ± 110 кл/л, з води було ізольовано умовно-патогенні бактерії *Ltminorella spp.*, а з води причалу – *Citrobacter freundii*. У решті зразків індекс ЛКП був біля 500 кл/л.

Восени спостерігали аналогічну літньому сезону картину: загальне мікробне число автохтонної і алохтонної мікробіоти у зразках води, відібраної біля причалу, перевищували нормативні показники.

У осінній період з морської води на станції **f** біля причалу було виявлено штам патогенного виду *Yersinia enterocolitica group*.

Ця інформація підтверджується рядом дослідників, які у різні роки спостерігали, що у холодний період року процеси мікробного самоочищення сповільнюються: розмноження бактерій та швидкість відмирання знижується, і високий вміст бактерій тримається довше, ніж улітку [1, 42, 75, 91-94]. Тому санітарний стан води взимку гірше, до того ж зниження температури сприяє збереженню в ній збудників кишкових інфекцій. У пробах морської води на станції **h** - Дамський пляж у листопаді були виявлені бактерії *Salmonella typhimurium* та *Saphylococcus hominis*.

Отже у проведених дослідженнях мікробіологічні показники якості морської води влітку не відповідали нормі за індексом ЛКП та кишкових паличок; отримані дані свідчать про досить високий ступінь забруднення морської акваторії острову Зміїний у літній

Таблиця 1.14

Санітарно-бактеріологічні показники морської води акваторії о. Зміїний

Сезон	Станція	ЗМЧ 37 °С (КУО/см³) x10²	ЗМЧ 22 °С (КУО/см³) x10²	Індекс ЛКП кл/л	Індекс <i>E. coli</i> кл/л	Індекс Ентеро- коків кл/л	Індекс стафі- лококів кл/л	Патогенні ентеро- бактерії, в 1 дм³	Умовно- патогенні бактерії
Весна	<i>j</i> - Золотий пляж	7,4±0,5	2,2±0,3	<500	<500	<500	<50	не вияв.	не виявлено
	<i>g</i> - Причал	ріст відсутній	20,0±4,0	<500	<500	<500	<50	не вияв.	не виявлено
	<i>h</i> - Дамський пляж	ріст відсутній	4,9±0,7	<500	<500	<500	<50	не вияв.	не виявлено
	<i>b</i> - Східна частина острова	20,0±3,0	3,1±0,2	<500	<500	<500	<50	не вияв.	не виявлено
Літо	<i>f</i> - Причал	4,0±0,2	1,5±0,2	600± 50	<500	<500	<50	не вияв.	<i>Citrobacter freundii</i>
	<i>h</i> - Дамський пляж	3,9±0,4	1,8±0,3	2300± 110	<500	<500	<50	не вияв.	<i>Leptinorella species</i>
	<i>j</i> - Золотий пляж	2,0±0,1	2,5±0,4	600± 37	<500	<500	<50	не вияв.	не виявлено
	<i>f</i> - Причал	1,9±0,3	110,0±16,0	<500	<500	<500	<50	не вияв.	<i>Yersinia enterocolitica group</i>
Осінь	<i>h</i> - Дамський пляж	1,8±0,4	5,3±0,4	2400± 125	<500	<500	<50	<i>S. typhi- murium</i>	<i>Saphylococcus hominis</i>
	<i>j</i> - Золотий пляж	2,2±0,2	2,0±0,2	<500	<500	<500	<50	не вияв.	не виявлено

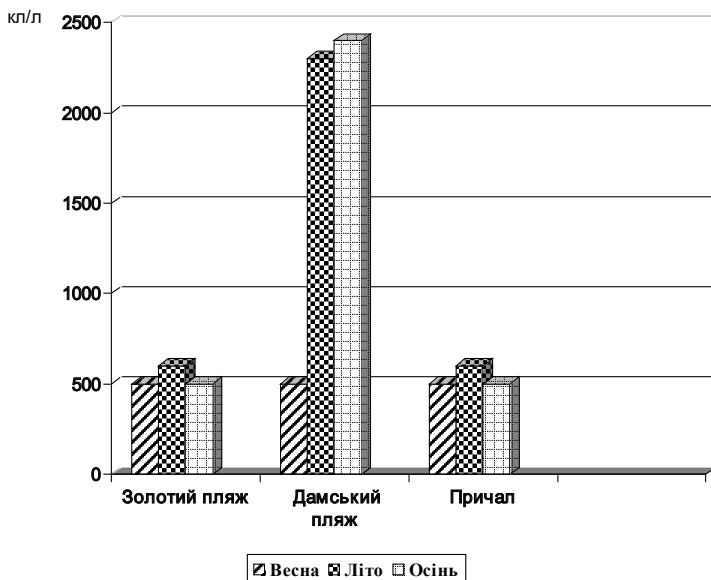


Рис.1.12. Динаміка індексу ЛКП у зразках води з прибережної зони о. Зміїний

сезон, що, можливо, пов'язано з існуванням джерела постійного забруднення акваторії [9].

1.3.2. Протеолітичні бактерії в морській воді о. Зміїний

Визначення чисельності бактерій, що володіють протеолітичною активністю, важливо з погляду оцінки здатності мікробного угруповання брати участь в аеробній деструкції білкових сполук. Встановлено, що досліджена акваторія характеризується високим вмістом органічної речовини, яка активно метаболізувалась представниками протеолітичної групи мікробіоти (табл. 1.15).

Навесні у морській воді акваторії острова Зміїний відмічали одиниці КУО в мл. Кількість протеолітичних бактерій в поверхневому шарі прибережної зони влітку становила від $(2,0 \pm 0,3) \times 10^4$ до $(4,5 \pm 0,4) \times 10^5$ КУО/мл. Чисельність цих бактерій у віддаленій зоні акваторії коливалась від $(4,0 \pm 0,5) \times 10^2$ до $(1,4 \pm 0,3) \times 10^6$ КУО/

**Найбільш вірогідне число протеолітичних бактерій
(КУО/мл), у морській воді акваторії о. Зміїний**

Станція	НВЧ протеолітичних бактерій (КУО/мл)		
	весна	літо	осінь
Віддалена станція			
<i>a</i>	не визначали	$(4,5 \pm 0,6) \times 10^4$	не визначали
<i>b</i>	не визначали	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^5$	не визначали
<i>c</i>	не визначали	$(7,5 \pm 0,6) \times 10^4$	не визначали
<i>d</i>	не визначали	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^6$	не визначали
<i>e</i>	не визначали	$(4,0 \pm 0,5) \times 10^2$	не визначали
<i>f</i>	4 ± 1	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^4$	45 ± 7
<i>m</i>	16 ± 3	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^2$
Прибережна станція			
<i>g</i>	11 ± 2	$(3,0 \pm 0,2) \times 10^4$	0,0
<i>h</i>	4 ± 1	$(4,5 \pm 0,4) \times 10^5$	0,0
<i>i</i>	11 ± 3	$(2,0 \pm 0,3) \times 10^4$	0,0
<i>j</i>	11 ± 1	$(4,5 \pm 0,7) \times 10^4$	0,0
<i>k</i>	3 ± 1	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^5$	0,0
<i>l</i>	11 ± 4	$(4,5 \pm 0,5) \times 10^4$	0,0

мл. Восени чисельність бактерій вивченої групи значно зменшилась.

Виявлення протеолітичних мікроорганізмів показало, що їхній розподіл у досліджуваній частині акваторії є зональним. До першої зони відноситься станція *e* на захід від острова, де виявлено найменше число представників досліджуваної групи бактерій. По даному показнику цей район можна прийняти як фоновий, де вміст органічних речовин є незначним в силу особливостей розташування станції щодо інших ділянок [78, 98].

До другої зони за результатами досліджень можна віднести

ділянку на прибережних станціях *l* та *j*, де значення чисельності бактерій-протеолітиків влітку перебувало практично на одному рівні $(4,5 \pm 0,5) \times 10^4$ КУО/мл.

До третьої зони належить більшість прибережних і віддалених станцій. Судячи зі значень чисельності протеолітичних бактерій, у цій частині акваторії відзначається значне надходження органічних речовин. На станції *a*, що розташована на південному заході острова, виявляється $(4,5 \pm 0,6) \times 10^4$ КУО/мл, і надалі ця зона охоплює південну, східну й північну частину острова аж до станції *d* з максимальним значенням чисельності бактерій $(1,4 \pm 0,3) \times 10^6$ КУО/мл.

1.3.3. Ліполітичні мікроорганізми в морській воді о. Зміїний

Визначення чисельності представників фізіологічної групи ліполітичних бактерій (табл. 1.16) дозволяє оцінити здатність мікробного угруповання брати участь у процесах біологічного розкладання органічних сполук, що містять ліпіди, в прибережних водах о. Зміїний [1, 9, 62].

Влітку виявлено високу чисельність ліполітичних бактерій на станціях *a, b, e, f, m, g, j, l* в акваторії острова. В цілому, картина поширення бактерій-ліполітиків влітку на віддалених та прибережних станціях не однакова. У поверхневому шарі зони прибою влітку чисельність бактерій досліджуваної групи склала від 40 ± 3 до $(2,5 \pm 0,2) \times 10^3$ КУО/мл.

У зоні, що віддалена від берега до 100 метрів, кількість ліполітичних бактерій помітно збільшувалась та варіювала від 16 ± 3 до $(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$ КУО/мл. Чисельність ліполітичних бактерій влітку коливалась від 16 ± 3 КУО/мл на станції *d* до $(4,0 \pm 0,5) \times 10^2$ КУО/мл на станції *e*, що, ймовірно, пояснюється низьким вмістом доступних ліпідів у воді досліджуваної акваторії. Виключення склали станції *l* і *f*, які спільно зі станцією *b* становлять зону високого вмісту ліполітичних бактерій у північній частині острова. Найбільші значення представників досліджуваної фізіологічної групи виявлені на станціях *f* і *m* - $(1,1 \pm 0,2) \times 10^4$ КУО/мл.

Спостереження, проведені восени показали, що кількість ліполітичних бактерій помітно зменшилась і коливалась від 4 ± 1 КУО/мл до $(2,5 \pm 0,3) \times 10^2$ КУО/мл в зоні прибою, а на відда-

Таблиця 1.16

**Найбільш вірогідне число ліполітичних бактерій
(КУО/мл), у морській воді акваторії о. Зміїний**

Станція	НВЧ ліполітичних бактерій (КУО/мл)		
	весна	літо	осінь
Віддалена станція			
<i>a</i>	не визначали	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^2$	не визначали
<i>b</i>	не визначали	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^3$	не визначали
<i>c</i>	не визначали	40 ± 6	не визначали
<i>d</i>	не визначали	16 ± 3	не визначали
<i>e</i>	не визначали	$(4,0 \pm 0,5) \times 10^2$	не визначали
<i>f</i>	$(4,5 \pm 0,4) \times 10^3$	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^4$	9 ± 2
<i>m</i>	30 ± 4	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$	11 ± 1
Прибережна станція			
<i>g</i>	3 ± 1	$(2,0 \pm 0,3) \times 10^2$	0
<i>h</i>	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^3$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^2$	$(2,5 \pm 0,3) \times 10^2$
<i>i</i>	$(3,0 \pm 0,4) \times 10^2$	40 ± 3	4 ± 1
<i>j</i>	16 ± 4	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^2$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^2$
<i>k</i>	16 ± 2	45 ± 4	4 ± 2
<i>l</i>	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^2$	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^3$	4 ± 1

леній від берегу станції *f* чисельність бактерій не перевищувала значення одиниць КУО/мл [62].

1.3.4. Мікроорганізми, що окиснюють нафтопродукти і фенол

Гранично допустима концентрація нафти в морській воді становить 0,050 мкг/мл. У проведених нами дослідженнях використовувалася концентрація нафти в поживному середовищі 0,1 мкг/мл. Розподіл нафтоокиснюючих мікроорганізмів у досліджуваній частині акваторії є мозаїчним (табл. 1.17).

Найбільш вірогідне число бактерій, що окиснюють нафту (КУО/мл), у морській воді акваторії о. Зміїний

Станція	НВЧ бактерій, що окиснюють нафту (КУО/мл)		
	весна	літо	осінь
Віддалена станція			
<i>a</i>	не визначали	40±7	не визначали
<i>b</i>	не визначали	(3,0±0,2)×10 ⁴	не визначали
<i>c</i>	не визначали	20±3	не визначали
<i>d</i>	не визначали	(1,5±0,3)×10 ²	не визначали
<i>e</i>	не визначали	(1,4±0,1)×10 ³	не визначали
<i>f</i>	35±4	30±4	(3,0±0,4)×10 ²
<i>m</i>	15±2	30±3	(1,5±0,2)×10 ²
Прибережна станція			
<i>g</i>	15±1	11±2	25±3
<i>h</i>	20±3	16±2	(1,4±0,3)×10 ³
<i>i</i>	11±2	40±3	75±7
<i>j</i>	6±1	35±5	75±12
<i>k</i>	20±4	40±4	7±2
<i>l</i>	6±2	40±6	45±5

Кількість досліджуваних бактерій у поверхневому шарі прибіної зони навесні становила одиниці КУО/мл. У віддаленій зоні навесні були досліджені лише проби води відібрані на станціях *f* і *m*, де кількість нафтоокиснюючих бактерій була незначною.

Високий вміст до (3,0±0,4)×10² КУО/мл) нафтоокиснюючих бактерій протягом всього періоду спостережень у районі причалу (станція *f*), можливо пов'язати з постійним потраплянням нафтопродуктів з судна, що доставляє грузи та людей на острів.

Максимальне число нафтоокиснюючих бактерій було виявлене влітку на станції *b* ((3,0±0,2)×10⁴ КУО/мл) у північно-східній

частині акваторії, що прилягає до острова. Кількість гетеротрофів, що утилізують нафту на станції *e* влітку досягало $(1,4 \pm 0,1) \times 10^3$ КУО/мл, що може бути пов'язано з наявністю ємностей з нафтою, які перебувають на острові [21, 32, 55, 63, 64]. Восени кількість бактерій, що окиснюють нафту коливалась від одиниць до $(1,4 \pm 0,3) \times 10^3$ КУО/мл. Максимальне значення було відмічено на станції *h*.

Таким чином, найчастіше максимальна кількість бактерій досліджуваної фізіологічної групи виявлялась в морській воді, що відібрана в районі причалу [28, 30, 31, 49, 50, 82, 108].

У результаті досліджень у морській воді виявлено нерівномірний розподіл бактерій, здатних окиснювати вулеводні дизельного палива (табл. 1.18).

Таблиця 1.18

Найбільш вірогідне число бактерій, що окиснюють дизельне паливо (КУО/мл), у морській воді акваторії о. Змійний

Станція	НВЧ бактерій (КУО/мл)		
	весна	літо	осінь
Віддалена станція			
<i>a</i>	не визначали	$(9,5 \pm 1,1) \times 10^3$	не визначали
<i>b</i>	не визначали	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$	не визначали
<i>d</i>	не визначали	$(9,5 \pm 0,6) \times 10^4$	не визначали
<i>e</i>	не визначали	$(4,5 \pm 0,5) \times 10^2$	не визначали
<i>f</i>	20 ± 3	$(4,5 \pm 0,3) \times 10^4$	4 ± 1
<i>m</i>	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^2$	$(2,5 \pm 0,3) \times 10^2$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^2$
Прибережна станція			
<i>g</i>	15 ± 2	30 ± 4	4 ± 1
<i>h</i>	4 ± 1	40 ± 6	15 ± 3
<i>i</i>	11 ± 3	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^4$	30 ± 5
<i>j</i>	9 ± 2	16 ± 2	9 ± 2
<i>k</i>	4 ± 1	$(4,5 \pm 0,3) \times 10^2$	4 ± 1
<i>l</i>	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^2$	45 ± 7	20 ± 4

Чисельність бактерій, що окиснюють вулеводні дизельного палива, в поверхневому шарі зони прибою навесні коливалася від одиниць до сотень КУО/мл, що вказує на незначний вміст деструкторів в прибережних водах навколо острова Зміїний. Влітку кількість бактерій, що утилізують вулеводні дизельного палива, помітно збільшувалась в зоні, віддаленій від берега до 100 метрів, і варіювала від $(2,5 \pm 0,3) \times 10^2$ КУО/мл до $(9,5 \pm 0,6) \times 10^4$ КУО/мл.

Виявлені три зони в акваторії острова Зміїний, в яких значення чисельності бактерій, що окиснюють вулеводні дизельного палива, перевищує такі в зоні прибою на кілька порядків. До першої зони може бути віднесена акваторія станції *f* - причал $((4,5 \pm 0,3) \times 10^4$ КУО/мл) і станція *a* $((9,5 \pm 1,1) \times 10^3$ КУО/мл) у північній частині острова.

Восени кількість бактерій коливалася від одиниць до сотень КУО/мл. В прибіжній зоні острова чисельність бактерій на декількох станціях була на порядок більше ніж на станції *f*. Найбільші значення цих бактерій відмічались на станціях *m*, *l*. Таким чином, ймовірно потрапляння дизельного субстрату в акваторію острова сприяє збільшенню фізіологічно активної частини гетеротрофного угруповання серед морських бактерій [30].

Відповідно до санітарних правил і норм [80] гранично допустима концентрація (ГДК) для фенолів становить 1 мкг/л. У проведених дослідженнях використовували вміст фенолу в середовищі (0,3 мкг/мл) у три рази нижче ГДК. У воді двох зон навколо острова, фенолоокиснюючі бактерії, в основному, були відсутні (табл. 1.19).

Бактерії, які володіють ферментативним апаратом, що дозволяє розщиплювати бензолне кільце, виявляли на чотирьох віддалених станціях. Встановлено, що бактерії, здатні окиснювати фенол присутні в морській воді острова практично на всіх станціях в незначній кількості. Максимальні значення чисельності цих бактерій виявлено на станції *m* $(9 \pm 2$ КУО/мл), що значно віддалена від острова ($45^{\circ}17'30''N$ $30^{\circ}06'50''E$) в напрямку дельти Дунаю.

Найбільша чисельність бактерій $(1,5 \pm 0,2) \times 10^2$ КУО/мл, здатних окиснювати фенол, виявлена влітку на станції *c* та осінню на станції *m* $(1,2 \pm 0,3) \times 10^2$ КУО/мл. У водоймах феноли можуть з'являтися в результаті розпаду фітопланктону, що сприяє збіль-

Таблиця 1.19

Найбільш вірогідне число бактерій, що окиснюють фенол (КУО/мл), у морській воді акваторії о. Зміїний

Станція	НВЧ бактерій, що окиснюють фенол (КУО/мл)		
	весна	літо	осінь
Віддалена станція			
<i>a</i>	не визначали	6±2	не визначали
<i>b</i>	не визначали	20±3	не визначали
<i>c</i>	не визначали	(1,5±0,2)×10 ²	не визначали
<i>d</i>	не визначали	4±1	не визначали
<i>e</i>	не визначали	0	не визначали
<i>f</i>	0	0	30±4
<i>m</i>	9±2	45±6	(1,2±0,3)×10 ²
Прибережна станція			
<i>g</i>	4±1	40±3	4±1
<i>h</i>	4±1	35±4	3±1
<i>i</i>	0	4±1	0
<i>j</i>	0	20±4	4±1
<i>k</i>	4±1	45±8	4±1
<i>l</i>	0	3±1	20±2

шенню чисельності бактерій, які окиснюють цей субстрат [82].

З іншого боку слід відзначити, що в акваторії о. Зміїний, за дослідженнями, представленими у главі 1.3.7., на станціях *f*, *a*, *b*, *h* реєструвався високий вміст рідких нафтових вуглеводнів. Забруднення цієї ділянки вуглеводнями можливо безпосередньо із суден, які привозять на острів паливо, паливно-мастильні матеріали, швартуються до причалу та перекачують пальне в цистерни на острові. Цим можна пояснити високі значення бактерій, що окиснюють дизельне паливо, на станціях *a*, *b*, *h*, що перебувають західніше й східніше від станції *f* [28, 82].

1.3.5. Морські дріжджі

Дріжджі є еукаріотними мікроорганізмами, які становлять невід'ємну частину водних екосистем різних широт, їхня кількість і активність багато в чому визначає інтенсивність і характер процесів природного самоочищення. В ході проведених досліджень дріжджі виявлено в 95% відібраних проб. Використання прямого висіву дозволило підрахувати більше колоній дріжджів ніж після пророщування їх на мембранних фільтрах (табл. 1.20, 1.21, рис. 1.13).

Навесні чисельність представників досліджуваної групи становила від $(2,9 \pm 0,3) \times 10^4$ до $(7,5 \pm 0,5) \times 10^4$ КУО/мл, а середня чисельність дріжджів - на рівні $4,6 \times 10^4$ КУО/мл. Чисельність рожевих дріжджів в середньому складала $1,8 \times 10^4$ КУО/мл, чорних – $1,1 \times 10^4$ КУО/мл. Влітку кількість дріжджів коливалась від $(1,2 \pm 0,1) \times 10^5$ до $(4,8 \pm 0,4) \times 10^5$ КУО/мл. Середня чисельність дріжджів перебувала на рівні $2,6 \times 10^5$ КУО/мл та в середньому складала для рожевих - $1,3 \times 10^4$ КУО/мл, а чорних – $2,1 \times 10^4$ КУО/мл.

Таблиця 1.20

Загальна чисельність дріжджів (КУО/мл), у морській воді акваторії о. Зміїний

Станція	Чисельність дріжджів (КУО/мл)		
	весна	літо	осінь
Віддалена станція			
<i>f</i>	$(4,0 \pm 0,2) \times 10^4$	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^5$	$(2,0 \pm 0,3) \times 10^3$
<i>m</i>	$(4,1 \pm 0,3) \times 10^4$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^5$	0
Прибережна станція			
<i>g</i>	$(7,5 \pm 0,5) \times 10^4$	$(3,5 \pm 0,2) \times 10^5$	$(4,2 \pm 0,4) \times 10^3$
<i>h</i>	$(5,5 \pm 0,4) \times 10^4$	$(3,2 \pm 0,3) \times 10^5$	$(5,4 \pm 0,5) \times 10^3$
<i>i</i>	$(6,0 \pm 0,7) \times 10^4$	$(4,8 \pm 0,4) \times 10^5$	$(5,2 \pm 0,4) \times 10^3$
<i>j</i>	$(3,5 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^5$	$(2,7 \pm 0,3) \times 10^3$
<i>k</i>	$(2,9 \pm 0,3) \times 10^4$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^5$	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^3$
<i>l</i>	$(3,4 \pm 0,4) \times 10^4$	$(2,2 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1,7 \pm 0,3) \times 10^3$

Таблиця 1.21

**Чисельність рожевих (Р) та чорних (Ч) дріжджів (КУО/мл),
у морській воді акваторії о. Зміїний**

Станція	Чисельність дріжджів (КУО/мл)					
	весна		літо		осінь	
	Р	Ч	Р	Ч	Р	Ч
Віддалена станція						
<i>f</i>	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^4$	0	$(2,5 \pm 0,1) \times 10^5$	0	$(1,7 \pm 0,3) \times 10^3$	0
<i>m</i>	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$	0	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^4$	0	0	0
Прибережна станція						
<i>g</i>	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^5$	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^5$	$(1,3 \pm 0,3) \times 10^4$	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^3$	$(5,9 \pm 0,5) \times 10^2$
<i>h</i>	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,2 \pm 0,2) \times 10^5$	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^5$	$(3,2 \pm 0,3) \times 10^3$	$(2,6 \pm 0,3) \times 10^2$
<i>i</i>	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^4$	$(2,5 \pm 0,3) \times 10^4$	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^5$	$(2,8 \pm 0,4) \times 10^3$	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^3$
<i>j</i>	$(5,0 \pm 0,4) \times 10^3$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$	0	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^3$	$(3,8 \pm 0,3) \times 10^4$
<i>k</i>	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^4$	0	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^4$	0	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^3$	$(1,2 \pm 0,3) \times 10^2$
<i>l</i>	0	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^4$	0	0	$(8,4 \pm 0,7) \times 10^2$	$(9,0 \pm 0,4) \times 10^3$



а



б



в

**Рис. 1.13. Ріст дріжджів, забарвлених в жовтий (а), чорний (б)
та рожевий (в) кольори на середовищі Сабуро**

Чисельність дріжджів в акваторії острова коливалася від сотень до сотень тисяч КУО в 1 мл морської води, що ймовірно пов'язано з гідрологічним та гідрохімічним режимом, характеристикою альгофлори акваторії острова та часом відбору проб.

Восени середня чисельність представників досліджуваної групи становила $3,2 \times 10^4$ КУО/мл. Чисельність рожевих дріжджів в середньому складала $7,5 \times 10^3$ КУО/мл, чорних – $2,4 \times 10^4$ КУО/мл. Загалом середня кількість дріжджів виявлена влітку на рівні $3,4 \times 10^5$ КУО/мл. Восени спостерігали різкий спад дріжджової мікробіоти до $(1,7 \pm 0,3) \times 10^3$ КУО/мл.

Ділянки акваторії, що були поблизу пологого ґрунтового берега острова, показали найбільшу дріжджову популяційну щільність впродовж року на станції **g** – до $(3,5 \pm 0,2) \times 10^5$ КУО/мл влітку. Відомо, що дріжджі не є облигатними представниками водного біотопу [2, 3, 50, 108]. Основним природним резервуаром цих мікроорганізмів є ґрунти й рослинність суші. На станціях відбору проб, що межують з відкритими ґрунтами, можлива циркуляція дріжджових штамів.

На станції **i** відмічено представництво чорних дріжджів, які часто пов'язані з морськими водоростями: представниками кладофори, ульви та ентероморфи. Відмерлі рештки рослин є значним джерелом надходження органічних речовин в морську воду. Дріжджі також досить активно адсорбуються саме на тканинах рослин. Поверхневі клітини водоростей активно синтезують полісахариди, що є також певним сприятливим субстратом для існування представників цієї групи.

За період дослідження в акваторії о. Зміїний виявлено 7 видів дріжджів з 5 родів (*Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus neoformans*, *Aerobasidium pullulans*, *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium paludigenum*). Всі вони являються типовими космополітами і досить широко поширені в інших біотопах [2, 3, 50, 108].

Представники виду *Aerobasidium pullulans* переважали в точці **g**. Ділянки острівної акваторії, обмежені скелястим берегом, показали найменші показники популяційної щільності дріжджів.

У поверхневих водах спостерігали 3 опортуністичні види дріжджів (*Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus neoformans*

та *Candida albicans*), що свідчить про їх активну циркуляцію в природі (частота трапляння склала 43%). Популяційний пік *Cryptococcus albidus* становив 7,5%, *Cryptococcus neoformans* – 24,7% та *Candida albicans* – 40,5%.

За період дослідження переважаючими видами були *Aerobasidium pullulans*, та *Rhodotorula rubra* – представники чорних та рожевих дріжджів. Зустрічальність *Aerobasidium pullulans* (чорні дріжджі) становила до 54,1%. *Rhodotorula rubra* (рожеві дріжджі) – 34,4% для прибережних станцій. Домінування видів чорної та рожевої дріжджової мікробіоти є характерним для водних екосистем [2, 3, 108].

1.3.6. Вірусологічні дослідження акваторії о. Зміїний

На наявність фагів ешерихій була досліджена 31 проба морської води, відібрана у акваторії острова Зміїний, однак колі-фаги в пробах морської води не були виявлені.

Методом ПЛР були проаналізовані проби морської води з метою виявлення наявності РНК ентеровірусів, астровірусів, каліцівірусів, норовірусів та ДНК аденовірусів. Проведені дослідження не виявили присутність ДНК та РНК маркерів вищевказаних вірусів (табл. 1.22). Однак виявлено контамінацію морської води патогенними для людини вірусами гепатиту А і ротавірусу. Цікаво, що віруси виявляли навколо острова Зміїний як в прибережній зоні, так і на відстані 100 м від берега, незважаючи на сильний нагонний вітер та морське хвилювання.

Отримані дані можуть свідчити про те, що серед мешканців острова, присутніх влітку на острові Зміїний, є носії інфекції, які створюють напружену епідеміологічну ситуацію.

1.3.7. Фізико-хімічні показники проб морської води акваторії о. Зміїний

У таблицях 1.23 і 1.24 наведено вміст неорганічних і органічних полютантів в воді акваторії о. Зміїний.

Навесні у пробах морської води, відібраних у зонах прибережних станцій (*g, h, i, j, k, l*) острова Зміїний, спостерігали перевищення норми ГДК у 6,4 – 8,4 рази лише по Cu (II). Її концентрація змінювалась в межах від 32 мкг/дм³ до 42 мкг/дм³.

Таблиця 1.22

Санітарно-вірусологічні показники морської води о. Зміїний

Місце відбору проб	ДНК адено-вірусів	РНК астро-вірусів	РНК ВГА	РНК ентеро-вірусів	РНК каліці-вірусів	РНК норо-вірусів	РНК рота-вірусів
Віддалена станція							
<i>f</i>	-	-	+	-	-	-	+
<i>m</i>	-	-	-	-	-	-	-
Прибережна станція							
<i>g</i>	-	-	+	-	-	-	+
<i>h</i> - Дамський пляж	-	-	+	-	-	-	+
<i>i</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>j</i> - Золотий пляж	-	-	+	-	-	-	+
<i>k</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>l</i>	-	-	-	-	-	-	-

Примітка: *- відсутні маркери вірусів; *+ присутні ДНК або РНК вірусів.

Нижче норми ГДК [158] були концентрації Cr (VI) - від $0,16 \pm 0,05$ мкг/дм³ до $0,22 \pm 0,04$ мкг/дм³, Pb (II) - від $0,012 \pm 0,006$ мкг/дм³ до $0,023 \pm 0,005$ мкг/дм³ та Cd (II) - від $0,042 \pm 0,007$ до $0,055 \pm 0,007$ мкг/дм³ (табл. 1.23). Ртуть, нікель, кобальт ледь фіксували, нижче межі виявлення $\leq 0,0050$ мкг/дм³ і $\leq 0,010$ мкг/дм³, відповідно.

Дослідження показали, що присутні в досліджуваних пробах морської води йони Na⁺, K⁺ та Cl⁻, не чинять статистично значимий вплив на результати визначення йонів ВМ.

На віддаленій від острова станції *m* убік р. Дунай відмічено найменше значення вмісту Cu (II) - 31 ± 4 мкг/дм³ (6,2 ГДК), Cr (VI) - $0,13 \pm 0,05$ мкг/дм³, Pb (II) - $0,012 \pm 0,007$ мкг/дм³, Cd (II) - $0,041 \pm 0,005$ мкг/дм³.

В акваторії острова вміст Cu (II) у воді перевищує ГДК майже в 8,4 разів, що вказує на неблагополучну ситуацію в аквато-

Таблиця 1.23
Вміст неорганічних і органічних поллютантів на прибережних станціях аквагорії о. Зміїний

Полютант	Прибережні станції						
	<i>g</i>	<i>h</i>	<i>i</i>	<i>j</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	
	весна						
1	2	3	4	5	6	7	
Кадмій Cd (II), мкг/дм³	0,048±0,005	0,053±0,005	0,055±0,007	0,047±0,006	0,044±0,005	0,042±0,007	
Свинець Pb (II), мкг/дм³	0,023±0,005	0,019±0,007	0,020±0,005	0,012±0,006	0,014±0,006	0,018±0,006	
Мідь Cu (II), мкг/дм³	42±4	39±4	39±3	36±3	32±5	40±4	
Хром Cr (VI), мкг/дм³	0,22±0,04	0,17±0,06	0,20±0,05	0,19±0,04	0,16±0,05	0,16±0,05	
Загальна кількість рідких нафтових вуглеводнів, мг/дм³	7,80±0,65	12,60±0,85	4,80±0,40	5,60±0,50	5,40±0,50	7,20±0,55	
Мастила, мг/дм³	2,80±0,25	9,60±0,80	2,40±0,15	4,80±0,40	3,00±0,20	4,80±0,40	
Смолисті сполуки, мг/дм³	5,00±0,40	3,00±0,20	2,40±0,15	1,80±0,10	2,40±0,20	2,40±0,20	
	літо						
Кадмій Cd (II), мкг/дм³	0,020±0,006	0,022±0,005	0,025±0,005	0,024±0,006	0,026±0,006	0,022±0,007	
Свинець Pb (II), мкг/дм³	0,010±0,006	0,012±0,007	0,010±0,005	0,010±0,005	0,011±0,005	0,012±0,006	

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7
Мідь Cu (II), мкг/дм ³	19 ± 2	20 ± 2	22 ± 2	21 ± 2	23 ± 3	22 ± 2
Хром Cr (VI), мкг/дм ³	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,04	0,10 ± 0,05	0,10 ± 0,04	0,10 ± 0,05	0,12 ± 0,04
Загальна кількість рідких нафтових вуглеводнів, мг/дм ³	3,60 ± 0,30	2,25 ± 0,20	2,55 ± 0,25	3,70 ±	2,40 ± 0,15	3,15 ± 0,25
Мастила, мг/дм ³	2,40 ± 0,15	1,50 ± 0,10	1,35 ± 0,10	2,40 ± 0,15	1,20 ± 0,07	2,40 ± 0,20
Смолисті сполуки, мг/дм ³	1,20 ± 0,08	0,75 ± 0,02	1,20 ± 0,08	1,30 ± 0,08	1,20 ± 0,07	0,75 ± 0,02
осінь						
Кадмій Cd (II), мкг/дм ³	0,022 ± 0,007	0,028 ± 0,006	0,030 ± 0,006	0,030 ± 0,006	0,031 ± 0,005	0,029 ± 0,006
Свинець Pb (II), мкг/дм ³	0,013 ± 0,007	0,010 ± 0,007	0,012 ± 0,006	0,012 ± 0,006	0,015 ± 0,005	0,015 ± 0,007
Мідь Cu (II), мкг/дм ³	22 ± 3	22 ± 3	28 ± 3	25 ± 4	23 ± 4	27 ± 5
Хром Cr (VI), мкг/дм ³	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,11 ± 0,05	0,10 ± 0,05	0,10 ± 0,05	0,15 ± 0,05
Загальна кількість рідких нафтових вуглеводнів, мг/дм ³	43,20 ± 3,5	2,62 ± 0,20	4,50 ± 0,40	6,00 ± 0,50	12,00 ± 0,85	19,80 ± 4
Мастила, мг/дм ³	38,40 ± 4,2	1,50 ± 0,10	3,00 ± 0,20	4,80 ± 0,30	9,60 ±	19,20 ± 4
Смолисті сполуки, мг/дм ³	4,80 ± 0,30	1,12 ± 0,08	1,50 ± 0,10	1,20 ± 0,05	2,40 ± 0,15	0,60 ± 0,01

Таблиця 1.24

**Вміст неорганічних і органічних поллютантів на віддалених
станціях акваторії о. Зміїний**

Поллютант	Віддалені станції	
	<i>f</i>	<i>m</i>
весна		
Кадмій Cd (II), мкг/дм ³	0,051 ± 0,006	0,041 ± 0,005
Свинець Pb (II), мкг/дм ³	0,016 ± 0,006	0,012 ± 0,007
Мідь Cu (II), мкг/дм ³	42 ± 4	31 ± 4
Хром Cr (VI), мкг/дм ³	0,18 ± 0,04	0,13 ± 0,05
Загальна кількість рідких нафтових вуглеводнів, мг/дм ³	7,10 ± 0,65	44,4 ± 4,20
Мастила, мг/дм ³	4,80 ± 0,40	38,40 ± 3,1
Смолисті сполуки, мг/дм ³	2,30 ± 0,15	6,00 ± 0,50
літо		
Кадмій Cd (II), мкг/дм ³	0,021 ± 0,006	0,027 ± 0,005
Свинець Pb (II), мкг/дм ³	0,012 ± 0,007	0,012 ± 0,006
Мідь Cu (II), мкг/дм ³	21 ± 2	24 ± 3
Хром Cr (VI), мкг/дм ³	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,05
Загальна кількість рідких нафтових вуглеводнів, мг/дм ³	2,70 ± 0,20	2,10 ± 0,20
Мастила, мг/дм ³	1,50 ± 0,10	1,20 ± 0,07
Смолисті сполуки, мг/дм ³	1,20 ± 0,08	0,90 ± 0,02
осінь		
Кадмій Cd (II), мкг/дм ³	0,025 ± 0,006	0,032 ± 0,005
Свинець Pb (II), мкг/дм ³	0,010 ± 0,007	0,010 ± 0,006
Мідь Cu (II), мкг/дм ³	24 ± 3	26 ± 4
Хром Cr (VI), мкг/дм ³	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,05
Загальна кількість рідких нафтових вуглеводнів, мг/дм ³	2,10 ± 0,20	31,20 ± 3,0
Мастила, мг/дм ³	1,20 ± 0,08	28,80 ± 3,0
Смолисті сполуки, мг/дм ³	0,90 ± 0,02	2,40 ± 0,15

*Примітка: $M \pm \Delta_{0,05}$ (n=3); ГДК_{Cd}=10,0 мкг/дм³;
ГДК_{Pb}=10,0 мкг/дм³; ГДК_{Cu}=5,0 мкг/дм³; ГДК_{Cr(VI)}=1,0 мкг/дм³;
ГДК (нафтопродуктів) = 0,05 мг/дм³

рії по цьому показнику. Найбільші концентрації Cu (II), Cr (VI), Pb (II) виявлено в пробах морської води, відібраних на станціях *f, g h, й i*. Середній визначений вміст йонів ВМ у воді навколо острова Зміїний становив для Cu (II) - $38,6 \text{ мкг/дм}^3$, Cr (VI) - $0,18 \text{ мкг/дм}^3$, Pb (II) - $0,017 \text{ мкг/дм}^3$, Cd (II) - мкг/дм^3 .

Влітку концентрація ВМ у пробах морської води змінювалась в наступних межах: Cu (II) - від 19 ± 2 до $23 \pm 3 \text{ мкг/дм}^3$, Cr (VI) - від $0,10 \pm 0,03 \text{ мкг/дм}^3$ до $0,12 \pm 0,04 \text{ мкг/дм}^3$, Pb (II) - від $0,010 \pm 0,006 \text{ мкг/дм}^3$ до $0,012 \pm 0,006 \text{ мкг/дм}^3$, Cd (II) - від $0,020 \pm 0,006 \text{ мкг/дм}^3$ до $0,026 \pm 0,006 \text{ мкг/дм}^3$. Нижче межі виявлення були концентрації йонів ртуті, нікелю та кобальту.

Необхідно зазначити, що і восени спостерігали завищені концентрації Cu (II) в пробах води, відібраних у прибережних і віддалених станціях, що вказує на хронічне забруднення цим токсикантом [1, 9].

Таким чином, найбільший вміст йонів ВМ відмічено в акваторії острова Зміїний навесні і перевищував рівень хімічного забруднення морської води на віддаленій убік р. Дунай станції *m*.

Відповідно до критеріїв, що пред'являються до водних об'єктів, які використовуються для рибогосподарських цілей [80], вміст нафти не повинен перевищувати значень $0,05 \text{ мг/дм}^3$.

Навесні сумарний вміст рідких фракцій нафтових вуглеводнів в пробах у віддаленій зоні акваторії острова коливався від $7,10 \pm 0,65 \text{ мг/дм}^3$ на станції *f* до $44,4 \pm 4,20 \text{ мг/дм}^3$ на станції *m*, у прибережній частині - від $4,80 \pm 0,40 \text{ мг/дм}^3$ на станції *i*.

Найбільші концентрації мастил виявлено в пробах морської води на станції *h* в прибережній зоні. Максимальний вміст смолистих сполук відмічався на станції *g* в прибережній зоні. Середня визначена концентрація вмісту фракцій вуглеводнів у воді навколо острова становила для мастил - $4,6 \text{ мг/дм}^3$, для смолистих сполук - $2,8 \text{ мг/дм}^3$.

Найбільші концентрації мастил відмічались в пробах морської води на станціях *g, j, l* в прибережній зоні. Максимальний вміст смолистих сполук виявлявся на станції *j* в зоні прибою. Середня визначена концентрація вмісту фракцій вуглеводнів у воді навколо острова становила для мастил - $1,8 \text{ мг/л}$, смолистих сполук - $1,1 \text{ мг/дм}^3$. Восени сумарний вміст рідких вуглеводнів в

пробах води острова Зміїний, відібраних у прибережній частині острова, коливався від 2,62 мг/дм³ до 43,2 мг/дм³ на станції **f**, у віддаленій зоні акваторії острова встановлено значення 2,1 мг/дм³. У воді на станції **m** нафтові вуглеводні виявлено в концентрації 31,2 мг/дм³. Доля мастил у складі рідких (нафтових) вуглеводнів перевищувала вміст смол, особливо в пробах з аномальними концентраціями рідких вуглеводнів конденсатного характеру [7, 26, 40].

1.3.8. Рівень генотоксичної та мутагенної активності забруднення морської води акваторії о. Зміїний

У відібраних влітку й восени пробах води досліджуваних станцій була паралельно вивчена токсична та мутагенна дія забруднюючих речовин. Критерієм токсичної дії при оцінці в бактерійних тест-системах *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 слугувало статистично достовірне зменшення кількості життєздатних клітин [104, 105, 125, 127, 134]. Результати вивчення токсичної дії на тест-бактерії полютантів в поверхневих водах акваторії острова Зміїний представлені в таблицях 1.25 – 1.27.

Проведене навесні (табл. 1.25) біотестування проб морської води показало, що кількість життєздатних клітин *Salmonella typhimurium* TA98 на середовищі МПА коливалась від 34,2±1,1 до 400,6±10,3 КУО/мл, а для *Salmonella typhimurium* TA100 – від 14,4±1,2 до 201,6±11,8 КУО/мл. Найбільша токсична дія при тестуванні з штамом TA 98 відмічена на станції **f**, а з TA100 – на станції **m**.

Стимулююча активність полютантів морської води на тест-бактерії TA98 була відмічена на станціях **h**, **j**, на тест-бактерії TA100 – на станції **k**. Мінімальна токсична дія забруднювачів морської води виявлена на станції **h**. Середня токсична дія складала 18% відносно контролю для TA98 і 30% для TA 100.

Проведене влітку (табл. 1.26) біотестування проб морської води показало, що кількість життєздатних клітин *Salmonella typhimurium* TA98 на середовищі МПА коливалась від 90,4±4,0 до 5496,0±156,0 КУО/мл, а для *Salmonella typhimurium* TA100 – від 76,8±8,0 до 924,8±111,6 КУО/мл. Найбільша токсична дія при тестуванні TA 98 відмічена на станції **k**, а при TA100 – на станції **f**.

Таблиця 1.25

**Вплив забруднень морської води акваторії о. Зміїний
на життєздатність бактерій *Salmonella typhimurium* (навесні)**

Станція	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
	Кількість клітин на середовище МПА, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$ ($\times 10^6$)	Токсичність, (кратність по відношенню до контролю, %)	Кількість клітин на середовище МПА, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$ ($\times 10^6$)	Токсичність, (кратність по відношенню до контролю, %)
Контроль	95,0 $\pm$ 1,2	100	183,8 $\pm$ 0,4	100
Віддалені станції				
<i>f</i>	34,2 $\pm$ 1,1	36,0	45,0 $\pm$ 1,9	24,5
<i>m</i>	202,0 $\pm$ 1,8	212,6	14,4 $\pm$ 1,2	7,8
Прибережні станції				
<i>g</i>	96,4 $\pm$ 2,9	101,5	90,0 $\pm$ 3,7	49,0
<i>h</i>	400,6 $\pm$ 10,3	421,7	106,0 $\pm$ 4,8	57,7
<i>i</i>	150,0 $\pm$ 1,8	157,9	103,6 $\pm$ 6,0	56,4
<i>j</i>	272,6 $\pm$ 6,1	286,9	40,0 $\pm$ 1,4	21,8
<i>k</i>	261,0 $\pm$ 18,6	274,7	201,6 $\pm$ 11,8	109,7
<i>l</i>	46,2 $\pm$ 3,5	48,6	124,0 $\pm$ 3,1	67,5

Стимулююча активність полютантів морської води на ріст тест-бактерії TA98 була відмічена на станціях *h*, *m*, а на тест-бактерії TA100 – на станції *g*. Мінімальні значення токсичної дії забруднювачів морської води виявлені на станції *k*. Середня токсична дія складала 45% відносно контролю для TA98 і 85 % для TA 100.

Восени (табл. 1.27) на основі даних проведення біотестування морської води виявлено, що кількість життєздатних клітин *Salmonella typhimurium* TA98 на середовищі МПА коливалась від 13,0 $\pm$ 3,3 до 471,6 $\pm$ 6,6 КУО/мл, а *Salmonella typhimurium* TA100 – від 8,4 $\pm$ 0,8 до 245,8 $\pm$ 13,7 КУО/мл. Найбільша токсична дія при

Таблиця 1.26

**Вплив забруднень морської води акваторії о. Зміїний
на життєздатність бактерій *Salmonella typhimurium* (влітку)**

Станція	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
	Кількість клітин на середовище МПА, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$ ($\times 10^6$)	Токсичність, (кратність по відношенню до контролю, %)	Кількість клітин на середовище МПА, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$ ($\times 10^6$)	Токсичність, (кратність по відношенню до контролю, %)
Контроль	406,4 $\pm$ 32,3	100,0	90,4 $\pm$ 4,0	100,0
Віддалені станції				
<i>f</i>	112,8 $\pm$ 18,9	27,8	76,8 $\pm$ 8,0	85,0
<i>m</i>	5496,0 $\pm$ 156,0	1352,4	434,4 $\pm$ 28,2	480,5
Прибережні станції				
<i>g</i>	274,4 $\pm$ 8,1	67,5	924,8 $\pm$ 111,6	1023,2
<i>h</i>	3755,2 $\pm$ 228,6	924,0	652,8 $\pm$ 91,1	722,3
<i>i</i>	168,8 $\pm$ 5,2	41,5	162,4 $\pm$ 12,3	179,6
<i>j</i>	302,4 $\pm$ 52,1	74,4	224,8 $\pm$ 26,5	248,7
<i>k</i>	90,4 $\pm$ 4,0	22,2	86,4 $\pm$ 4,0	95,6
<i>l</i>	148,8 $\pm$ 6,7	36,6	142,4 $\pm$ 26,8	157,5

тестуванні з ТА 98 відмічена на станціях *f, g, i, k, m*, а з ТА100 – на станції *j*. Середня токсична дія складала 4,6% відносно контролю для ТА98 і 19,2% для ТА 100.

Аналіз результатів біотестування морської води в тест-системах *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 показав, що морська вода здійснювала як токсичну, так і стимулювальну дію на тест-бактерії [10, 11, 48, 125]. Найбільші значення токсичної дії виявлені з використанням *Salmonella typhimurium* TA98, який більш чутливий до дії різних циклічних сполук. Речовини, що забруднюють морську воду, в виявлених концентраціях індукували мутації повернення до прототрофності у використовуюва-

Таблиця 1.27

**Вплив забруднень морської води акваторії о. Зміїний
на життєздатність бактерій *Salmonella typhimurium* (восени)**

Станція	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
	Кількість клітин на середовище МПА, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$ ($\times 10^6$)	Токсичність, (кратність по відношенню до контролю, %)	Кількість клітин на середовище МПА, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$ ($\times 10^6$)	Токсичність, (кратність по відношенню до контролю, %)
Контроль	301,2 $\pm$ 9,7	100,0	260,0 $\pm$ 19,4	100,0
Віддалені станції				
<i>f</i>	13,8 $\pm$ 2,4	4,6	80,6 $\pm$ 8,1	31,0
<i>m</i>	15,2 $\pm$ 1,9	5,0	108,4 $\pm$ 6,1	41,7
Прибережні станції				
<i>g</i>	13,0 $\pm$ 3,3	4,3	245,8 $\pm$ 13,7	94,5
<i>h</i>	180,0 $\pm$ 8,9	59,8	207,6 $\pm$ 15,8	79,8
<i>i</i>	13,0 $\pm$ 2,8	4,3	40,4 $\pm$ 2,8	15,5
<i>j</i>	324,4 $\pm$ 26,2	107,7	8,4 $\pm$ 0,8	3,2
<i>k</i>	14,4 $\pm$ 0,8	4,8	12,4 $\pm$ 2,1	4,8
<i>l</i>	471,6 $\pm$ 6,6	156,6	178,8 $\pm$ 9,7	68,8

них тест-мікроорганізмів. Результати вивчення мутагенної дії забруднювачів в поверхневих водах навколо острову Зміїний на тест-бактерії представлені в таблицях 1.28 – 1.30.

Встановлено, що навесні концентрація мутацій клітин *Salmonella typhimurium* TA98 коливалась від 1,2 до 33,8%, а *Salmonella typhimurium* TA100 – від 8,53 до 490,7%. Найбільша концентрація мутацій по відношенню до контролю відмічена у воді, відібраній зі станції *l* (12,3%) при тестуванні TA 98 та станції *g* (4,9%) при TA100. Мінімальне значення концентрації мутацій тест-бактерій виявлено на станції *k*. Середня концентрація мутацій складала 4,5% відносно контролю для TA98 і 5,2 % для

Таблиця 1.28

**Рівень індукції мутацій за впливу забруднень морської води
акваторії о. Зміїний (навесні)**

Станція	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98		<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	
	Кількість колоній на середовище САС, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$	Мутагенна активність (кратність по відношенню до контролю)	Кількість колоній на середовище САС, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$	Мутагенна активність (кратність по відношенню до контролю)
Контроль	$(2,6 \pm 0,01) \times 10^2$	1,00	3620,8	1,00
Віддалені станції				
<i>f</i>	$(8,39 \pm 0,3) \times 10^2$	8,97	$(2,20 \pm 0,7) \times 10^4$	24,91
<i>m</i>	$(4,80 \pm 0,8) \times 10^2$	0,87	$(3,80 \pm 0,2) \times 10^2$	1,34
Прибережні станції				
<i>g</i>	$(1,14 \pm 0,01) \times 10^3$	4,32	$(8,83 \pm 1,3) \times 10^3$	4,99
<i>h</i>	$(4,80 \pm 0,2) \times 10^2$	0,44	$(2,14 \pm 0,4) \times 10^3$	1,03
<i>i</i>	$(2,80 \pm 0,08) \times 10^2$	0,68	$(1,70 \pm 0,9) \times 10^3$	0,81
<i>j</i>	$(2,14 \pm 0,4) \times 10^3$	2,87	$(1,61 \pm 0,3) \times 10^3$	2,01
<i>k</i>	$(1,13 \pm 0,03) \times 10^3$	1,88	$(1,71 \pm 0,9) \times 10^3$	0,43
<i>l</i>	$(1,56 \pm 0,1) \times 10^3$	12,34	$(5,84 \pm 1,2) \times 10^3$	2,39

TA100. На віддаленій від острова станції **m** концентрація мутацій була не високою – 1,34% TA100.

В результаті біотестування морської води влітку встановлено, що концентрація мутацій клітин *Salmonella typhimurium* TA98 коливалась від 3,4 до 2757,5%, а *Salmonella typhimurium* – TA100 від 2,27 до 305,2%. Найбільша концентрація мутацій по відношенню до контролю була відмічена у воді, відібраний зі станції **f**, та при тестуванні TA 98 складала 22,5%, а при тестуванні TA100 – 4,3%. Мінімальне значення концентрації мутацій клітин тест-бактерій виявлено на станції **i**. Середня концентрація мутацій складала 7,4% відносно контролю для TA98 і 1,6 % для TA100. На

Таблиця 1.29

**Рівень індукції мутацій за впливу забруднень морської води
акваторії о. Зміїний (влітку)**

Станція	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98		<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	
	Кількість колоній на середовище САС, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$	Мутагенна активність (кратність по відношенню до контролю)	Кількість колоній на середовище САС, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$	Мутагенна активність (кратність по відношенню до контролю)
Контроль	$(4,91 \pm 0,7) \times 10^4$	1,00	$(6,35 \pm 0,3) \times 10^3$	1,00
Віддалені станції				
<i>f</i>	$(3,11 \pm 0,3) \times 10^4$	22,45	$(2,34 \pm 0,3) \times 10^4$	4,34
<i>m</i>	$(2,51 \pm 0,8) \times 10^5$	0,37	$(6,09 \pm 1,1) \times 10^4$	1,99
Прибережні станції				
<i>g</i>	$(2,21 \pm 0,1) \times 10^5$	6,55	$(2,09 \pm 0,8) \times 10^3$	0,03
<i>h</i>	$(3,87 \pm 0,7) \times 10^4$	0,08	$(1,12 \pm 0,07) \times 10^4$	2,46
<i>i</i>	$(5,80 \pm 0,7) \times 10^2$	0,03	$(3,39 \pm 1,3) \times 10^2$	0,03
<i>j</i>	$(6,95 \pm 1,2) \times 10^4$	1,87	$(4,67 \pm 0,9) \times 10^4$	2,95
<i>k</i>	$(5,11 \pm 0,3) \times 10^4$	4,60	$(5,15 \pm 2,1) \times 10^3$	0,85
<i>l</i>	$(2,97 \pm 0,4) \times 10^5$	16,28	$(2,14 \pm 0,3) \times 10^3$	0,21

віддаленій від острова станції *m* найбільша концентрація мутацій виявлялась в невеликом значенні - 1,99 % для TA100.

Восени встановлено, що концентрація мутацій клітин *Salmonella typhimurium* TA98 коливалась від 43,1 до 12342,1% , а *Salmonella typhimurium* TA100 – від 2,2 до 6438,7%. Найбільша концентрація мутацій по відношенню до контролю була виявлена у воді, відібраний зі станції *k*, її величина при тестуванні TA 98 складала 14,2%, а при тестуванні TA100 – 3,8%.

Мінімальні значення концентрації мутацій тест-бактерій виявлені на станції *m* для TA 100.

Таблиця 1.30

**Рівень індукції мутацій за впливу забруднень морської води
акваторії о. Зміїний (восени)**

Станція	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98		<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	
	Кількість колоній на середовище CAC, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$	Мутагенна активність (кратність по відношенню до контролю)	Кількість колоній на середовище CAC, $\bar{X} \pm \Delta_{0,05}$	Мутагенна активність (кратність по відношенню до контролю)
Контроль	$(1,14 \pm 0,4) \times 10^5$	1,00	$(4,37 \pm 1,4) \times 10^5$	1,000
Віддалені станції				
<i>f</i>	$(4,70 \pm 0,8) \times 10^4$	9,00	$(8,96 \pm 1,7) \times 10^5$	2,167
<i>m</i>	$(1,87 \pm 1,7) \times 10^5$	32,61	$(1,86 \pm 0,9) \times 10^5$	0,001
Прибережні станції				
<i>g</i>	$(5,60 \pm 1,3) \times 10^2$	0,11	$(1,86 \pm 0,3) \times 10^5$	0,535
<i>h</i>	$(2,95 \pm 0,5) \times 10^4$	0,43	$(4,52 \pm 0,4) \times 10^4$	0,666
<i>i</i>	$(5,88 \pm 1,5) \times 10^4$	11,95	$(2,00 \pm 0,1) \times 10^4$	1,419
<i>j</i>	$(1,60 \pm 0,7) \times 10^5$	1,31	$(5,12 \pm 1,3) \times 10^4$	2,453
<i>k</i>	$(7,74 \pm 2,8) \times 10^4$	14,21	$(1,15 \pm 0,1) \times 10^6$	3,826
<i>l</i>	$(8,38 \pm 2,3) \times 10^4$	0,47	$(6,51 \pm 2,1) \times 10^4$	0,357

Середня концентрація мутацій складала 5,4% відносно контролю для TA98 і 1,6% - для TA100. На станції *m* за допомогою TA 98 концентрація мутацій складала максимальну величину – 32,6%.

Таким чином, проведені дослідження виявили високі значення мутагенної активності поллютантів в пробах морської води [48, 125, 127, 134]. З використанням тест-бактерії *Salmonella typhimurium* TA98 була виявлена максимальна концентрація мутацій влітку на тест-системі *Salmonella typhimurium* TA100 – навесні.

Обговорення

Комплексні мікробіологічні, вірусологічні та санітарно-екологічні дослідження морської води Одеської затоки Чорного моря та акваторії острова Зміїний дозволили встановити вміст умовно-патогенних, санітарно-показових мікроорганізмів і вірусів в контактній зоні моря. Виявлено контамінацію морської води патогенними для людини вірусами гепатиту А і ротавірусу та наявність йонів важких металів.

Аналізуючи отримані дані можна зробити висновок про те, що з літа по осінь у морській воді накопичуються біологічно небезпечні речовини різноманітного походження, про що свідчило зростання кількості проб з високими показниками генотоксичності та мутагеності, виявлені у бактеріальних тест-системах *Salmonella typhimurium* TA100 та *Salmonella typhimurium* TA98.

Генетичний апарат мікроорганізмів чутливий до дії хімічних полютантів у концентраціях, які визначені і реально існують в прибережних районах моря. Порівняльний аналіз показує, що мікроорганізми в морській воді перебувають під хронічним тиском токсичних речовин антропогенного походження і чутливо реагують на них змінами у генетичному апараті. Генетичні перебудови сприяють адаптації мікроорганізмів до нових хімічних умов, при цьому протікають зміни в мікробних угрупованнях, що підвищують адаптивні еколого-фізіологічні властивості, зокрема швидкість деструкції полютантів і стійкість членів мікробного ценозу до їх токсичної дії [12-15].

Проведені дослідження свідчать також про велике значення та потенціал зони псамоконтуру в очищенні морської води від небажаних мікроорганізмів. Мікробіота порової води інтерстиціальних порожнин зони псамоконтуру, який є природним біофільтром, здатна суттєво знешкоджувати привнесене людиною як біологічне так і хімічне забруднення і потребує у подальшому більшої уваги науковців.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Авер'янов Г. Ю., Полюк К. В., Доброва Г. О. Еколого-мікробіологічна характеристика прибережних вод острова Зміїний // IV Всеукраїнська студентська наукова конференція “Сучасні проблеми природничих наук” (Ніжин, 22-23 квітня, 2009 р.): мат. конф. – Ніжин, 2009. – С. 78–79.
2. Білоіваненко С., Бухтіяров А., Лісютін Г. Кількісне визначення дріжджів та дріжджеподібних грибів прибережних вод острова Зміїний // V Міжнародна конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 12-15 травня, 2009 р.): мат. конф. – Львів, 2009. – Т. 1. – С. 43–44.
3. Білоіваненко С. О., Гаджий Н. О., Остапчук А. М., Іваниця В. О. Екологія та характеристика дріжджів прибережних вод острова Зміїний // XIII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Ялта, 1-6 жовтня, 2013 р.): тез. доп. – Ялта, 2013. – С. 149.
4. Бондаренко В. І., Задорожна В. І., Доан С. І. Роль морської води у поширенні ентеровірусних інфекцій // Вода і водоочисні технології. – 2002. – № 23. – С. 41–46.
5. Булавка Л. В., Бондаренко В. І., Задорожна В. І. та ін. Роль об'єктів довкілля у розповсюдженні ротавірусної інфекції // Довкілля та здоров'я. – 2002. – № 2. – С. 35–38.
6. Бургаз О. А., Верлан В. А., Тітяпкин А. С. Оцінка надходження забруднюючих речовин в Чорне море зі стоком річки Дунай // Молодий вчений. – 2017. – Т. 9, № 49. – С. 38–42.
7. Бургаз О. А., Верлан В. А., Тітяпкин А. С. Оцінка надходження забруднюючих речовин у Чорне море зі стоком головних річок // Науковий вісник Херсонського державного університету. Серія: Географічні науки. – 2018. – В. 8. – С. 164–168.
8. Бурдиян Н. В. Анаэробные бактерии перифитона бухты Артиллерийская (Севастополь, Черное море) // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2014. – В. 11. – С. 174–178.
9. Бухтіяров А. Є., Білоіваненко С. О., Лісютін Г. В., Гудзенко Т. В., Хитрова А. М., Іваниця В. О. Еколого-мікробіологічні дослідження прибережних вод острова Зміїний // XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського

- (Ужгород, 25-30 травня, 2009 р.): тез. доп. – Ужгород: Патент, 2009. – С. 99.
10. Васильева Т. В., Иваница В. А., Панченко Н. Н., Васильева Н. Ю., Хачирова С. А. Оценка токсичности и мутагенности некоторых приоритетных компонентов загрязнения в бактериальной тест-системе *Salmonella typhimurium* TA 100 // Технические и системные методы экологического мониторинга. / Тр. Ин-та кибернетики НАН Украины. – 1998. – С. 64–68.
 11. Васильева Т. В., Панченко Н. Н., Васильева Н. Ю. Методика комплексной оценки токсичности и мутагенности в бактериальной и водорослевой тест-системах // Интеллектуальные информационно-аналитические системы и комплексы. – К.: Ин-т кибернетики им. В.М. Глушко НАН Украины, 2000. – С. 78–84.
 12. Васильева Н. Ю., Крилова К. Д., Кристофферсен Й. Б., Дубровіна О. А., Іваниця В. О. Мікробна різноманітність прибережних вод Одеської затоки Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2018. – № 4. – С. 63–75.
 13. Васильева Н. Ю., Страшнова І. В., Васильєв М. А., Метеліцина І. П. Стійкість бактерій роду *Lactobacillus*, ізольованих з чорноморських губок, до антибіотиків, важких металів // Мікробіологія і біотехнологія. – 2019. – Т. 3, № 47. – С. 58–77.
 14. Васильева Н. Ю., Страшнова І. В., Басюл О. В., Ковтун І. О., Іваниця В. О. Стійкість до антибіотиків молочнокислих коків, ізольованих з чорноморських водоростей і мідій // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – Т. 2, № 49. – С. 8–19.
 15. Вершинин А. О. Жизнь Черного моря. – М.: Макцентр, 2003. – 174 с.
 16. Гаркавая Г. П., Богатова Ю. И. Формирование качества воды прибрежной зоны Черного моря в условиях антропогенного воздействия // Управление и охрана побережий северо-западного Причерноморья (Одесса, 30 сентября-6 октября, 1996 г.): мат. межд. симпозиума. – Одесса: Астропринт, 1996. – С. 21–22.

17. Гончаров А. Ю. Гидрохимический режим и первичная продукция фитопланктона в районе аварийного выпуска сточных вод в Одесском заливе // Экология моря. – 2001. – В. 58. – С. 64–68.
18. Горшкова О. Г., Гудзенко Т. В., Бухтіяров А. Є. та ін. Виявлення аллохтонних вірусів в акваторії о. Зміїний // XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Ужгород, 25-30 травня, 2009 р.): тез. доп. – Ужгород: Патент, 2009. – С. 428.
19. Горшкова О. Г., Самойленко Т. В., Яременко К. М. та ін. Алохтонні віруси морського середовища північно-західної частини Чорного моря // Збірник наукового товариства студентів, аспірантів та молодих вчених. Природничі науки. – Одеса: Південне мисливство, 2011. – С. 33–34.
20. Горшкова О. Г., Яременко К. М., Самойленко Т. В. Виявлення алохтонних вірусів у прибережних водах острова Зміїний // 5 Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 22-25 листопада, 2010 р.): мат. конф. – Харків: Оперативна поліграфія, 2010. – С. 446.
21. Горшкова О., Скоропуд О., Шулякова С. та ін. Біологічні властивості морських бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти, виділених з акваторії о. Зміїний. // V Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології» (Львів, 12-15 травня, 2009 р.): мат. конф. – Львів, 2009. – Т. 2. – С. 171.
22. Горшкова О. Г. Антагоністична і деструктивна активність морських бактерій // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – Т. 4, № 40. – С. 65–75.
23. Горшкова О. Г., Волювач О. В., Молодіт О. В. та ін. Санітарно-мікробіологічні і вірусологічні дослідження морської води у рекреаційних зонах Чорноморського узбережжя // XIII Международная научно-практическая конференция «Новината за напреднали наука – 2017» (София, 15-22 май, 2017 г.): мат. конф. – София, 2017. – Т. 9. – С. 13-15.
24. Горшкова О. Г. Антагоністична активність бактерій, виділених із проб води Куяльника та ґрунту о. Зміїний // Актуальні

- питання розвитку біології та екології. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції (3–7 жовтня 2016 р., м. Вінниця, Україна). – Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2016. – С. 222-224.
25. Горшкова О. Г., Гудзенко Т. В., Волювач О. В. Біотехнологічні властивості штаму *Pseudomonas cerascia* ONU-327 – деструктора фенольних і важкоокиснювальних сполук // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – 2017. – Т. 3, № 70. – С. 60–64.
 26. Горшкова О. Г., Гудзенко Т. В., Волювач О. В., Васильєва Н. Ю. Метал-акумуюча та деструктивна активність іммобілізованих бактерій в біотехнології очищення морської води // Вісник Харківського національного університету. Серія: біологія. – 2017. – В. 29. – С. 5–11.
 27. Горшкова О. Г., Гудзенко Т. В., Волювач О. В., Конуп І. П., Беляєва Т. О. Використання біологічно модифікованого синтетичного носія для очистки морської води за умов її багатофакторного забруднення // XV з'їзд товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Одеса, 11-15 вересня, 2017 р.): тез. доп. – Одеса, 2017. – С. 257.
 28. Горшкова О. Г., Самофалов М. О. Розробка біотехнології очищення берегової зони о. Зміїний від вуглеводнів нафти // XIIth International scientific and practical conference daRostim 2016 “Biotechnology for agriculture and environmental protection” (Odessa, 07-10 September, 2016): proceedings. - Odessa, 2016 – P. 79–80.
 29. Губанов Е. П. Техногенное воздействие на экосистему Черного моря и его последствия // Рыбное хозяйство Украины. – 2005. – № 3–4 (38/39). – С. 14–18.
 30. Гудзенко Т. В., Волювач О. В., Бухтіяров А. Є., Конуп І. П., Беляєва Т. О., Лісютін Г. В. та ін. Оцінка нафтоокиснювальної активності мікроорганізмів, виділених із нафтозабруднених ґрунтів о. Зміїний // X Международная научно-практическая конференция «Ключевые проблемы современной науки – 2014» (София, 17-25 апреля, 2014 г.): мат. конф. – София, 2014. – Т. 12. – С. 47–49.

31. Гудзенко Т. В., Волювач О. В., Бухтіяров А. Є., Лісютін Г. В. та ін. Біодеструкція нафтових вуглеводнів ґрунтовими мікроорганізмами роду *Bacillus*, виділеними із ділянки нафтозабрудненого ґрунту о. Зміїний // X Международная научно-практическая конференция «Новости научной мысли – 2014» (София, 15-22 мая, 2014 г.): мат. конф. – София, 2014. – Т. 15. – С. 40–43.
32. Гудзенко Т. В., Волювач О. В., Конуп І. П., Беляєва Т. О., Бухтіяров А. Є., Лісютін Г. та ін. Дослідження нафтоокиснювальної активності, здатності продукувати біосурфактанти і антибіотикочутливості деяких мікроорганізмів, виділених із нафтозабруднених ґрунтів о. Зміїний // X Международная научно-практическая конференция «Тенденции современной науки – 2014» (Великобритания, 30.05-07.06, 2014 г.): мат. конф. – Великобритания, 2014. – С. 10–15.
33. Деньга Ю. М., Михайленко В. І., Олейнік Ю. В., Сафранов Т. А. Особливості забруднення деякими стійкими органічними поліюгантами морського середовища північно-західної частини Чорного моря // *Visnyk of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series: Ecology*. – 2020. – № 23. – С. 8–20.
34. Деньга Ю. М., Лисовский Р. И., Михайлов В. И. Нефтяное загрязнение в экосистемах Черного моря // *Екологічні проблеми Черного моря*. – Одеса: ЦНТПІОНЮА, 2003. – С. 123–134.
35. Дзюблик І. В., Обертинська О. В., Костенко І. Г. та ін. Поширення ротавірусів у водних об'єктах довкілля України // *Інфекційні хвороби*. – 2008. – № 4. – С. 38–43.
36. Доан С. І., Задорожна В. І., Бондаренко В. І. та ін. Порівняльна характеристика виділення ентеровірусів із води різного виду в Україні // *Довкілля та здоров'я*. – 2007. – № 4. – С. 38–41.
37. Елинская Н. А., Худченко Г. В., Иваница В. А. Биологические свойства *Cytophaga lytica*, выделенной из морской среды // Научная конференция молодых ученых Одесского университета (Одесса, 22-23 сентября, 1989 г.): мат. конф. – Одесса, 1989. – С. 171–175.

38. Зайцев Ю. П. Сообщество микроорганизмов поровых вод песчаных пляжей Черного моря. Факты и гипотезы // Мікробіологія і біотехнологія. – 2008. – № 2. – С. 8–19.
39. Зайцев Ю. П. Экологическое состояние шельфовой зоны Черного моря у побережья Украины // Гидробиологический журнал. – 1992. – Т. 4, № 28. – С. 3–18.
40. Зайцев Ю. П., Александров Б. Г. Україна на сторожі екологічного здоров'я Чорного моря // Вісник НАН України. – 2018. – № 9. – С. 53–58.
41. Зайцев Ю. П., Александров Б. Г., Миничева Г. Г. Северо-западная часть Черного моря: биология и экология. – Киев: Наукова думка, 2006. – 433 с.
42. Иваница В. А., Мединец В. И., Ковалева Н. В. Состояние микробных ценозов Черного моря на современном этапе // Международная конференция «Диагноз состояния морской среды Азово-Черноморского бассейна»: мат. конф. – Севастополь: НАН Украины, МГИ, 1994. – С. 55–60.
43. Иваница В. А. Скользящие бактерии порядков Muxobacterales и Cytophagales // Успехи микробиологии. – 1990. – № 24. – С. 65–87.
44. 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.
45. 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 // Сборник научных трудов УкрЭНЦЕМ. – 1994. – В. 1. – С. 54–67.
46. Іваниця В. О. Стан та мінливість мікробних ценозів морських екосистем: дис. ... док. біол. наук: 03.00.07. – Київ, 1996.
47. Іваниця В. О. Стан і мінливість ценозів в умовах антропогенного забруднення прісноводних і морських екосистем // Мікробіологічний журнал. – 1994. – Т. 56, № 1. – С. 61–69.
48. Іваниця В. О., Васильєва Н. Ю., Лісютін Г. В., Бухтіяров А. Є., Гудзенко Т. В. Токсична і мутагена активність

- забруднення акваторії острова Зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – № 2. – С. 36–42.
49. Іваниця В. О., Васильєва Т. В., Ржепішевська О. І., Дарієнко Г. І. Поширення і чисельність тіонових бактерій у Тилігульському і Григор'євському лиманах // Вісник Одеського національного університету. Серія: Біологія. – 2001. – Т. 6, № 2. – С. 1119–122.
50. Іваниця В. О., Гудзенко Т. В., Бухтіяров А. Є., Білоіваненко С. О., Волювач О. В., Андрющенко О. В. Нафтоокислювальна активність солетолерантних чорноморських бактерій і дріжджів // XIII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Ялта, 1-6 жовтня, 2013 р.): тез. доп. – Ялта, 2013. – С. 382.
51. Іваниця В. О., Гудзенко Т. В., Горшкова О. Г., Волювач О. В., Конуп І. П., Беляєва Т. О. Комплексний препарат для ремедіації прибережної морської води та зони псамоконтуру від хімічних і біологічних забруднювачів // Збірник робіт наукових установ Одеського регіону – учасників конкурсу інноваційних проєктів у 2015 р. – Одеса: ІНВАЦ, 2015. – В. 1. – С. 10–11.
52. Іваниця В. О., Єлинська Н. О., Бугайцова Ж. А., Ворохова О. Л., Гомонюк В. В., Чердинцева Т. А. Екологія, біологічні властивості, таксономія і колекція гетеротрофних ковзних бактерій // Мікробіологічний журнал. – 1994. – Т. 56, № 1. – С. 114–115.
53. Іваниця В. О., Штеніков М. Д., Остапчук А. М., Васильєва Н. Ю., Калиновський Й. Сіквенс геному *Bacillus pumilus* ONU 554, ізольованого з глибоководних донних відкладень Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – № 3. – С. 46–57.
54. Ільченко О. М., Самофалов М. О., Горшкова О. Г., Волювач О. В та ін. Сучасний екологічний стан рекреаційних зон Чорного моря // П'ятнадцята міжнародна науково-практична конференція «Ресурси природних вод Карпатського регіону. Проблеми охорони та раціонального використання» (Львів, 26-27 травня, 2016 р.): збір. наук. стат. – Львів:

Національний університет “Львівська політехніка“, 2016 – С. 25–28.

55. Калініченко Є., Горшкова О., Скоропуд О., Шулякова С., Михайлова Г., Гудзенко Т. та ін. Деструктивна активність вуглеводнеокислюючих бактерій, виділених з ґрунту о. Зміїний // V Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології» (Львів, 12-15 травня, 2009 р.): тез. конф. – Львів, 2009. – Т. 2. – С. 177.
56. Ковалева Н. В., Серман А. И. Исследование современного состояния бактериопланктона Черного моря // Исследования экосистемы Черного моря / Под ред. В. И. Мединца. – Одесса: Ирэнполиграф, 1994. – С. 134–140.
57. Ковальчук Л. Й., Мокиєнко А. В., Садкова А. Б. Характеристика захворюваності кишечними інфекціями населення українського придунав'я: к аналізу вкладу водного фактора // Актуальні проблеми транспортної медицини: навколишнє середовище; професійне здоров'я; патологія. – 2015. – № 1. – С. 36–45.
58. Козішкурт О. В. Епідеміологічна характеристика та роль водного фактору в поширенні гепатиту А в м. Одесі: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.02.02. – Київ, 2006. – 21 с.
59. Коломієць А. Г., Гудзенко Т. В. Виявлення алохтонних вірусів у медичних стоках та морській воді Чорного моря // Сборник докладов ежегодной студенческой конференции, кружков и заседаний научного общества в 2017 г. – Одеса, ОНУ імені І. І. Мечникова, 2017. – С. 17.
60. Кранга К. М., Васильєва Н. Ю., Страшнова І. В. Розподіл і мінливість чисельності гетеротрофних, коліформних і молочнокислих бактерій у воді і гідробіонтах Чорного моря // Вісник ОНУ. Серія: Біологія. – 2019. – Т. 24, в. 2 (45). – С. 113–125.
61. Кузнецов А. В. Санитарная охрана моря от загрязнения судами в системе эпидемиологического надзора за карантинными инфекциями: автореф. дис. ... док. мед. наук. – Одеса, 2004 –16 с.
62. Лісютін Г. В., Полюк К. В., Авер'янов Г. Ю., Білоіваненко С. О. та ін. Ліполітичні бактерії в прибережних водах

- острова Зміїний // IV Міжнародна науково-практична конференція “Проблеми фундаментальної і прикладної екології, екологічної геології та раціонального природокористування” (Кривий Ріг, 19-21 березня, 2009 р.): мат. конф. – Кривий Ріг: Видавничий дім, 2009. – С. 306–308.
63. Лісютін Г. В., Бухтіяров А. Є., Гудзенко Т. В., Іваниця В. О. Нафтоокиснювальні бактерії прибережних вод острова Зміїний // Міжнародна науково-практична конференція «Новітні досягнення біотехнології» (Київ, 21-22 жовтня, 2010 р.): мат. конф. – Київ: Мегапрінт, 2010. – С. 74–75.
64. Лісютін Г. В., Бухтіяров А. Є., Білоіваненко С. О., Пономарьова Л. П., Гудзенко Т. В., Іваниця В. О. Нафтове забруднення і гетеротрофна мікробіота акваторії острова Зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – № 1. – С. 88–94.
65. Лысенко А. М., Бугайцова Ж. А., Иваниця В. А. Уровень гомологии ДНК некоторых видов рода *Cytophaga* // Микробиологический журнал. – 1995. – Т. – 57, № 3. – С. 48–53.
66. Мальований А. М., Ятчишин Й. Й., Мальований М. С. Оцінка факторів, що впливають на специфічну активність процесу анамокс // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». – 2010. – № 677. – С. 285–289.
67. Марієвський В. Ф. Вода - фактор ризику інфекційних захворювань // Інфекційні хвороби. – 2013. – № 4. – С. 66–69.
68. Методичні вказівки. МВ 10.2.1-113-2005. Санітарно-мікробіологічний контроль якості питної води, затверджені наказом МОЗ від 03.02.2005 № 60. – Київ: МОЗ України, 2005.
69. Методичні вказівки. Санітарно-вірусологічний контроль водних об’єктів, затверджені наказом МОЗ від 03.05.2007 № 284. – К.: МОЗ України, 2007. – 72 с.
70. Методичні рекомендації МР 10.10.2.1-137-2007. Застосування тестових наборів COLILERT-18 для санітарно-бактеріологічного контролю якості води, затверджені наказом МОЗ від 24.01.2007 № 24. – К.: МОЗ України, 2007.
71. Методичні рекомендації МР 10.10.2.1-155-2008. Визначення найбільш вірогідного числа мікроорганізмів у воді з використанням тестів діагностичних Quanti-Disk та SimPlate,

- затверджені наказом МОЗ від 14.03.2008 № 138. – К.: МОЗ України, 2008.
72. Мокиєнко А. В., Петренко Н. Ф., Засыпка Л. И. Гигиеническая оценка загрязнения вирусами водных объектов и питьевой воды в Одесской области. Сообщение первое: энтеровирусы // Профілактична медицина. – 2010. – № 1. – С. 41–46.
 73. Мокиєнко А. В., Петренко Н. Ф., Полищук А. А. та ін. Водопользование Одесской области: к анализу рисков загрязнения вирусами водных объектов и питьевой воды // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2009. – Т. 1, № 15. – С.136–145.
 74. Мокієнко А. В., Ніколенко С. І., Пушкіна В. О. та ін. Еколого-гігієнічна оцінка санітарно-мікробіологічного стану та біологічної контамінації пелоїдів причорноморських лиманів // Медичні перспективи. – 2012. – Т. 17, № 1. – С. 143–147.
 75. Надворный Н. Н., Колоденко В. А., Засыпка Л. И. Эколого-гигиеническая оценка морских вод. – Одесса: Одесский облисполком, 1994. – 181 с.
 76. Никитина О. Г., Максимов В. Н., Булгаков Н. Г., Никитин Н. Е. Биоэстимация – новый метод контроля процесса очищения воды и его сравнение с биоиндикацией // Водные ресурсы. – 2009. – Т. 36, № 4. – С. 475–480.
 77. Николенко С. И., Иваница В. А. Использование миксобактерий в качестве индикаторов сельскохозяйственного загрязнения природных ресурсов. // Медицинская реабилитация, реабилитация, физиотерапия. – 1995. – № 1. – С. 53–55.
 78. Нідялкова Н. А., Дімова М. І. Стабільність протеолітичного ферменту бактерії, виділеної з акваторії острова Зміїний // IX наукова конференція молодих вчених «Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві» (Чернігів, 26-27 листопада, 2013 р.): тез. конф. – Чернігів: ЧГУ, 2013. – С. 26.
 79. Новіков Ю. В., Ластівчина К. О., Болдина З. Н. Методи дослідження якості води водойм. – М.: Медицина, 1990. – С. 74–82.

80. Обобщенный перечень предельно-допустимых концентраций и ориентировочно безопасных уровней вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов, утвержденный Главрыбводом Минрыбхоза СССР от 09.08.1990 г. № 12-04-11. – М., 1990.
81. Павловська М. О., Соломенко Л. І., Прекрасна Є. П., Дикий Є. О. Вплив ксенобіотиків на якісний склад прокаріот водної екосистеми Чорного моря // Біологічні системи: теорія та інновації. – 2020. – Т. 11, № 1. – С. 50–59.
82. Полюк К., Авер'янов Г., Білоіваненко С., Єгорова М., Лісютін Г., Бухтіяров А. Розповсюдження бактерій, що окиснюють фенол в прибережних водах острова Зміїний // V Міжнародна конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 12-15 травня, 2009 р.): мат. конф. – Львів, 2009. – Т. 1. – С. 94–95.
83. Рахімова О. Л., Іваниця В. О. Екологія міксобактерій південно-західної України // Вісник Одеського національного університету. Серія: Біологія. – 2001. – Т. 6, в. 2. – С. 229–231.
84. Рубцова С. И. Гетеротрофные бактерии – показатели загрязнения и самоочищения морской среды // Экология моря. – 2002. – В. 62. – С. 81–85.
85. Рылькова О. А., Гулин С. Б., Пименов Н. В. Определение общей численности микроорганизмов в донных осадках черного моря методом проточной цитометрии // Микробиология. – 2019. – Т. 88, № 6. – С. 685–694.
86. Сминтина В. А., Іваниця В. О., Гудзенко Т. В. та ін. Остров Зміїний. Рослинний і тваринний світ: монографія. – Одеса: Астропринт, 2008. – 182 с.
87. Смирнова Л. Л. Микробиологические методы при экологическом мониторинге донных отложений Черноморского шельфа // Екологічна безпека прибережної та шельфової зон та комплексне використання ресурсів шельфу. – 2013. – В. 27. – С. 422–430.
88. Смірнова Л. Л. Мікробіота морських донних нашарувань як індикатор їх забруднення залишками хімічних отруйних речовин // Наукові записки Тернопільського національного

- педагогічного університету. Серія: Біологія. Спец. вип.: Гідроекологія. – 2010. – Т. 3, № 44. – С. 247–250.
89. Степанова О. А. Экология аллохтонных вирусов Черного моря. – Севастополь: ЭКСПРЕСС ПЕЧАТЬ, 2004. – 307 с.
 90. Страшнова І. В., Ковтун І. О., Коротаєва Н. В. Характеристика молочнокислих бактерій губок Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – № 1. – С. 79–94.
 91. Теплинская Н. Г. Тенденции изменений качественного состава сапрофитного бактериопланктона и бентоса северо-западной части Черного моря под влиянием эвтрофирования // Итоги науки и техники. Серия: Микробиология. – М., 1995. – Т. 31. – С. 12–19.
 92. Теплинская Н. Г., Ковалева Н. В. Бактерии пелагиали и бентали. 2.5. Бактериальное загрязнение // Северо-западная часть Чёрного моря: (биология и экология) / Под ред. Ю. П. Зайцева и др. – К: Наук. думка, 2006. – С. 164–174.
 93. Теплинская Н. Г., Нидзвецкая Л. М. Микробиологическая характеристика Придунайского взморья в районе строительства судового хода Дунай – Черное море // Екологічна безпека прибережної та шельфової зон та комплексне використання ресурсів шельфу: зб. наук. праць. – 2007. – В. 15. – С. 567–574.
 94. Теплинская Н. Г., Нижегородова Л. Е., Нидзвецкая Л. М. Численность и распределение сапрофитных бактерий и бактерий ГКП в воде Одесского залива и сопредельной акватории // Микробиологический журнал. – 1993. – Т. 55, в. 3. – С. 7–11.
 95. Тропівська Г. Г., Нідзвецька Л. М. Санітарно-мікробіологічна оцінка якості донних відкладень Хаджибейського лиману та Одеської затоки в умовах скидання стічних вод // Вісник ОНУ. Серія: Біологія. – 2018. – Т. 23, в. 1 (42). – С. 55–66.
 96. Унифицированные методы анализа вод / Под ред. Ю. Ю. Лурье. – М.: Химия, 1971. – 400 с.
 97. Фролов А. Ф., Задорожна В. І., Доан С. І. Вода як фактор передачі вірусних інфекцій // Актуальні проблеми транспортної медицини. – 2006. – № 1. – С. 65–69.

98. Цыбань А. В., Иваница В. А., Худченко Г. В., Панов Г. В., Баринова С. П. Таксономический состав гетеротрофных бактерий // Исследование экосистемы Берингова и Чукотского морей / Под ред. Ю. А. Израэля, А. В. Цыбань. – С.-П.: Гидрометеиздат, 1992. – С. 166–171.
99. Чабан М. М., Гудзенко Т. В. Виявлення анамокс бактерій у стічних водах фармацевтичного виробництва // Мікробіологія і біотехнологія. – 2019. – Т. 1, № 45. – С. 48–55.
100. Штеніков М. Д., Остапчук А. М., Іваниця В. О. Склад жирних кислот, амінокислот та моноцукридів бактерій роду *Bacillus*, виділених з донних відкладень Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – №1. – С. 20–31.
101. Akdemir T., Dalgic G. The impact of the marine sewage outfalls on the sediment quality: The Black Sea and the Marmara case // Saudi journal of biological sciences. – 2021. – V. 28, № 1. – P. 238–246.
102. Ames B. N., Lee W., Duurston E. An improved bacterial test sistem for the detection and classification mutagens and cancerogens // Prog. Natil. Acad Sci. USA. – 1970. – V. 70, № 7. – P. 782–795.
103. Ames B. N. The detection of chemical mutagens with bacteria // Chemical mutagens: Principles and Methods for their Detection / Ed. A. Hollaender. – 1971. – № 1. – P. 267–282.
104. Barbara L. Monitoring of Genotoxicity in Drinking Water Using in vitro Comet Assay and Ames Test /Barbara Lah, Brigita Žinko, Mojca Narat, Romana Marinšek-Logara // Food Technology and Biotechnology. – 2005. – V. 43, № 2. – P. 139–146.
105. Barbara L. Genotoxicity Detection in Drinking Water by Ames Test, Zimmermann Test and Comet Assay,/ Barbara Lah, Brigita Žinko, Tatjana Tišler, Romana Marinšek-Logara // Acta Chimica Slovenica. – 2005. – V.5 2. – P. 341–348.
106. Boran Muhammet, Karacam Hkmet, Celikkale, Salih M., Kose Sevim, Feyzioglu Muzaffer, Kutlu Sebahattin. Levels of heavy metals in blue whiting caught from the eastern Black sea area of Turkey // Toxicological and Environmental Chemistry. – 2000. – V. 75, № 1–2. – P. 67–73.

107. Buchvarov G., Kirin D., Kuzmanov N. Contents of heavy metals (Pb, Cu, Zn) in some species of fishes from the Bulgarian Black Sea coast // *Journal of Environmental Protection and Ecology*. – 2003. – V. 4, № 2. – P. 365–370.
108. Biloivanenko S., Ivanytsya V., Bukhtiyarov A., Lisyutin G. Study of yeast biota of coastal surface waters oa Zmiinyi island: ecological and microbiological aspects // 3rd Ukrainian-Polish Weigl Conference “Microbiology on service for human” (Odesa, September, 2009): abstract. – Odesa, 2009. – P. 33–34.
109. Chasovnikov V. K., Chjoo V. P., Ocherednik O. A., Maryasova E. S. Evaluation of the Lever of Technogenic Pollution in the Coastal Zone of the Black Sea near Gelendzhik // *Marine Chemistry*. – 2016. – V. 56, № 1. – P. 76–80.
110. Chen H., Jin R. Summary of the preservation techniques and the evolution of the anammox bacteria characteristics during preservation // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – V. 101, № 11. – P. 4349–4362.
111. Chiriac F. L., Pirvu F., Paun I. Investigation of endocrine disruptor pollutants and their metabolites along the Romanian Black Sea Coast: Occurrence, distribution and risk assessment // *Environmental toxicology and pharmacology*. – 2021. – V. 86, № 103673. – P. 22–39.
112. Dapena-Mora A. Stability of the ANAMMOX process in a gas-lift reactor and a SBR // *Journal of Biotechnology*. – 2004. – V. 110. – P. 159–170.
113. Dinc B., Celebi A., Avaz G., Canl O., Guzel B., Eren B., Yetis U. Spatial distribution and source identification of persistent organic pollutants in the sediments of the Yesilirmak River and coastal area in the Black Sea // *Marine pollution bulletin*. – 2021. – V. 172, № 112884. – P. 25–39.
114. Fajardo-Cavazos P., Maughan H., Nicholson W. L. Evolution in the Bacillaceae // *Microbiol. Spectrum*. – 2014. – V. 2, № 5. – P. 221–240.
115. Ghiglione J. F., Mevel G., Pujo-Pay M., Mousseau L., Lebaron P., Goutx M. Diel and Seasonal Variations in Abundance, Activity, and Community Structure of Particle-Attached and

- Free-Living Bacteria in NW Mediterranean Sea // *Microbial Ecology*. – 2007. – V. 54, № 2. – P. 217–231.
116. Ghinsberg R. C., Bar Dov L., Rogol M., Sheinberg Y., Nitzan Y. Monitoring of selected bacteria and fungi in sand and sea water along the Tel Aviv coast // *Microbios*. – 1994. – V. 77, № 310. – P. 29–40.
 117. 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: abstract, 1995, – P. 79–86.
 118. Kartal B. Anammox Biochemistry: a Tale of Heme c Proteins – A review // *Cell Press*. – 2016. – № 41. – P. 998–1011.
 119. Kocamemi B. A., Dityapak D. Anammox start-up strategies: the use of local mixed activated sludge seed versus Anammoxseed // *Water Science & Technology*. – 2018. – V. 78, № 9. – P. 1901–1915.
 120. Kolodiazieva A., Plokhinova K., Isakova N., Kara M., Uzhakova N., Gorshkova O. Rotavirus distribution in medical wastewater and seawater of the Black sea coast in Odesa water // *Modern Problems of Biology, Biotechnology, Biomedicine: materials of young scientists of the International Summer School Conference «Biology, Biotechnology, Biomedicine» (Odesa, 29 June - 10 July 2020): abstract*. – Odesa, 2020. – P. 41–43.
 121. Logan N. A., De Vos P. *Bacillus* // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* / Ed. W. B. Whitman. – John Wiley & Sons, Inc, 2015. – P. 1–164.
 122. Mandic-Mulec I., Stefanic P., van Elsas J. D. Ecology of Bacillaceae // *Microbiology Spectrum*. – 2015. – V. 3, № 1. – C. 1–24.
 123. Mironov O. A., Mironov O. G. Current level of oil hydrocarbons in Russian coastal waters of the Black Sea and Azov Sea // *South of Russia-ecology development*. – 2020. – V. 15, № 3. – P. 77–85.
 124. Nicholson W. L. Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments // *Microbiology and Molecular Biology Reviews* – 2000. – V. 64, № 3. – P. 548–572.

125. Ohe T., Watanabe T., Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: a review // *Mutation Research*. – 2004. – V. 567, № 2–3. – P. 109–149.
126. Ozgun D. Currnt molecular biologic techniques for anaerobic ammonium oxidizing (ANAMMOX) bacteria // Sixteenth International Water Technology Conference (Istanbul, 2012): abstract. – Istanbul: IWTC, 2012.
127. Park J. H., Kang K. S., Lee Y. S. Mutagenicity of water samples from five cities in Korea // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2001. – V. 63, № 7. – P. 767–771.
128. Quantitative and Qualitative Aspects of Sandy Sediment Microbiota On the Romanian Black Sea Littoral: Theoretical and Applicative Significance LAP LAMBERT // Academic Publishing, 2017.
129. Schmid M. Molecular Evidence for Genus Level Diversity of Bacteria Capable of Catalyzing Anaerobic Ammonium Oxidation // *System Appl Microbiol*. – 2000. – № 23. – P. 93–106.
130. Simionov I. A., Cristea D. S., Petrea S. M., Mogodan A., Nicorara M., Plavan G. et al. Preliminary investigation of lower Danube pollution caused by potentially toxic metals // *Chemosphere*. – 2020. – V. 264, №128496.
131. Simsek A., Ozkoc H. B., Bakan G. Environmental, ecological and human health risk assessment of heavy metals in sediments at Samsun-Tekkekoy, North of Turkey // *Environmental science and pollution research*. – 2021. – V. 29. – P. 1–16.
132. Solovieva O. V., Tikhonova E. A., Mironov O. A., Alyomova T. E. Origin of hydrocarbons in the water of the river-sea mixing zone: A case study from the Chernaya River – The Sevastopol bay, Black Sea // *Regional studies in marine science*. – 2021. – V. 45. – №101870.
133. Tsyban A. V., Panov G. V., Ivanitsa V. A., Khudchenko G. V. Taxonomic Composition of heterotrophic bacteria // Third Joint US-USSR Bering and Chukchi Seas Expedition (BERPAC) (summer, 1988): results / Ed. P. A. Na-gel – US Fish and Wild life Service, Washington, D.C., 1992. – P. 87–90.
134. Vargas V. M. F., Motta V. E. P., Henriques J. A. P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influ-

- ence of petrochemical industries // *Mutation Research/Genetic Toxicology*. – 1993. – V. 319, № 1. – P. 31–45.
135. Vasiliu D., Bucse A., Lupascu N., Ispas B., Gheablau C., Stanescu I. Assessment of the metal pollution in surface sediments of coastal Tasaul Lake (Romania) // *Environmental monitoring and assessment*. – 2020. – V. 12. – P. 1–16.
 136. Wijsman J. W. M., Herman P. M. J., Gomoin M.-T. Special distribution in sediment characteristics and benthic activity on northwestern Black Sea shelf // *Mar. Ecology Progr. Series*. – 1999. – 119 p.
 137. Zaitsev Y. A key role of sandy beaches in the marine environment. Black Sea // *Mediterranean Environment*. – 2012. – V. 18, № 2. – C. 114–127.
 138. Zaitsev Y. *An Introduction to the Black Sea Ecology*. - Odessa: Smil Edition and Publishing Agency ltd., 2008. – 228 p.
 139. Zhang L., Okabe S. Rapid cultivation of free-living planktonic anammox cells // *Water Research*. – 2017. – № 127. – P. 204–210.
 140. Zhang Z., Liu S. Hot topics and application trends of the anammox biotechnology: a review by bibliometric analysis // *Springer Plus*. – 2014. – № 3. – P. 220.
 141. Zhu G., Wang S. Resuscitation of anammox bacteria after >10,000 years of dormancy // *The ISME Journal*. – 2019. – V. 13. – P. 1098–1109.

РОЗДІЛ 2. МЕТАГЕНОМНИЙ АНАЛІЗ МІКРОБІОТИ ПРИБЕРЕЖНИХ ВОД ОДЕСЬКОЇ ЗАТОКИ, ОСТРОВА ЗМІЙНИЙ ТА ПРИЧОРНОМОРСЬКИХ ЛИМАНІВ

**Іваниця В.О., Васильєва Н.Ю., Штеніков М.Д.,
Лісютін Г.В., Боброва О.Є.**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082, Україна,
тел. (0482) 68 79 64, e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

Анотація

В результаті метагеномного 16S рРНК аналізу визначено таксономічний склад мікробіомів прибережних вод Одеської затоки, акваторії острова Зміїний та причорноморських лиманів і охарактеризовано біологічну різноманітність прокариот основних відділів доменів Bacteria та Archaea. У воді Одеської затоки виявлені прокариоти домену Bacteria, які належать до відділів: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria, Tenericutes, Spirochaetia, Fusobacteria, Thermotogae, Deinococci, Aquificae, Chlorobia, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Deferribacteres, Planctomycetes, Chlamydiae, Acidobacteria, Nitrospirae, Ignavibacteriae, Thermodesulfobacteria, Dictyoglomia, Elusimicrobia, Synergistia, Fibrobacteria, Gemmatimonadetes та відділів домену Archaea - Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Crenarchaeota. У Хаджибейському лимані, Одеській затоці та акваторії о. Зміїний переважали представники відділу Proteobacteria, а в Сухому і Дністровському лиманах - відділу Cyanobacteria. У результаті біоінформатичного функціонального аналізу в загальному прокариотному метагеномі мікробіому води Одеської затоки визначено співвідношення генів, що відповідають за протікання біологічних процесів, кодують інформацію про молекулярні функції молекулярні функції та несуть інформацію про синтез клітинних компонентів.

Ключові слова: Чорне море, Одеська затока, причорноморські лимани, акваторія острова Зміїний, прокариоти, метагеномний аналіз, таксономічна різноманітність

Вступ

Мікроорганізми відіграють важливу роль у морських екосистемах [5, 7]. Проведені дослідження у відкритому океані та прибережних водах [8, 41, 27] допомогли встановити просторовий розподіл прокаріот [38, 41] їх таксономічну різноманітність [36] та роль у біогеохімічних процесах [19]. Мікробіологічні дослідження, проведені у другій половині XX століття, дали перше уявлення про таксономічний склад мікроорганізмів, що населяють прибережні та глибоководні райони Чорного моря [5, 7]. Дослідження мікробіологів Одеського національного університету були фрагментарними та дозволили встановити кількісний склад гетеротрофних бактерій, вивчити окремі групи мікроорганізмів та вплив навколишнього середовища на них [1, 6].

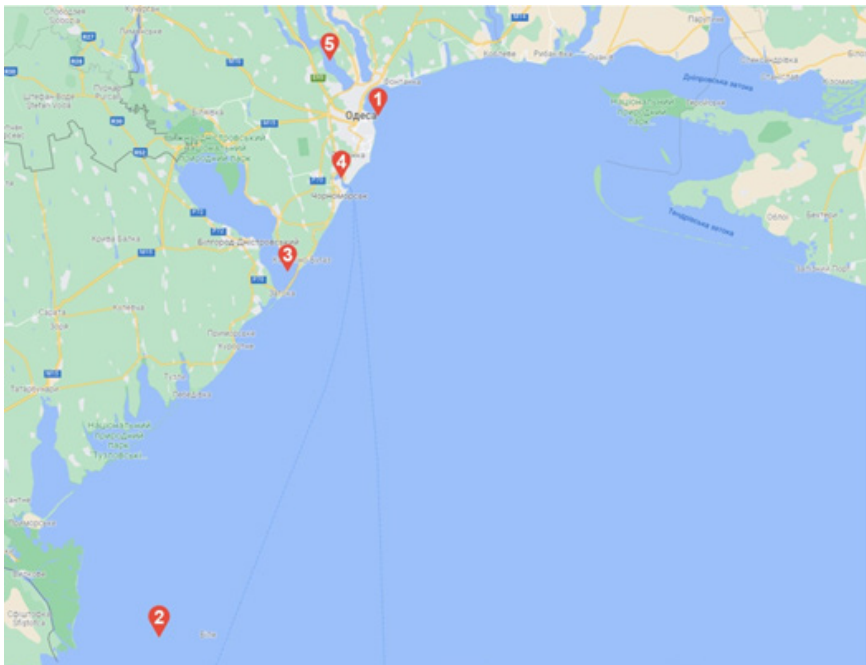
Чорне море це унікальна морська екосистема з багатою мікробною спільнотою, яка впливає на всі біогеохімічні процеси, що відбуваються в поверхневому кисневмісному, проміжному і нижньому безкисневому шарах. Тим не менш, бактеріальна різноманітність Чорного моря ще мало вивчена. Якщо проведені деякі метагеномні дослідження води Чорного моря пролили світло на таксономічний склад морських мікроорганізмів [24, 44], то мікробна різноманітність причорноморських лиманів, які тісно пов'язані з Чорним морем залишається практично невідомою.

Дослідження з використанням класичних методів виділення та вивчення чистих культур мікроорганізмів не дозволяють в повній мірі встановити таксономічний склад морської мікробіоти, оскільки вважається, що тільки близько 1% від існуючих прокаріотів піддаються культивуванню на живильних середовищах [21, 26]. Проведені метагеномні дослідження допомогли сформулювати уявлення про розподіл прокаріотних мікроорганізмів, їх таксономічну різноманітність і функціональний вміст генів [39, 43], а також оцінити їх роль у біогеохімічних процесах [19].

Для більш глибокого розуміння процесів, що протікають у морській екосистемі, важливо знати біологічну різноманітність популяцій представників прокаріотів, які мешкають у цих водах, та їх представництво в загальному мікробіомі.

2.1. Методи дослідження

Проби морської води для дослідження мікробної різноманітності відбирали в трьох повторях в червні 2014 року в районах акваторії острова Зміїний в точці з координатами 45°25'426"N, 30°20'378"E (рис.2.1) та по одній пробі в нижній частині Дністровського (Dnst), Сухого (Sukh) та Хаджибейського (Khad) лиманів в точках з координатами: Khad - 46°54'585"N, 30°65'1366"E, Sukh - 46°35'2112"N, 30°64'7934"E і Dnst - 46°07'3248"N, 30°45'4627"E та гідробіологічної станція ОНУ імені І.І. Мечникова (46°21'495"N, 30°43'223"E). Проби відбирали на глибині один метр від поверхні в стерильні скляні ємності на 750 мл. Відібрані зразки зберігали при -4 °С впродовж до 6 год та фільтрували через мембранні фільтри з діаметром пор 0,22 мкм (Sartorius) для збору мікроорганізмів.



**Рис. 2.1. Карта з позначенням місць відбору проб.
1 - Одеська затока, 2 - Острів Зміїний, 3 - Дністровський лиман,
4 - Сухий лиман, 5 - Хаджибейський лиман**

Нуклеїнові кислоти виділяли з зібраних шляхом фільтрування мікроорганізмів з допомогою Power Water DNA isolation kit (catalog no.14900-50-NF; МО BioLaboratories). Екстракцію ДНК здійснювали відповідно інструкції виробника (МО BioLaboratories). Розміри ізольованої ДНК контролювали з допомогою електрофорезу в 0,8% агарозному гелі.

Дизайн праймерів (табл. 2.1) відповідав протоколу Kozich et al., [30], за модифікацією Капорасо [14] для більш ефективного двостороннього індексування. Праймери Капорасо використовували в проєкті Мікробіом Землі [20]. Праймер Read1 складається з послідовностей pad+linker+16S (F), Read2 – з послідовностей pad+linker+16S (R), Index1 – зворотний комплемент праймера Read2.

ПЛР здійснювали з застосуванням наборів КАРА HiFi HotStart PCR kits (Капа Biosystems). Кожна ПЛР суміш складалась з 0,2 М Trehalose, 5 μ l Fidelity buffer, 0,75 μ l КАРА dNTP mix, 0,3 μ M прямого і зворотного праймера, 0,5 одиниць КАРА HiFi полімерази, біля 25 нг матричної ДНК, і суміш доводили до 25 мкл дейонізованою водою. Умови для теплових циклів були наступними: 95 °C - 3 хв, потім 27 циклів при 98 °C - 20 сек, 61 °C - 10 сек, і 72 °C - 15 сек. Фінальна елонгація продовжувалась 5 хв при 72 °C.

ПЛР продукти очищали, використовуючи AMPure XP магнітні кульки. Кількість очищеної ДНК визначали флуориметрично з використанням набору Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit і портативного флуориметра. Далі готували еквімолярну суміш із очищених ПЛР продуктів для того, щоб отримати рівний вміст із кожного зразка. В суміш для секвенування також включали пустий бланк екстракції (проба негативного контролю) із набору Power Water DNA isolation kit. Кінцевий пул отриманої бібліотеки 16S rRNA клонів оцінювали кількісно з використанням КАРА Universal qPCR kit.

Секвенування здійснювали на платформі Illumina MiSeq з використанням набору реагентів v2 (MiSeq Reagent kit v2) з 250 циклами для Read1, 8 циклів для кожного з індекс F і індекс R піків і 250 циклами для Read2.

Таблиця 2.1

Використані праймери

Name	Adapter	Index	Primer pad	Linker	16S primer
SB502 ^(F)	AATGATACGGCGA CCACCGAGATCTACAC	CGTTACTA	TATGGTAATT	GT	GTGCCAGCMGCC GCGGTAA
SB504 ^(F)	AATGATACGGCGACC ACCGAGATCTACAC	TACGAGAC	TATGGTAATT	GT	GTGCCAGCMGCC GCGGTAA
SB505 ^(F)	AATGATACGGCGGAC CACCGAGATCTACAC	ACGTCTCG	TATGGTAATT	GT	GTGCCAGCMGCC GCGGTAA
SB501 ^(F)	CAAGCAGAAAGACG GCATACGAGAT	CTACTATA	TATGGTAATT	GT	GTGCCAGCMGCC GCGGTAA
SB704 ^(R)	CAAGCAGAAAGACG GCATACGAGAT	CATAGAGA	AGTCAGTCAG	CC	GGACTACHVGGG TWTCTAAT

^(F) - Forward primer, ^(R) - Reverse primer

Отримані послідовності після секвенування аналізували з допомогою двох біоінформаційних програм QIIME (Quantative Insights into Microbial Ecology) і SILVAngs. Якість рідів перевіряли з використанням програми FastQC v.0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Для збирання парних кінців рідів, що перекриваються, і генерування зібраних рідів в окремий файл використовували інструмент PEAR [47]. Отримані парні ріди переводили в формат fasta.

На першому етапі біоінформаційний аналіз отриманих нуклеотидних послідовностей здійснювали в програмі SILVAngs [37]. Для другого варіанту аналізу усі маніпуляції виконували в операційній системі Bio-linux7, де першим етапом також була перевірка якості рідів, їх очищення від контамінацій і повторна перевірка якості. Отримані послідовності використовували як вхідні дані для програми QIIME, version 1.8.0 [13]. Для візуалізації результатів використовували додаток MEGAN та інтерактивний візуалізатор Krona (<https://github.com/marbl/Krona/wiki>).

2.2. Мікробна різноманітність прибережних вод о. Зміїний

В результаті секвенування було отримано 80206 сирих послідовностей, які належали досліджуваним зразкам ZM1, ZM2, ZM3 проб морської води. Демультіплексування було виконано автоматично програмою MiSeq Reporter по завершенню секвенування. Усі ріди були анотовані до своїх зразків у відповідності з унікальною індексною послідовністю для кожного зразка. Якість послідовностей перевіряли в програмі Fastqc, очищали від адаптерів, праймерів і ділянок, що часто повторювалися, після чого проводили повторний контроль їх якості. В підсумку було отримано 79748 послідовностей, які були використані як вхідні дані для біоінформатичного аналізу.

У результаті аналізу в програмі SILVAngs класифіковано 99,11% усіх послідовностей з використанням референсної бази даних Silva і лише 0,82% послідовностей були ідентифіковані як “no relative”.

Для аналізу в програмі QIIME використали стратегію зборки *de novo*. На підставі ідентичності послідовностей очищені ріди були згруповані в операційні таксономічні одиниці (ОТО) з по-

рогом подібності на рівні 97% [32]. Більша частина послідовностей (99,8%) була класифікована в результаті роботи в QIIME, а 0,2% послідовностей не мало ніяких гомологів. У порівнянні з аналізом SILVAngs використання QIIME дозволило класифікувати отримані ОТО до рівня роду.

На рисунку 2.2 наведено альфа-різноманітність (тобто індекс видового багатства) в досліджуваних зразках, отриманих в результаті роботи в QIIME. Видове багатство залежить від обсягу вибірки, тому для порівняння вибірок, нерівних за чисельністю, застосовується метод розрідження (rarefaction) — перерахунок кількості видів на заданий (менший, ніж у досліді) обсяг вибірки.

За результатами аналізу отриманих ОТО у SILVAngs та QIIME ідентифікували 10 головних відділів (філіумів) домену Bacteria: Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobiota, Planctomycetes, Tenericutes, SR1, Fusobacteria та Firmicutes (рис. 2.3).

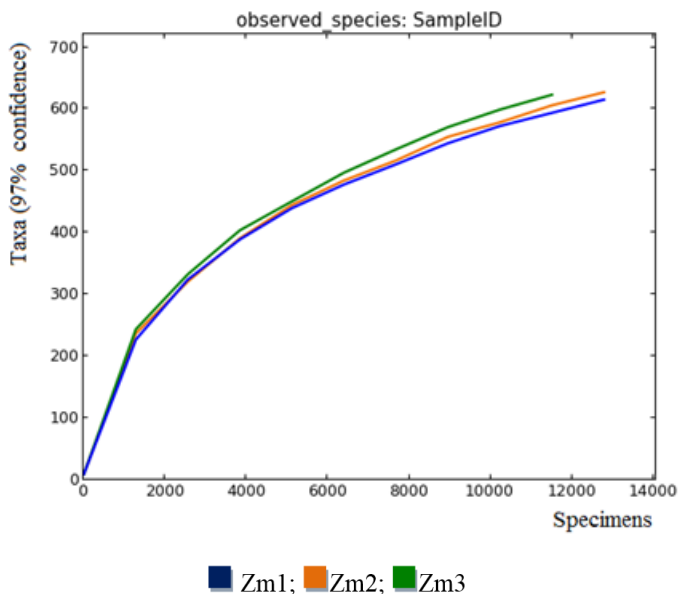


Рис. 2.2. Крива розрідження (rarefaction curve) для аналізу альфа-різноманітності при рівні подібності 97%. Криві показують залежність видового багатства – числа таксонів (taxa) від обсягу вибірки – числа ОТО (видів)

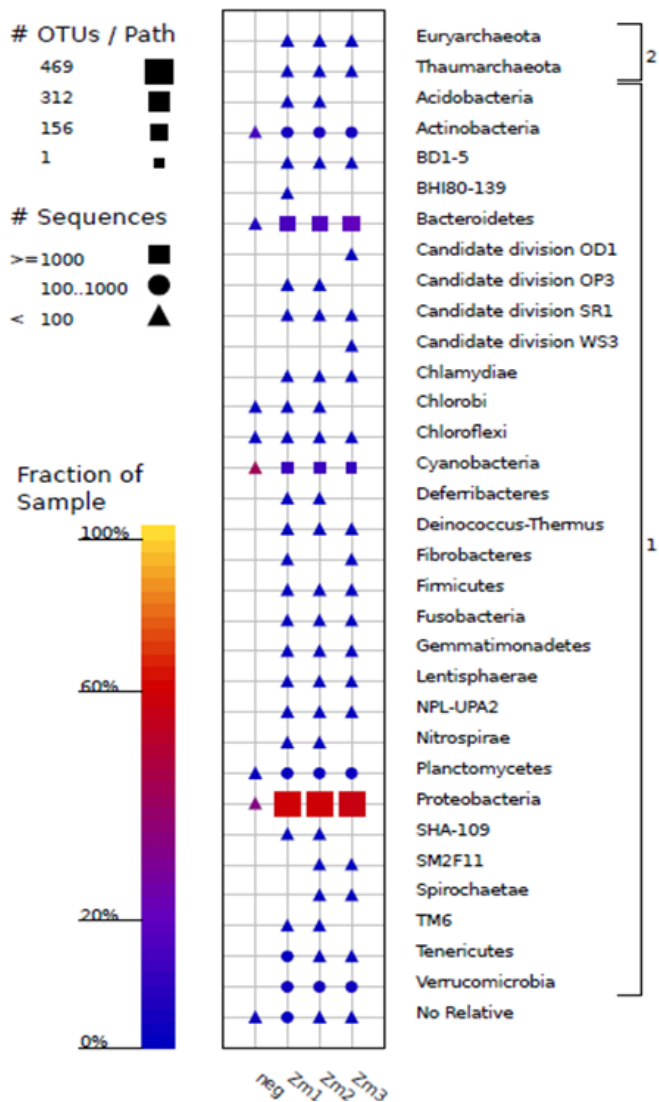


Рис. 2.3. Таксономічний профіль на рівні відділів в прибережних водах острова Зміїний, отриманий у програмі SILVAngs. Графічне представлення частоти послідовностей у досліджуваних зразках вказує на основні відділи виявлені у домену Bacteria

Примітка: Колір символу визначає приблизну частоту таксонів усередині зразка. Розмір символу є кількістю ОТО

На цьому ж рівні були виявлені деякі важливі відмінності в таксономічних розподілах між двома біоінформатичними програмами. Дані, отримані в SILVAngs, вказують на наявність кандидатних відділів, таких як: BD1-5, BHI80-139, OP3, OD1, WS3, NPL-UPA2, SHA-109, SM2F11 та TM6 (рис. 2.3). Всі ці підрозділи були сформовані на основі вивчення даних 16S rRNA у метагеномних дослідженнях зразків різних екологічних ніш. Більшість із цих представників були вперше описані для проб води з Слоустоунського національного заповідника [17].

Програма QIIME дала можливість визначити у досліджуваних зразках лише представників кандидатного відділу CD SR1 (рис. 2.4). Але тут відзначалася група, позначена як “Others”. Вона включає представників, про яких існує занадто мало інформації, або вона відсутня в референсній базі даних Greengenes, або можна припустити, що їх представники знаходяться в дуже малих кількостях. Це можна пояснити тим, що Silva – це база даних для 16S rRNA послідовностей морських зразків, у той час як база даних Greengenes зібрана з інформації інших баз даних і включає достатній набір послідовностей для повного філогенетичного аналізу.

У програмі SILVAngs виявлено невелику кількість послідовностей архей (менше 100 послідовностей). Вони належали до двох класів: Thaumarchaeota та Euryarchaeota (рис. 2.3).

Як видно з таблиці 2.2, найбільш поширеним відділом домену Bacteria є Proteobacteria (51,4% від усіх послідовностей). Найбільш представленими класами серед Proteobacteria були Gammaproteobacteria і Alphaproteobacteria. Вивчені зразки характеризуються відносно низькою кількістю представників інших класів цього відділу, таких як Betaproteobacteria, Epsilonproteobacteria та Deltaproteobacteria.

Другим значно поширеним відділом домену Bacteria виявилися представники Bacteroidetes (17,3%). Ця таксономічна група включає неспоротвірні грамнегативні анаеробні бактерії, які значно поширені в морському середовищі і донних відкладеннях. З цього відділу найбільш представленими є члени класів Flavobacteria та Sphingobacteria.

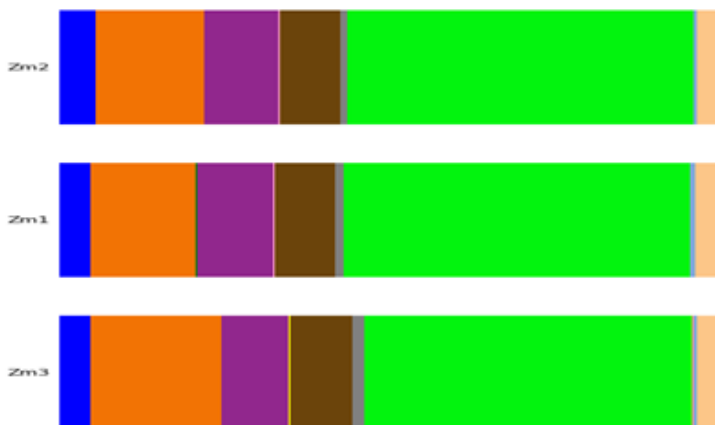


Рис. 2.4. Таксономічний склад філогенетичних груп на рівні відділів в прибережних водах острова Зміїний, визначених у QIIME

Примітка: позначення назв відділів дивись у Таблиці 2.2

Таблиця 2.2

Кількісний розподіл представників відділів домену Bacteria на рівні відділів в прибережних водах острова Зміїний

Легенда	Відділ домену Bacteria	Total %	*Zm 1, %	*Zm 2, %	*Zm 3, %
	Proteobacteria	45.4	52.4	52.3	49.6
	Bacteroidetes	14.4	15.9	16.2	19.7
	Cyanobacteria	18.9	11.6	11.3	10.4
	Actinobacteria	7.8	4.9	5.7	4.8
	Verrucomicrobia	2.7	3.7	3.4	3.4
	Planctomycetes	1.1	1.3	1.2	1.8
	Tenericutes	0.5	0.8	0.5	0.6
	SR1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Fusobacteria	0.1	0.1	0.1	0.0
	Firmicutes	0.0	0.0	0.1	0.0
	Other	9.0	9.2	9.1	9.4

Бактерії відділу *Cyanobacteria*, відомі як типові морські мешканці, представлені у кількості 11,1% від усіх виявлених послідовностей.

У досліджуваному районі представники відділу *Actinobacteria* склали 5,1% від усієї різноманітності прокаріотів. У цьому відділі найбільш численними були бактерії порядку *Actinomycetales*, добре відомі як продуценти антибіотиків.

Бактерії відділу *Verrucomicrobia* виявлено у кількості 3,5% від загальної кількості ОТО. Цей відділ характеризується представниками водних та ґрунтових ніш проживання. Найбільш поширеними серед цього відділу у досліджених зразках були бактерії порядків *Opitutales* та *Verrucomicrobiales*.

Відділ *Planctomycetes* представлений 1,4% від усієї бактеріальної різноманітності. Ці види колонізують солоні та прісні водойми.

Аналіз отриманих послідовностей QIIME дозволив провести ідентифікацію до рівня роду. У ході цього аналізу було використано програму MEGAN, що дозволило наочно візуалізувати отримані результати. Рисунок 2.5 ілюструє так звані таксономічні хмари для зразків Zm1, Zm2 та Zm3. Розмір шрифту у яких відображає рівень бактеріального розподілу представників зазначеної групи у зразках.

Як видно з рисунку 2.4, крім відділів *Bacteroidetes* і *Actinobacter* (описаних вище), широко представлені члени роду *Pseudoalteromonas* - неспороутворюючі, аеробні, грамнегативні морські бактерії.

У досліджуваних зразках виявлені представники роду *Vibrio*, які зазвичай живуть у морській воді і є факультативними анаеробами. Такі роди як *Marivita*, *Loktanella* та *Parasoccus* є представниками родини *Rhodobacteraceae*. Члени цієї родини виявлені у прибережних водах Атлантичного та Тихого океанів [9]. *Rhodobacterales* також відомі здатністю до фотосинтезу.

Рисунок 2.5 демонструє високий вміст представників роду *Haliea* у досліджуваних зразках. Із літератури дуже мало відомо про цей рід. Це аеробні, грамнегативні бактерії, які були виділені з поверхневих прибережних вод Середземного моря [42].

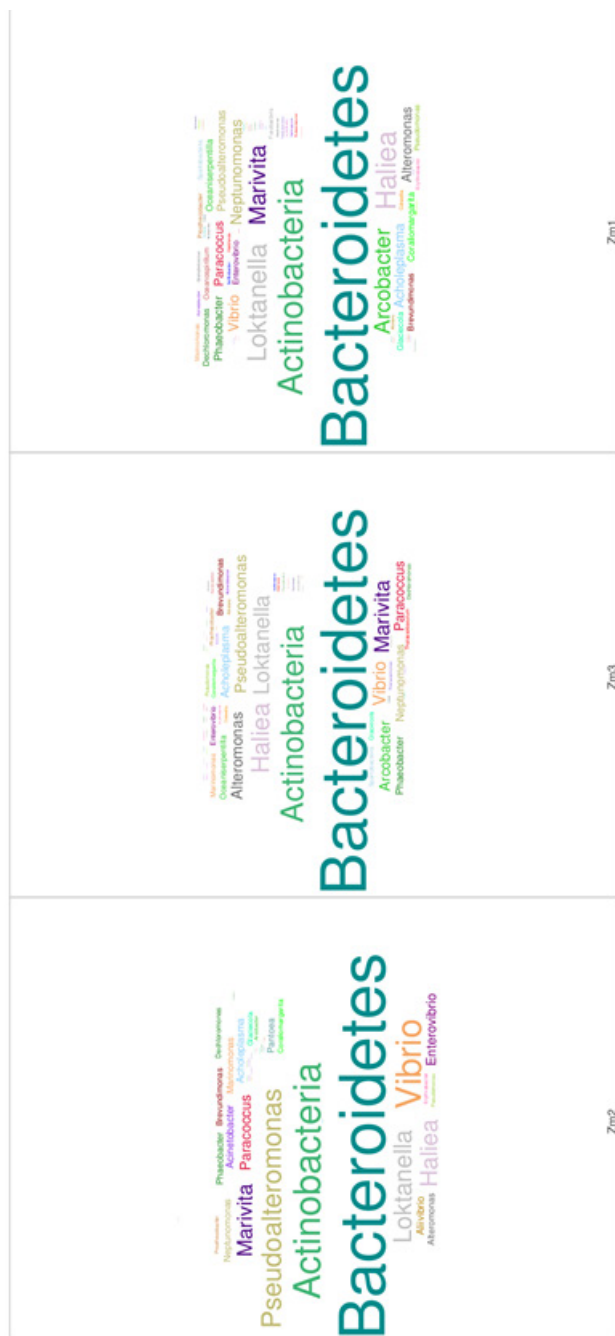


Рис. 2.5. Хмарні графіки, що показують кількісний розподіл таксономічної різноманітності в прибережних водах острова Зміїний

Члени роду *Acrobacter*, що виявлені у зразках Zm1 та Zm3, є грамнегативними, спіралеподібними бактеріями родини *Campylobacteraceae*, які займають широкий спектр екологічних ніш.

Серед інших представників таксономічних родів в незначній кількості виявлено *Lutibacter*, *Robigininales*, *Tenacibaculum*, *Wino-gradskyella*, *Lewinella*, *Bacillariophyta*, *Cryptomonadaceae*, *Rhodopirellula*, *Brevundimonas*, *Maricaulis*, *Phaeobacter*, *Erythrobacter*, *Prostheco bacter*, *Spartobacteria*, *Coraliomargarita*, *Acholeplasma*, *SR1*, *Enterovibrio*, *Aliivibrio*, *Pseudomonas*, *Oceanospirillum*, *Oceaniserpentilla*, *Neptunomonas*, *Marinomonas*, *Umboniibacter* та інші.

За підсумками проведеної роботи в софті QIIME отримано файл формату біом (*Biological Observation Matrix*) з картою всіх виявлених ОТО. Цей файл використаний для візуалізації філогенії у програмі MEGAN. Рисунок 2.6 ілюструє філогенетичне дерево, на якому відображена спорідненість між усіма ОТО досліджуваних зразків, та демонструє, що мікробіота досліджуваної води є багатогою та різноманітною.

Таким чином, в результаті метагеномного 16S рРНК аналізу описано різноманітність бактеріальних популяцій, що мешкають у поверхневих водах острова Зміїний. Було отримано приблизно 3200 ОТО у досліджуваних морських пробах. Виявлено 10 основних відділів домену *Bacteria*: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetes*, *Tenericutes*, *SR1*, *Fusobacteria* та *Firmicutes*. Серед них визначені домінуючі класи, такі як *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Flavobacteria*, *Actinobacteria*, *Sphingobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Opitutae*, *Planctomycetacia*, *Epsilonproteobacteria*, *Verrucomicrobiae*, *Mollicutes*.

Більшість вивчених бактеріальних представників відносяться до порядків *Flavobacteriales*, *Alteromonadales*, *Rhodobacterales*, *Actinomycetales*, *Acidimicrobiales*, *Sphingobacteriales*, *Pseudomonadales*, *Rhodospirillales*, *Planctomycetales*, *Vibrionales*, *Puniceicoccales* та інших.

В результаті таксономічного аналізу ідентифіковано багату різноманітність родин та родів. Найбільш представленими родами у досліджуваних зразках були: *Marivita*, *Loktanella*, *Paracoccus*,

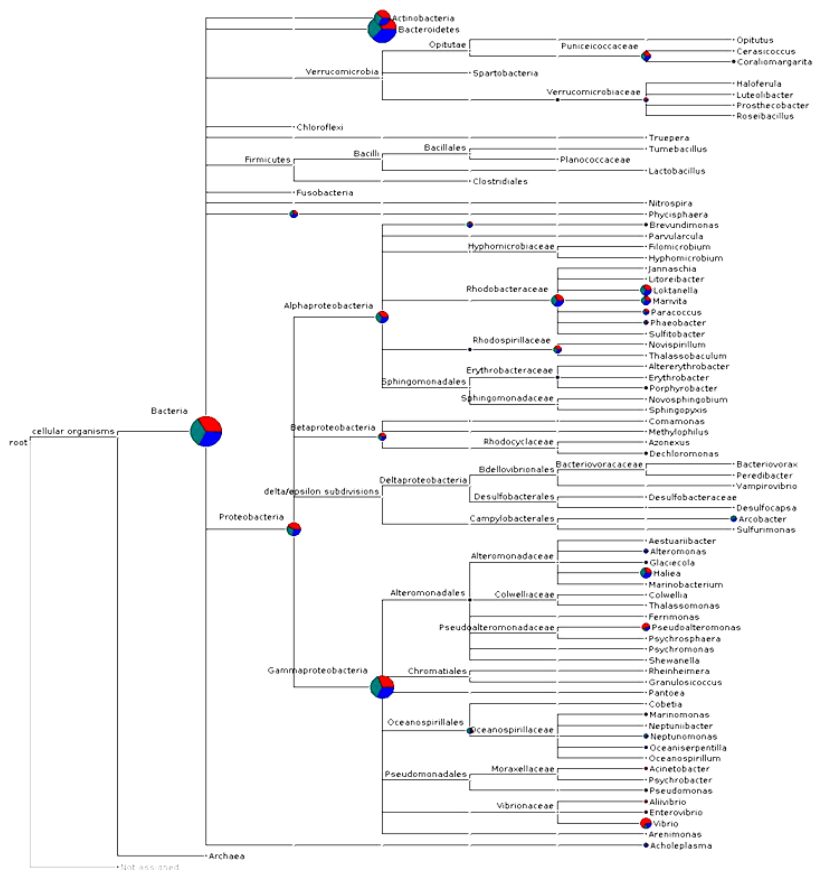


Рис. 2.6. Філогенетичне дерево в формі кладограми, що відображає родову приналежність ідентифікованих ОТО в прибережних водах острова Зміїний

Pseudoalteromonas, Vibrio, Coraliomargarita, Acholeplasma, Pseudomonas, Phaeobacter, Neptunomonas, Allivibrio, Oceaniserpentilla, Oceanospirillum, Roligin.

Результати аналізів SILVAngs та QIIME збігаються та доповнюють один одного. Так, за допомогою SILVAngs були визначені додатково послідовності, що належать до двох класів домену архей - Thaumarchaeota та Euryarchaeota.

2.3. Мікробна різноманітність у воді причорноморських лиманів

У результаті проведених досліджень з ДНК досліджуваних зразків води лиманів Хаджибейський лиман (Khad), Сухий лиман (Sukh) та Дністровський лиман (Dnstr) після очищення отримано 57 970 послідовностей. Після завершення секвенування демультіплексування було зроблено програмним забезпеченням MiSeq Reporter. Всі отримані послідовності 16S рРНК прокласифіковані в Ribosomal Data Project-класифікаторі QIIME.

Ідентифікацію послідовностей здійснено до рівня роду. Проте розбіжності у складі бактеріальних співтовариств досліджуваних лиманів помітні вже на таксономічному рівні відділу (рис. 2.7).

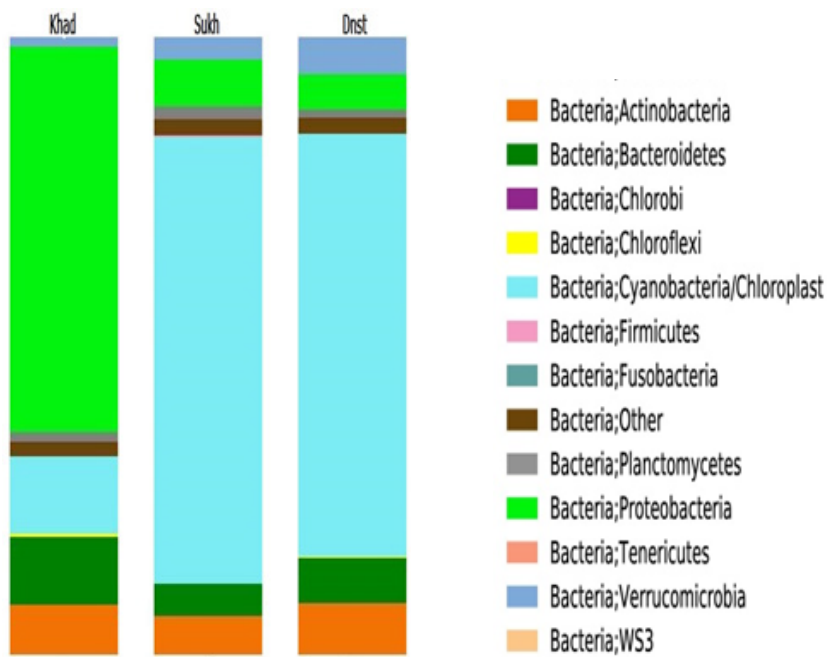


Рис. 2.7. Таксономічний склад філогенетичних груп на рівні відділів в воді причорноморських лиманів, визначених у QIIME

Примітка: Khad – Хаджибейський лиман, Sukh – Сухий лиман, Dnstr – Дністровський лиман

Так, більшість бактеріальних послідовностей, виявлених у воді Сухого (Sukh) і Дністровського (Dnstr) лиманів належали до відділу Cyanobacteria (72,2% і 68,0%, відповідно) на відміну від зразка Хаджибейського (Khad) лиману, де значно переважали представники відділу Proteobacteria (62,4%), і лише 12,6% послідовностей були віднесені до відділу Cyanobacteria, у той час як Proteobacteria склали 7,4% від усіх послідовностей в пробі Sukh і 5,7% – Dnstr. За домінуючим відділом у зразках всіх лиманів стоять представники відділів Bacteroidetes (Khad – 11,1%, Sukh – 5,1%, Dnstr – 7,2%), Actinobacteria (Khad – 8,1%, Sukh – 6,3%, Dnstr – 7,2%) 1,6%, Sukh – 3,9%, Dnstr – 6,1%), Planctomycetes (Khad – 1,6%, Sukh – 2,1%, Dnstr – 1,3%).

Більшість послідовностей, ідентифіковані як Proteobacteria, віднесені до класів Gammaproteobacteria (Khad – 45,6%, Sukh – 3,9%, Dnstr – 2,2%) та Alphaproteobacteria (Khad – 10,7%, Sukh – 2,5%, Dnstr – 2,0%). На відміну від цього Betaproteobacteria представлені в основному лише у зразку лиману Хаджибей (5,8%). У воді Сухого та Дністровського лиманів їх вміст становив 0,6%. Відзначено низький вміст представників класу Deltaproteobacteria (0,1% у зразку кожного лиману), а представників Epsilonproteobacteria не було виявлено у досліджуваних зразках.

Аналіз на таксономічному рівні "порядок" (рис. 2.8) показав, що Family II відділу Cyanobacteria склала 67,1% і 65,9% у зразках Sukh і Dnstr, відповідно, і 0,2% для Khad. У той же час у Khad домінували представники порядку Pseudomonadales (43,8%). Представники цього порядку були виявлені у малих кількостях у воді Сухого та Дністровського лиманів (2,2% та 0,2%, відповідно). За цими домінуючими порядками розташувалися порядки Rhodobacterales (Khad – 8,2%, Sukh – 2,0%, Dnstr – 2,2%), Flavobacteriales (Khad – 8,6%, Sukh – 3,0%, Dnstr – 5,5%), Actinomycetales – 4,7%, Dnstr – 4,6%), Acidimicrobiales (Khad – 2,4%, Sukh – 1,0%, Dnstr – 2,9%), Planctomycetales (Khad – 1,6%, Sukh – 2,1%, Dnstr – 1,3%), Burkholder (Khad – 5,5%, Sukh – 0,1%, Dnstr – 0,1%), та члени класу Spartobacteria (Khad – 0,9%, Sukh – 1,9%, Dnstr – 5,3%).

На діаграмах (рис. 2.9) показані найбільш представ-

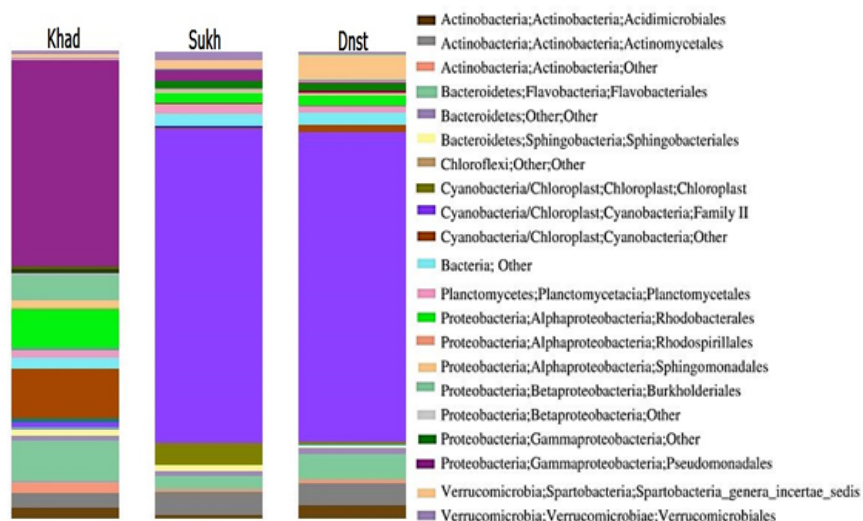


Рис. 2.8. Таксономічний розподіл філогенетичних груп на рівні порядку в воді причорноморських лиманів, визначених у QIIME

Примітка: Khad - Хаджибейський, Sukh – Сухий лиман,
Dnstr – Дністровський лиман

лені роди, ідентифіковані у досліджуваних зразках лиманів. У Хаджибейском лимані виявлено домінування таких бактерій, як *Acinetobacter*, *Actinobacteria*, *Rhodobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Marivita*, *Phaeobacter*, представники родини *Comamonadaceae* та ін. У воді Сухого та Дністровського лиманів переважали представники відділу *Cyanobacteria* та *Actinobacteria*, роду *Planctomycetes*, *Spartobacteria* та ін. У Сухому лимані також відзначено високий вміст *Bacillariophyta*.

Проведений аналіз альфа-різноманіття описує кількість різних таксонів в досліджуваних зразках води кожного з лиманів. Наведені на рисунку 2.10 графіки свідчать, що кожна проба характеризується високою різноманітністю.

Отримане методом UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) дерево, на підставі аналізу спільноти досліджуваних лиманів, показує, що за різноманітністю прокариот Сухий і Дністровський лимани більш подібні між собою і групуються окремо від Хаджибейського лиману (рис. 2.11).

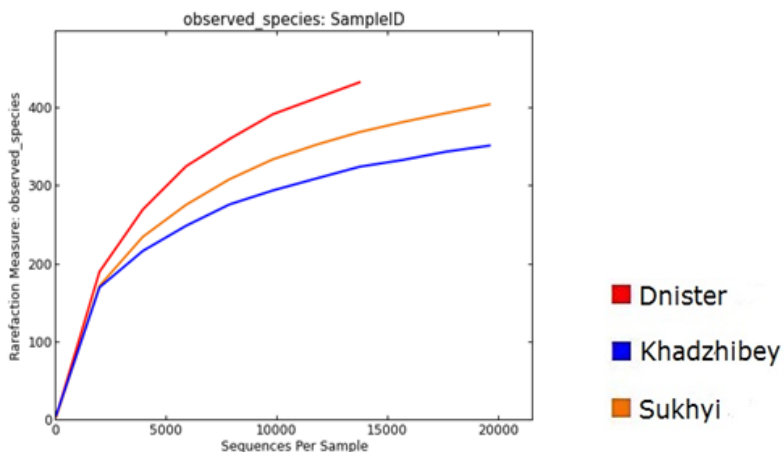


Рис. 2.10. Крива розрідження (rarefaction curve) для аналізу альфа-різноманітності при рівні подібності 97%.
Криві показують залежність видового багатства – числа таксонів (taxa) від обсягу вибірки – числа ОТО (видів)

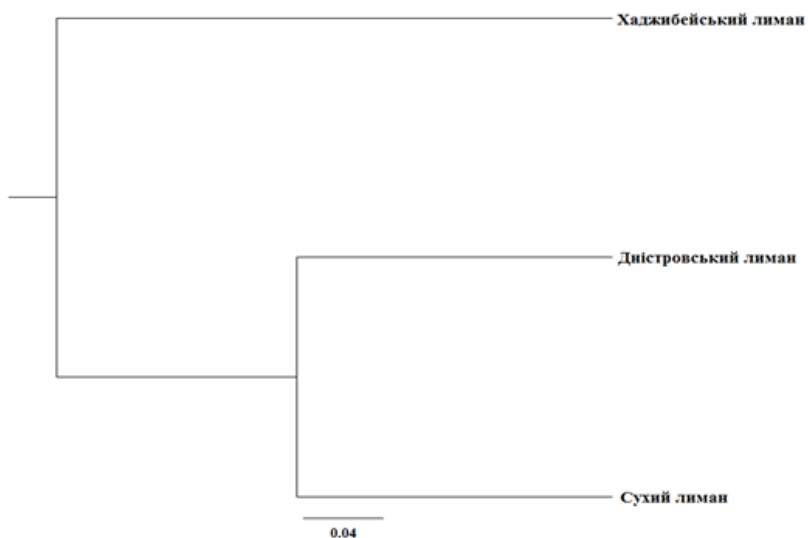


Рис. 2.11. Кластеризація лиманів за різноманітністю прокаріот з використанням методу UPGMA

Аналіз бета-різноманітності, який призначений для порівняння видового складу спільнот різних мікробіомів і оцінюється за показниками подібності між спільнотами, шляхом обчислення умовних дистанцій між спільнотами за методом UniFrac також був виконаний у програмі QIIME. Результати аналізу збігаються з результатами кластеризації за методом UPGMA. Отримана матриця (рис. 2.12) відстаней використана в аналізі головних координат (PCoA - Principal Coordinates Analysis) для візуалізації відмінностей між лиманами.

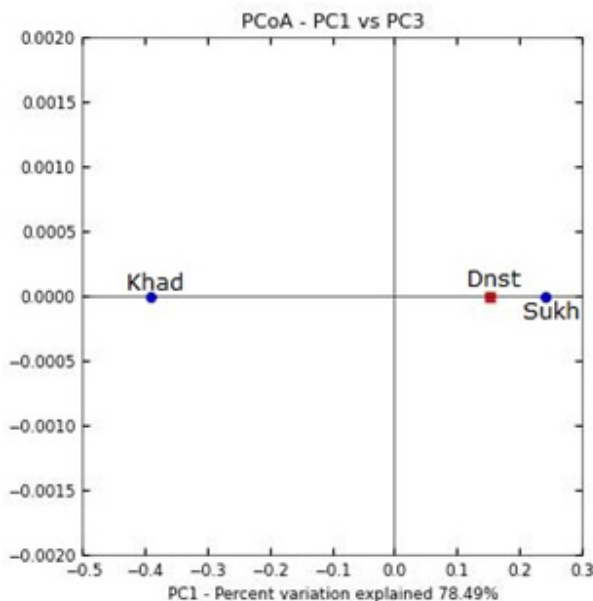


Рис. 2.12. Аналіз головних координат (PCoA) метабеномів причорноморських лиманів на основі матриці відстаней

Примітка: Khad - Хаджибейський, Sukh – Сухий лиман, Dnst – Дністровський лиман; на осі абсцис вказано відсоток загальної дисперсії для PC1

2.4. Мікробна різноманітність в прибережних водах Одеської затоки

У результаті метагеномного аналізу води Одеської затоки Чорного моря в районі Гідробіологічної станції Одеського національного університету імені І.І. Мечникова виявлені представники відділів домену Bacteria: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria, Tenericutes, Spirochaetia, Fusobacteria, Thermotogae, Deinococci, Aquificae, Chlorobia, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Deferribacteres, Planctomycetes, Chlamydiae, Acidobacteria, Nitrospirae, Ignavibacteriae, Thermodesulfobacteria, Dictyoglomia, Elusimicrobia, Synergistia, Fibrobacteria, Gemmatimonadetes та домену Archaea: Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Crenarchaeota, що свідчить про широкий спектр прокаріотних мікроорганізмів у досліджуваній пробі морської води [2].

Слід відмітити, що основні відділи домену Bacteria Одеської затоки були ідентифіковані також шляхом метагеномного аналізу 16S рРНК проб води з акваторії острова Зміїний [12] і проб з чорноморських лиманів [11], але різнилися у кількісному вмісті ідентифікованих послідовностей. Так, в морській воді акваторії острова Зміїний кількість ідентифікованих послідовностей, що були віднесені до відділу Firmicutes, склала лише 0,1% [11], а в морській воді з Одеської затоки в районі Гідробіологічної станції частка ідентифікованих послідовностей відділу Firmicutes склала 5,0% (табл. 2.3).

Найбільш поширений відділ Proteobacteria (68,0%) представлений класами Gammaproteobacteria (63,0%) і Alphaproteobacteria (31,0%). Кількість Betaproteobacteria склала 4,0% від усіх послідовностей, а Deltaproteobacteria близько 2,0% (рис. 2.13). Аналогічну картину спостерігали, у воді Чорного моря акваторії острова Зміїний [11]. При дещо меншій загальній кількості представників відділу Proteobacteria (51,4%) найбільш представленими були Gammaproteobacteria і Alphaproteobacteria. За даними Costantino et al [15] в зразках води, зібраних з глибини 20-40 м члени групи Gammaproteobacteria були присутні на усіх глибинних ділянках і представляли собою панівний таксон.

Таблиця 2.3

Кількісний розподіл представників домену *Bacteria* на рівні відділів в воді Одеської затоки

Відділ	N, %	Відділ	N, %
Proteobacteria	68,0	Verrucomicrobia	0,07
Bacteroidetes	19,0	Deferribacteres	0,06
Firmicutes	5,0	Planctomycetes	0,06
Actinobacteria	4,0	Chlamydiae	0,06
Cyanobacteria	2,0	Acidobacteria	0,06
Tenericutes	0,6	Nitrospirae	0,05
Spirochaetia	0,4	Ignavibacteriae	0,05
Fusobacteriia	0,3	Thermodesulfobacteria	0,04
Thermotogae	0,1	Dictyoglomia	0,02
Deinococci	0,1	Elusimicrobia	0,01
Aquifcae	0,09	Synergistia	0,01
Chlorobia	0,09	Fibrobacteria	0,008
Chloroflexi	0,08	Gemmatimonadetes	0,006

Представники класу Betaproteobacteria представлені родинami Burkholderiaceae, Comamonadaceae, Alcaligenaceae, Oxalobacteraceae порядку Burkholderiales.

Серед бактерій класу Deltaproteobacteria визначено порядки Desulfovibrionales, Desulfobacterales і Desulfuromonadales, тобто сульфатредуквальні бактерії, які, як показали Costantino з колегами, переважно зустрічалися на глибинах нижче хемоклину [15].

Серед представників класу Gammaproteobacteria, згідно отриманого нами таксономічному профілювання, ідентифіковані послідовності віднесені до порядків Alteromonadales (родини Pseudomonadaceae і Alteromonadaceae), Pseudomonadales (родини Pseudomonadaceae і Moraxellaceae), Enterobacterales (родини Enterobacteriaceae, Yersiniaceae, Erwiniaceae) та Vibrionales (родина Vibrionaceae).

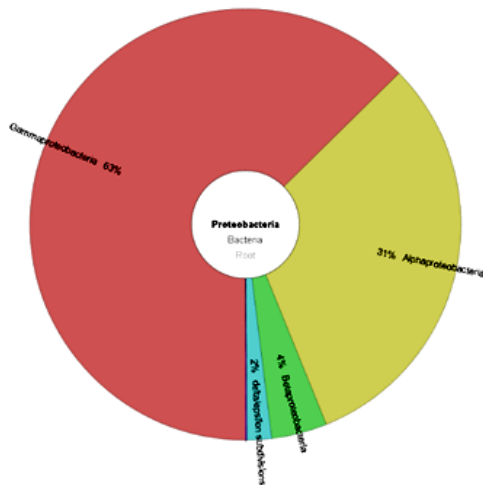


Рис. 2.13. Таксономічний склад бактерій відділу Proteobacteria в воді Одеської затоки

Другим за кількістю представленим відділом домену Bacteria є Bacteroidetes (19,0%). Ця таксономічна група включає неспороутворювальні грамнегативні анаеробні бактерії, які дуже поширені в морському середовищі і донних відкладеннях. Згідно отриманим нами даних, представники класу Flavobacteria найбільш чисельні серед відділу Bacteroidetes (89,0%). Кількість ідентифікованих послідовностей, що віднесені до класів Sphingobacteria, Cytophagia та Bacteroidia була набагато меншою (рис. 2.14), що співпадає з результатами отриманими для води з акваторії острова Зміїний [11].

Чисельність представників відділу Firmicutes (рис. 2.15) була набагато більша ніж в воді акваторії острова Зміїний [4] і складала 5,0%. Серед представників цього відділу ідентифіковані послідовності, що відносяться до порядків Bacillales і Lactobacillales. Порядок Bacillales представлений родинami Bacillaceae, Staphylococcaceae, Paenibacillaceae, Listeriaceae, Planococcaceae, Alicyclobacillaceae, порядок Lactobacillales – родинami Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae, Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Streptococcaceae.

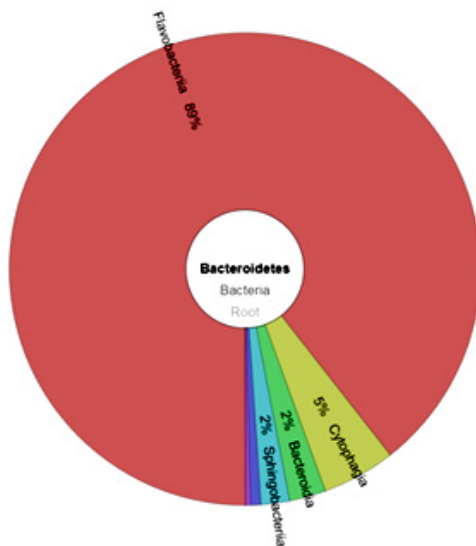


Рис. 2.14. Таксономічний склад бактерій відділу Bacteroidetes в воді Одеської затоки

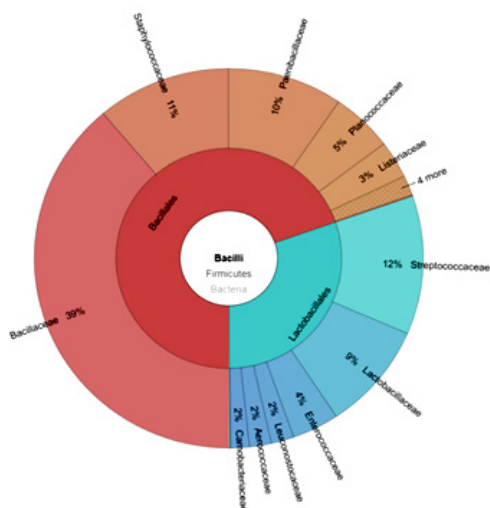


Рис. 2.15. Таксономічний склад бактерій відділу Firmicutes у воді Одеської затоки

Чисельність представників відділу Actinobacteria складала 4% від усіх виявлених послідовностей (рис. 2.16). Серед представників цього відділу ідентифіковані послідовності, що відносяться до порядків Micrococcales (34%), Corynebacteriales (27%), Streptomyetales (13%), Pseudonocardiales (6%), Micromonosporales (4%), Propionibacteriales (3%), Actinomycetales (2%), Streptosporangiales (2%).

Бактерії відділу Cyanobacteria (рис. 2.17), що відомі як типові морські мешканці, складають лише 2,0% від усіх виявлених послідовностей. Найбільш поширеними серед них були члени класів Synechococcales (67,0%) і Oscillatoriophyceae (17,0%). Представники порядків Nostocales, Gloeobacteria та Pleurocapsales присутні у незначній кількості. При цьому, у воді акваторії острова Зміїний кількість представників Cyanobacteria досягали 11,1% від усіх виявлених послідовностей [11].

Досить цікавим є виявлення 0,5% представників домену Archaea (рис. 2.18) у прибережній воді Одеської затоки (відділи Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Crenarchaeota). Thaumarchaeota є хемолітотрофами, здатними окиснювати аміак, присутність якого часто відмічається у глибинних водах [9]. А Euryarchaeota у більшості залежить від кількості та якості органічних поживних ресурсів, що підтверджує їх гетеротрофний (або міксотрофний) тип метаболізму [31]. Crenarchaeota також відносяться до архей, та їх фізіолого-біохімічні властивості більш різноманітні: серед Crenarchaeota є ацидофіли і нейтрофіли, суворі і факультативні анаероби та облигатні аероби, хемолітоавтотрофи і хемоорганотрофи. Вони можуть використовувати сірку у своєму метаболізмі [3].

У рамках програми Єдиний день відбору проб [29] **Ocean Sampling Day (EU MicroB3 project)** 21 червня 2014 р. в Одеській затоці в точці з координатами 46°21'495"N, 30°43'223"E було відібрано 20 л води з глибини один метр від поверхні води. Воду фільтрували через мембранні шприцеві фільтри Sterivex (діаметр пор 0,22 мкм) в лабораторії. Фільтри заморожували та транспортували для подальшого дослідження в сухому льоду. Виділення нуклеїнових кислот та створення бібліотеки клонів здійснювали

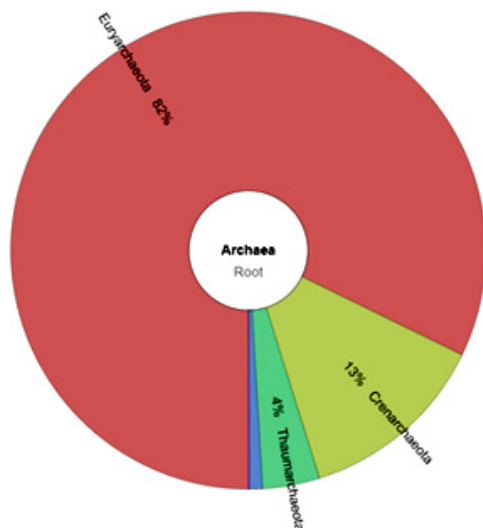


Рис. 2.18. Таксономічний склад відділів домену Archaea в воді Одеської затоки

в лабораторії інституту Макса Планка.(Німеччина), а секвенування з індивідуальними індексами для кожної проби - на платформі Illumina MiSeq в США в лабораторії Argonne National Institute в рамках співпраці по проекту Earth Microbiom Project. Всього в проекті було досліджено проби води з 29 місць Світового океану (рис. 2.19).

Отримані в результаті секвенування послідовності завантажені до бази даних ENA (European Nucleotide Archive) та є відкритими для кожного користувача. Набір даних метабеномного зразка Чорного моря, який було відібрано при виконанні цього проекту має ідентифікатор ERR770983. До серверу MG-RAST набір даних ERR770983 був завантажений 07.10.2016. Він містить 1 375 335 послідовностей загальною кількістю 426 973 699 пар баз із середньою довжиною 310 пар нуклеотидів. З перевірених послідовностей 81 610 послідовностей (5,93%) не пройшли контроль якості. Дублікатами зчитування виявилось 1 293 725 послідовностей.

За результатами аналізу анотовано 2500 послідовностей, що містять гени рибосомної РНК, 692 404 послідовності, що містять



Рис. 2.19. Карта місць учасників проєкту Ocean Sampling Day (EU MicroB3 project)

передбачені білки з відомими функціями, і 581 743 послідовності, що містять передбачені білки з невідомою функцією.

За функціональною категорією інші анотовані послідовності рекласифіковані за трьома категоріями: біологічний процес, молекулярна функція та клітинний компонент, які ієрархічно організовані за рівнями.

На рисунку 2.20 наведено таксономічний склад (А), біологічні процеси (Б), молекулярні функції (В), компоненти клітини (Г) мікробіоти Одеської затоки в районі Гідробіологічної станції станом на червень 2014 р.. Метагеномний аналіз виявив 8 основних відділів серед домену Bacteria, а саме (рис. 2.20 А): *Proteobacteria* (40,4%), *Unassigned* (20,4%), *Cyanobacteria* (18,3%), *Bacteroidetes* (8,13%), *Actinobacteria* (5,35%), *Verrucomicrobia* (4,26%), *Firmicutes* (1,88%), *Planctomycetes* (0,69%), *Acidobacteria* (0,2%) [29].

У результаті біоінформатичного функціонального аналізу в загальному прокаріотному метагеномі мікробіому води Одеської затоки в районі Гідробіологічної станції встановлено,

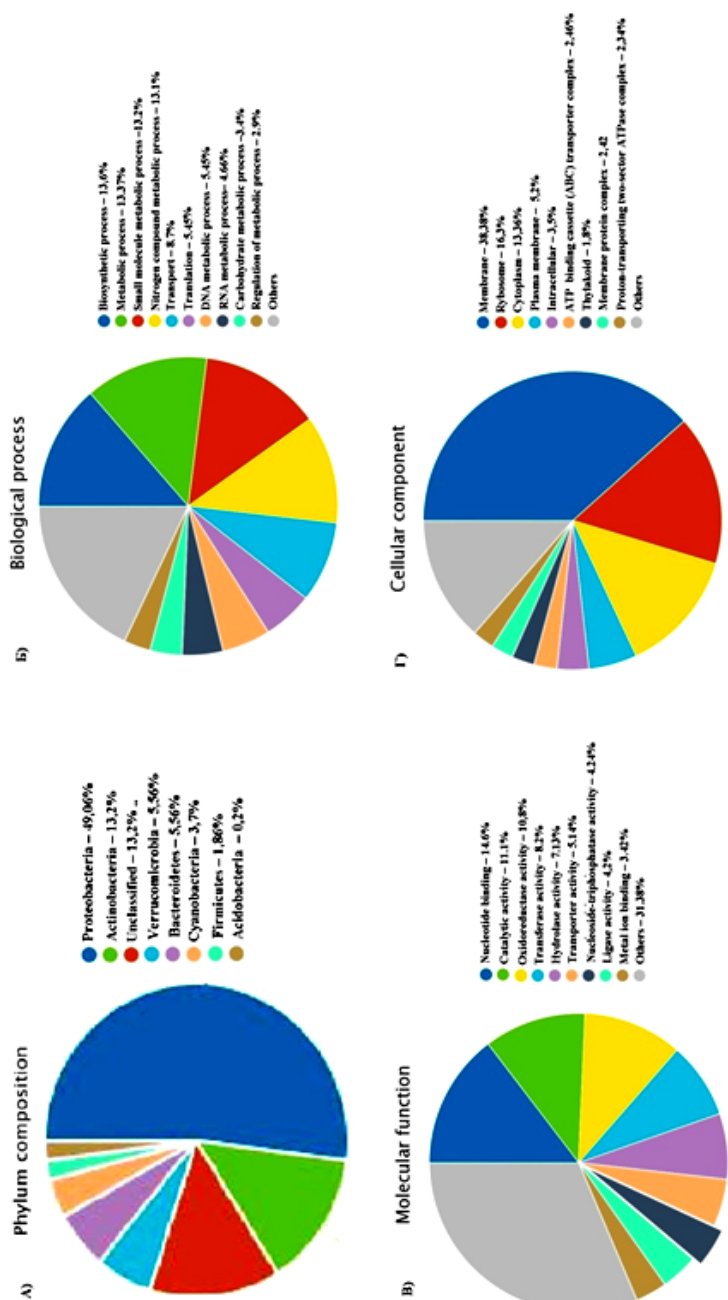


Рис. 2.20. Таксономічний склад (А), біологічні процеси (Б), молекулярні функції (В), компоненти клітини (Г) мікробіоти Одеської затоки в районі Гідробіологічної станції станом на червень 2014 р.

що більшість генів загального геному відповідальні за процеси метаболізму азотних сполук (Nitrogen compound metabolic process) – 15,8%, біосинтетичні процеси (Biosynthetic process) – 14,8%, окисно-відновні метаболічні процеси (Oxidation-reduction metabolic process) – 8,8% та процеси метаболізму малих молекул (Small molecule metabolic process) – 8,7 (рис. 2.20 Б).

Серед генів загального геному, що кодують інформацію про молекулярні функції максимальна кількість відповідає за зв'язування нуклеотидів (Nucleotide binding) – 13,2%, гідролазну активність (Hydrolase activity) – 11,2%, оксидоредуктазну активність (Oxidoreductase activity) – 10,8%, трансферазну активність (Transferase activity) – 10,3%, зв'язування кофактору (Cofactor binding) – 5,9%. За транспортну активність (Transporter activity) відповідає 4,1%, а за АТФазну активність (ATPase activity) – 2,6% (рис. 2.20 В).

Серед групи генів, що несуть інформацію про синтез клітинних компонентів, виявлено наступний розподіл: мембрана (Membrane) - 56,3%, цитоплазма (Cytoplasm) – 21,2%, рибосома (Ribosome) – 9,8%, двокомпонентний АТФазний комплекс, що транспортує протони (Proton-transporting two-sector ATPase complex) - 2% (рис. 2.20 Г).

Обговорення

Як видно з рисунку 2.21 таксономічна різноманітність прокаріотної спільноти води Хаджибейського лиману [12], акваторії острова Зміїний Чорного моря [11] та прибережної частини Одеської затоки подібні між собою. Різниця для цих акваторій більш виражена у кількісному вимірі ніж у таксономічному і проявляється вже на рівні відділів.

В результаті метагеномного 16S рРНК аналізу в прибережних водах острова Зміїний визначено близько 3200 ОТО. Виявлені основні відділи домену Bacteria: Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobiota, Planctomycetes, Tenericutes, Fusobacteria, Firmicutes і кандидатні відділи некультивованих представників прокаріот: SR1, BD1-5, BH180-139, OP3, OD1, WS3, NPL-UPA2, SHA-109, SM2F11 та TM6. В результаті таксономічного аналізу ідентифіковано багато бактеріальних родин

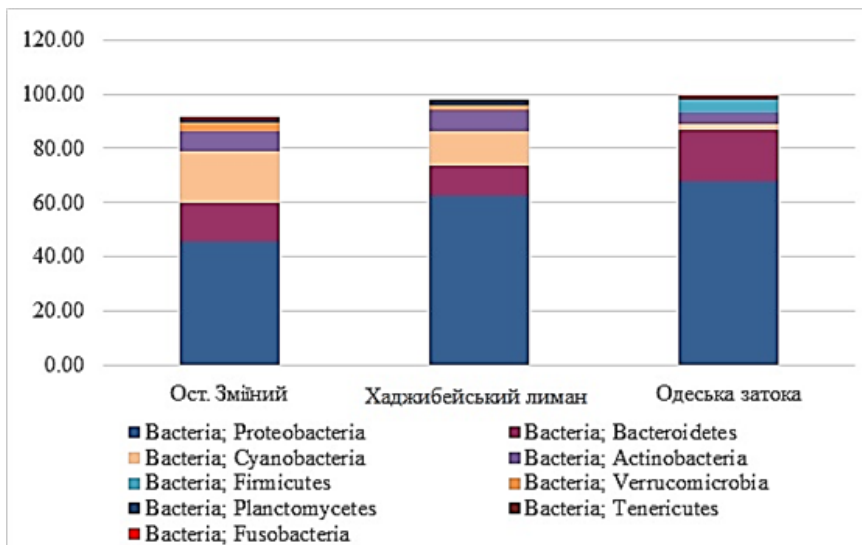


Рис. 2.21. Біологічна різноманітність прокаріот води акваторій острова Змійний, Хаджибейського лиману та Одеської затоки Чорного моря

і родів. Найбільш представленими родами серед досліджуваних зразків були *Marivita*, *Loktanella*, *Paracoccus*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Coralimargarita*, *Acholeplasma*, *Pseudomonas*, *Phaeobacter*, *Neptunomonas*, *Allivibrio*, *Oceaniserpentilla*, *Oceanospirillum*, *Robiginitalea*, *Acinetobacter*, *Haliea*.

Результати досліджень показують, що мікробні спільноти причорноморських Сухого, Дністровського та Хаджибейського лиманів різноманітні та численні. Склад домінуючих відділів (філіумів) у воді Дністровського, Сухого та Хаджибейського лиманів відрізняється. У Хаджибейском лимані переважали представники відділів Proteobacteria, де Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria і Betaproteobacteria були найбільш представленими класами. Аналогічні результати показані нами для води в районі острова Змійний [11], де було відзначено таке ж співвідношення домінуючих філіумів та його класів. Розподіл домінуючих відділів та класів у Хаджибейському лимані дуже схожий з результатами досліджень Саргасового моря [43], а також лиману

Changjiang у Китаї [22] з однією лише різницею, що там найбільш представленими були класи Beta- і Gammaproteobacteria. Незважаючи на низьку солоність Хаджибейський лиман все ж таки характеризується переважанням класу Alphaproteobacteria, у той час як у прісних водоймах переважають Betaproteobacteria.

Сухий та Дністровський лимани характеризувались переважанням представників відділу Cyanobacteria. Ці мікроорганізми зазвичай домінують у прісноводних водоймах. Вважається, що потепління клімату призводить до збільшення їх чисельності у водосховищах Європи [35]. Антропогенний вплив також може бути одним із факторів, що впливає на збільшення популяцій Cyanobacteria у морському середовищі.

Представники відділу Bacteroidetes виявлені у всіх трьох лиманах приблизно в рівних кількостях з домінуючим родом Flavobacteria. У водних середовищах деякі представники Bacteroidetes зазвичай живуть у симбіозі з водоростями. Аналогічний розподіл Bacteroidetes та його домінуючого роду Flavobacteria було виявлено при вивченні Саргасового моря [43]. На відміну від наших результатів у Саргасовому морі також спостерігали високий вміст бактерій роду Bacteroides, які об'єднані в один відділ CFB (Cytophaga, Flavobacterium, Bacteroides). У пробах лиманів представників Bacteroides не виявлено.

Зразки всіх трьох лиманів характеризувалися відносно високим вмістом представників Planctomycetes. Цей відділ включає відомих анаеробних аміак-окиснюючих бактерій (Annamoxbacteria), які частіше зустрічаються в осадових пробах, ніж як планктонні форми в поверхневих водах. Ці дані співпадають із попередніми дослідженнями Чорного моря, проведеними Kirkpatrick et al. [28] та Fuchsman et al. [23]. Представники Planctomycetes також були виявлені у воді біля острова Зміїний [11], однак у меншій кількості.

Члени класу Spartobacteria також виявились поширеними серед усіх досліджуваних проб. Ці бактерії відносяться до відділу Verrucomicrobia і є одним з найчисленніших представників у ґрунтовому середовищі [10]. Їх важко культивувати і, як наслідок, вони слабо представлені у базах даних. Verrucomicrobiae переважали у пробах осадів у лимані Changjiang [22]. Незважаючи на

це, нещодавно було зазначено, що ці мікроорганізми численні і у водній товщі морських водойм [23].

Більшість виявлених бактерій є типовими мешканцями морських середовищ, проте для близько 2.5% членів мікробних популяцій досліджуваних лиманів, позначених як “Others”, жодних родичів не встановлено. Ця група включає представників, про яких існує дуже мало інформації або вона зовсім відсутня в референсній базі даних Greengenes (<http://greengenes.secondgenome.com>). Можливо, використання іншої референсної бази, такої як Silva, допоможе проідентифікувати частину морських мікроорганізмів, що потрапили в цю групу, оскільки Silva спеціалізується на генних послідовностях морських зразків 16S rRNA, оскільки Greengenes зібрана з інформації інших баз даних і включає достатній набір послідовностей для повнішого філогенетичного аналізу [32].

Відмінності в прокаріотних популяціях між лиманами Хаджибей, Сухий та Дністровський були показані шляхом побудови UPGMA дерева та аналізом бета-різноманітності. Ймовірно, солоність є одним з головних факторів у бактеріальній різноманітності водойм [40]. У нашому дослідженні показано, що зразок Хаджибейського лиману з низьким показником солоності (5.5‰) кластеризується окремо від інших лиманів з вищим (Sukh - 10.0‰, Dnst 13.0‰) показником солоності [46]. Важливими факторами, що впливають на біологічну різноманітність мікроорганізмів, також може бути зв'язок з морем, надходження прісної води з річок у лимани Sukh і Dnst та ізоляція лиману Хаджибей від Чорного моря.

Результати проведеного дослідження та метагеномний аналіз, дають комплексну інформацію про біологічну різноманітність мікроорганізмів у акваторіях острова Змейний і причорноморських лиманів. Встановлено, що більшість із певних груп бактерій є типовими представниками морського середовища. Багато з них слабо вивчені і ще не піддаються культивуванню. Отримані результати відповідають літературним даним за схожими морськими дослідженнями [17, 42] і надають більш широку інформацію про склад і чисельність морської мікробіоти в порівнянні з класичними мікробіологічними методами. Проведений метаге-

номний 16S рРНК аналіз дозволив оцінити багату таксономічну різноманітність прокаріот поверхневих вод у досліджених районах акваторій острова Зміїний і причорноморських лиманів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Васильєва Т. В., Іваниця В. О., Васильєва Н. Ю., Бобрешова Н. С., Юргелайтіс Н. Г. Біологічні властивості тіонових бактерій північно-західної частини Чорного моря // Вісник ОНУ. – 2005. – Т. 10, № 3. – С. 123–135.
2. Васильєва Н. Ю., Крилова К. Д., Кристофферсен Й. Б., Дубровіна О. А., Іваниця В. О. Мікробна різноманітність прибережних вод Одеської затоки Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2018. – № 4. – С. 63–75.
3. Воробьева Л. И. Археи. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2007. – 447 с.
4. Іваниця В. О. Стан та мінливість мікробних ценозів морських екосистем: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. К., 1996. – 47 с.
5. Крисс А. Е., Мишустина И. Е., Мицкевич И. Н., Земцова Э. В. Микробное население Мирового океана. – М.: АН СССР, 1964. – 300 с.
6. Лісютін Г. В., Бухтіяров А. Є., Білоіваненко С. О., Пономарьова Л. П., Гудзенко Т. В., Іваниця В. О. Нафтове забруднення і гетеротрофна мікробіота акваторії острова зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – № 1. – С. 88–94.
7. Цыбань А. В. Бактерионейстон и бактериоплактон в прибрежной зоне Черного моря – К.: Наукова думка, 1970. – 272 с.
8. Acinas S. G., Klepac-Ceraj V., Hunt D. E., Pharino C., Ceraj I., Distel D. L., Polz M. F. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community // Nature. – 2004. – V. 430. – P. 551–554.
9. Berg C., Listmann L., Vandieken V., Vogts A., Jurgens K. Chemoautotrophic growth of ammonia-oxidizing Thaumarchaeota enriched from a pelagic redox gradient in the Baltic Sea // Front. Microbiol. – 2015. – V. 15. – P. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2014.00786.

10. Bergmann G. T., Bates S. T., Eilers K. G., Lauber C. L., Caporaso J. G., Walters W., Knight R., Fierer N. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities // *Soil Biol Biochem.* – 2011. – V. 43, № 7. – P. 1450–1455. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.03.012.
11. Bobrova O. E., Kristofferssen J., Ivanytsia V. O. Metagenome 16S rRNA gene analysis of the Black Sea microbial diversity in the region of the Zmiinyi Island // *Microbiology & Biotechnology.* – 2015. – № 2. – P. 6–19.
12. Bobrova O., Kristoffersen J. B., Oulas A., Ivanytsia V. Metagenomic 16s rRNA investigation of microbial communities in the Black Sea estuaries in South-West of Ukraine // *Acta Biochim Pol.* – 2016. – V. 63, № 2. – P. 315–319.
13. Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., Fierer N. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature Methods.* – 2010. – V. 7. – P. 335–336.
14. Caporaso J. G., Lauber C. L., Walters W. A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., Owens S. M., Betley J., Fraser L., Bauer M. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms // *The ISME Journal.* – 2012. – V. 6. – P. 1621–1624.
15. Costantino V., Hiep V. T., Lee J. K. Fingerprinting Microbial Assemblages from the Oxic/Anoxic Chemocline of the Black Sea // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2003. – V. 69, № 11. – P. 6481–6488. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6481-6488.2003>.
16. Cottrell M. T., Mannino A., Kirchman D. L. Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria in the Mid-Atlantic Bight and the North Pacific Gyre // *Applied Environmental Microbiology.* – 2006. – V. 72, № 1. – P. 557–564. doi: 10.1128/AEM.72.1.557-564.2006.
17. Davis J. P., Youssef N. H., Elshahed M. S. Assessment of the Diversity, Abundance and Ecological Distribution of Members of Candidate Division SR1 Reveals a High Level of Phylogenetic Diversity but Limited Morphotypic Diversity // *Applied and*

- Environmental Microbiology. – 2009. – V. 75, № 12. – P. 4139–4148. doi: 10.1128/AEM.00137-09.
18. DeLong E. F., Taylor T. L., Marsh L. T., Preston C. M. Visualization and Enumeration of Marine Planktonic Archaea and Bacteria by Using Polyribonucleotide Probes and Fluorescent In Situ Hybridization // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1999. – V. 65. – P. 5554–5563.
 19. DeLong E. F., Karl D. M. Genomic perspectives in microbial oceanography // *Nature*. – 2005. – V. 437. – P. 336–342.
 20. Gilbert J., Jansson J., Knight R. The Earth Microbiome project: successes and aspirations // *BMC Biology*. – 2014. – V. 12. – P. 1–4. doi:10.1186/s12915-014-0069-1.
 21. Handelsman J., Liles M., Mann D., Riesenfeld C., Goodman R. M. Cloning the metagenome: Culture-independent Access to the Diversity and Functions of the Uncultivated Microbial World // *Methods in Microbiology*. – 2002. – V. 33. – P. 240–252.
 22. Feng B., Li X., Wang J., Hu Z., Meng H., Xiang L., Quan Z. Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2009. – V. 70, № 2. – P. 236–248. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00772.x>.
 23. Freitas S., Hatosy S., Fuhrman J. A., Huse S. M., Welch D. B., Sogin M. L., Martiny A. C. Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia // *ISME J.* – 2012. – V. 6, № 8. – P. 1499–1505.
 24. Fuchsman C. A., Kirkpatrick J. B., Brazelton W. J., Murray J. W., Staley J. T. Metabolic strategies of free-living and aggregate-associated bacterial communities inferred from biologic and chemical profiles in the Black Sea suboxic zone // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2011. – V. 78, № 3. – P. 586–603. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01189.x>.
 25. Fuchsman C. A., Staley J. T., Oakley B. B., Kirkpatrick J. B., Murray J. W. Free-living and aggregate-associated Planctomycetes in the Black Sea // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2012. – V. 80, № 2. – P. 402–416. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01306.x>.

26. Kantor R. S., Wrighton K. C., Handley K. M., Sharon I., Hug L. A., Castelle C. J. et al. Small Genomes and Sparse Metabolisms of Sediment-Associated Bacteria from Four Candidate Phyla // *mBio*. – 2013. – V. 4, № 5. – P. 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00708-13>.
27. Kelly K. M., Chistoserdov A. Y. Phylogenetic analysis of the succession of bacterial communities in the Great South Bay (Long Island) // *FEMS Microbiology Ecology*. – V. 35, № 1. – 2001. – P. 85–95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00791.x>.
28. Kirkpatrick J., Oakley B., Fuchsman C., Srinivasan S., Stanley J. T., Murray J. W. Diversity and Distribution of Planctomycetes and Related Bacteria in the Suboxic Zone of the Black Sea // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72, № 4. – P. 3079–3083. doi: 10.1128/AEM.72.4.3079-3083.2006.
29. Kopf A., Bicak M., Kottmann R., Schnetzer J., Kostadinov I., Lehmann K. et al. The ocean sampling day consortium // *GigaScience*. – 2015. – V. 4, № 1. – P. 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0066-5>.
30. Kozich J. J., Westcott S. L., Baxter N. T., Highlander S. K., Schloss P. D. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 79, № 17. – P. 5112–5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13.
31. Lloyd K. G., Schreiber L., Petersen D. G., Kjeldsen K. U., Lever M. A., Steen A. D. et al. Predominant Archaea in marine sediments degrade detrital proteins // *Nature*. – 2013. – Vol. 496. – P. 215–218. doi: 10.1038/nature12033.
32. Navas-Molina J., Peralta-Sanchez M., Gonzales A., McMurdie P. J., Vazquez-Baeza Y., Xu Z. et al. Advancing Our Understanding of the Human Microbiome Using QIIME // *Methods in Enzymology*. – 2013. – V. 531. – P. 371–444.
33. Nilakanta H., Drews K. L., Firrell S., Foulkes M. A., Jablonski K. A. A review of software for analyzing molecular sequences // *BMC Research Notes*. – 2014. – V. 7. – P. 830–839.

34. Oulas A., Pavludi C., Polymenakou P, Pavlopoulos G., Papanikolaou N., Kotoulas G. et al. Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies // *Bioinformatics and Biology Insights*. – 2015. – V. 9. – P. 75–88.
35. Pitois F., Thoraval I., Baurès E., Thomas O. Geographical Patterns in Cyanobacteria Distribution: Climate Influence at Regional Scale // *Toxins*. – 2014. – V. 6, № 2. – P. 509–522. doi: 10.3390/toxins6020509.
36. Pommier T., Canback L., Riemann N., Bostrom K. H., Simu K., Lundberg P. et al. Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton // *Mol Ecol*. – 2007. – V. 16. – P. 867–880.
37. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – V. 41. – P. 590–596. doi:10.1093/nar/gks1219.
38. Sala M. M., Terrado R., Lovejoy C., Unrein F., Pedros-Alio C. Metabolic diversity of heterotrophic bacterioplankton over winter and spring in the coastal Arctic Ocean // *Environmental Microbiology*. – 2008. – V. 10, № 4. – P. 942–949. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01513.x.
39. Schauer R., Bienhold C., Ramette A., Harder J. Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean // *The ISME Journal*. – 2010. – V. 4. – P. 159–170.
40. Sun T., Yang Z. F., Shen Z. Y., Zhao R. Environmental flows for the Yangtze Estuary based on salinity objectives // *Commun Nonlinear Sci Numer Simul*. – 2009. – V. 14, № 3. – P. 959–971. <https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2007.10.006>.
41. 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)*, HUMMER, 1988. – Nagel P.A. (ed.) US Fish and Wildlife Service, Washington, DC, – 1992. – P. 87–90.

42. Urios L., Intertaglia L., Lesongeur F., Lebaron P. *Haliea rubra* sp. nov., a member of the Gammaproteobacteria from the Mediterranean Sea // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2008. – V. 58, № 5. – P. 1233–1237.
43. Venter J. C., Remington K., Heidelberg J. F., Halpern A. L., Rusch D., Eisen J. A. et al. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea // Science. – 2004. – V. 304. – P. 66–74. doi: 10.1126/science.1093857.
44. Vetriani C., Tran H. V., Kerkhof L. K. Fingerprinting Microbial Assemblages from the Oxic/Anoxic Chemocline of the Black Sea // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – V. 69, № 11. – P. 6481–6488. doi: 10.1128/AEM.69.11.6481-6488.2003.
45. Vieira R., Gonzales A. M., Cardoso A. M., Oliveira D. N., Albano R. M., Clementino M. M. et al. Relationships between bacterial diversity and environmental variables in a tropical marine environment, Rio de Janeiro // Environmental Microbiology. – 2008. – V. 10, № 1. – P. 189–199. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01443.x>
46. Zaycev J., Aleksandrov B., Minicheva G. Eastern-western part of the Black Sea: biology and ecology // Naukova dumka. – 2006. – V. 1. – P. 351–426.
47. Zhang J., Kobert K., Fluori T., Stamatakis A. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-end read merger // Bioinformatics. – 2013. – V. 30, № 5. – P. 614–620. doi: 10.1093/bioinformatics/btt593.

РОЗДІЛ 3. АКТИНОБАКТЕРІЇ ОДЕСЬКОЇ ЗАТОКИ ЧОРНОГО МОРЯ

**Страшнова І.В., Коротаєва Н.В., Васильєва Н.Ю.,
Штеніков М.Д., Потапенко К.С., Лісютін Г.В.,
Чабан М.М., Гудзенко Т.В., Іваниця В.О.**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082, Україна,
тел. (0482) 68 79 64, e-mail: fabiyanska@ukr.net

Анотація

У цьому розділі наведено результати виявлення актиноміцетів в біологічних обростаннях природного черепашнику, бетонних споруд і мідій Одеської затоки Чорного моря та описана таксономічна різноманітність і основні біологічні властивості 53 досліджених штамів. При рості на різних поживних середовищах виділені штами актиноміцетів утворюють субстратний і повітряний міцелії, демонструючи різноманіття морфологічних типів. Деякі штами утворюють водорозчинні і меланоїдні пігменти на відповідних середовищах. Ізольовані актиноміцети ростуть у температурному діапазоні 10 °C - 45 °C. Більшість штамів актиноміцетів добре ростуть у присутності NaCl у концентрації до 9%. Досліджені штами утилізують різні запропоновані джерела вуглецю, демонструючи значну метаболічну активність. Найбільш вживаним субстратом для актиноміцетів із черепашнику є лактоза, для актиноміцетів із бетону – рамноза, для актиноміцетів із мідій – цукроза. Попередня ідентифікація за порівнянням спектрів жирних кислот дозволила встановити, що ізольовані штами актиноміцетів з різними індексами подібності відносяться до родів *Streptomyces* і *Nocardiosis*, із суттєвим домінуванням представників роду *Streptomyces*. У жирнокислотних спектрах досліджених актиноміцетів роду *Streptomyces* присутні ізомери розгалужених насичених і ненасичених жирних кислот із загальною кількістю атомів вуглецю від 10 до 17. Виявлення і виділення актиноміцетів із об'єктів Чорного моря сприятиме подальшому вивченню екологічної ролі цих бактерій в морському середовищі, їх різноманітності, розподілу, умов культи-

вування, еволюційних механізмів пристосування до життя в морі та оцінці біотехнологічного потенціалу до продукції нових біологічно активних метаболітів.

Ключові слова: *актиноміцети, біологічні властивості, Чорне море, Одеська затока, біологічні обростання*

Вступ

Відділ Actinobacteria є одним із найбільших серед 30 основних відділів, які на даний момент визнаються в домені Bacteria. Цей відділ станом на 2016 р. включає 6 класів, 18 порядків, 14 підпорядків, 63 родини та 374 роди (<http://www.bacterio.net/-classifphyla.html#actinobacteria>) [68].

Термін «актиноміцети» використовується для позначення представників порядку Actinomycetales відділу Actinobacteria. Представники актиноміцетів були охарактеризовані як найважливіша група мікроорганізмів у галузі біотехнології, оскільки вони є продуцентами біоактивних вторинних метаболітів для медичного, промислового та сільськогосподарського застосування [9, 16, 54, 62]. Проте дотепер ідентифіковано та досліджено менше 1% актиноміцетів [17].

Із 500 000 природних сполук, отриманих з біологічних джерел, приблизно 70 000 є продуктами мікробного синтезу, з яких 29% належить вторинним метаболітам актиноміцетів. Приблизно 60% антибіотиків, які використовуються, були виділені з актиноміцетів між 1950 і 1970 роками, виключно з роду *Streptomyces* [17].

Однак виникаючі інфекційні захворювання та їх збудники, які характеризуються множинною лікарською стійкістю, стають основною загрозою глобальному здоров'ю [43, 57]. Тому існує нагальна потреба в нових антибіотичних речовинах для боротьби з багатьма хворобами, в тому числі бактеріальними, вірусними, грибковими, раком, імунними системними розладами та ін. [21, 25, 30, 34].

В цьому аспекті перспективним джерелом для виділення мікроорганізмів, здатних продукувати нові активні вторинні метаболіти, є морське середовище [14, 38, 48, 58]. Серед таких

мікроорганізмів особливий інтерес викликають рідкісні актиноміцети, оскільки відомо, що вони продукують хімічно різноманітні сполуки з широким спектром біологічної активності [26, 27, 51, 60, 67, 68].

Морські актиноміцети привертають особливу увагу науковців в останні роки. У ранніх роботах описуються види родів *Actinomyces*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Micromonospora* і *Streptomyces* з морських відкладень [21, 77]. У значної частини цих актиноміцетів виявлено антибіотичну активність, що дозволяє припустити, що морське середовище може бути цікавим джерелом для біорозвідки [42, 72, 75, 81]. Однак існує не безпідставна думка, що морські актинобактерії потрапляють в море з суші і знаходяться там у вигляді метаболічно неактивних спор [18]. Тому вивчення вторинних метаболітів актинобактерій, виділених з моря, часто призводить до виявлення раніше відомих сполук, описаних як метаболіти наземних актиноміцетів [26]. Проте, за даними багатьох авторів, у автохтонних морських актинобактерій метаболіти з новими структурами виявляються досить часто [9, 28, 50, 66]. Так, були описані морські актиноміцети родів *Salinibacterium*, *Serinicoccus* і *Salinispora* [32, 47, 83]. Представники деяких видів цих родів продукують унікальні сполуки, такі як саліноспораміди [29], які проходять клінічні випробування як протипухлинні агенти.

Велика кількість рідкісних актиноміцетів виділена із гідробіонтів, таких як губки, корали, медузи, мідії, риби, морські їжаки водорості, асцидії, актинії, морські огірки та ін. [23, 67, 73, 76].

Незважаючи на те, що актиноміцети можуть бути виділені із різних об'єктів морського середовища, чисельність їх там незначна і більшість із них погано ростуть на поживних середовищах в лабораторних умовах. Більше того, таксономічне положення майже половини колекції актинобактерій морського походження не можна визначити навіть до рівня роду, що підтверджує їх оригінальність [31, 45, 78].

Виявлення і виділення актиноміцетів із об'єктів Чорного моря, яке за еколого-геохімічними особливостями є унікальним, сприятиме вивченню екологічної ролі цих бактерій в морському середовищі, їх різноманітності, розподілу, умов культивування та

еволюційних механізмів пристосування до життя в морі. Ці аспекти біології морських актиноміцетів повинні бути зрозумілі для того, щоб повніше оцінити їх біотехнологічний потенціал до продукції нових біологічно активних метаболітів [5].

3.1. Методи дослідження

Ізоляцію актиноміцетів проводили із зразків природного черепашнику і бетонних поверхонь, зібраних на глибині 0,2-1,0 м, а також із мушлі мідій, зібраних на глибині 5,0-6,0 м, у червні–липні 2020 р. в Одеській затоці Чорного моря в районі Гідробіологічної станції Одеського національного університету імені І.І. Мечникова (Одеса, Україна, 46°27'01''N 30°46'14''E). Матеріалом для дослідження були проби біологічних обростань черепашнику і бетону, що представляли собою наліт із морських біологічних об'єктів і продуктів їх життєдіяльності. Зразки проб збирали шляхом зіскобу стерильним скальпелем біологічного обростання зазначених поверхонь та поміщали у стерильний посуд. Проби обростань черепашнику і бетону, і мушлі мідій поміщали в стерильну морську воду (100 мл) в колбах і гойдали на шейкері (фірми New Brunswick Innova®43, Німеччина) при 28 °C, 150 об/хв, 30 хв. Отримані суспензії в одному варіанті перед посівом прогрівали при температурі 50 °C впродовж 15 хв, в іншому – посів здійснювали без термічної обробки. Для посіву суспензії об'ємом 0,1 мл рівномірно розподіляли по поверхні щільних поживних середовищ [4, 7].

Для ізоляції актиноміцетів використано такі поживні середовища: Гаузе 2, Чапека, Ешбі, крохмаль-аміачний і ґрунтовий аґари [1]. Усі середовища готували на морській воді і добавляли антибіотик налідиксову кислоту у концентрації 10 мг/л для пригнічення росту супутньої мікробіоти. Посіви на усі середовища здійснювали у 3-х повторях. Інкубацію проводили при температурі 28 °C впродовж 14-21 доби.

Про наявність актиноміцетів у досліджуваних пробах свідчило утворення колоній з типовим міцелієм (субстратним і повітряним) або колоній, які мали складчасту поверхню. Також звертали увагу на пігментацію поживного середовища і колоній.

Характерні для актиноміцетів колонії відсівали і субкультивували на середовищах Гаузе 2, вівсяному агарі (ВА) і крохмаль-казеїновому агарі (ККА), доводячи до стану чистої культури. Інкубацію проводили при температурі 28 °С протягом 7-10 діб. Чисті ізоляти зберігали при температурі 4 °С до подальшого використання.

В отриманих ізолятів вивчали низку біологічних властивостей: морфологічні, фізіологічні, біохімічні та хемотаксономічні [3, 4, 7]. Зокрема, морфологію і характер росту досліджували на середовищах м'ясо-пептонний агар (МПА), Гаузе 1, Гаузе 2, ВА, ККА і на середовищах ISP (ISP-1–ISP-7), відповідно до Міжнародного проєкту *Streptomyces* (ISP) [63], протягом 14-21 доби при 28 °С.

Синтез меланоїдних пігментів досліджували на середовищах ISP-6 і ISP-7, культивуючи протягом 14-21 доби при 28 °С.

Морфологію клітин вивчали шляхом мікроскопії фіксованих препаратів, забарвлених водним розчином фуксину (світловий мікроскоп Carl Zeiss Axio, програмне забезпечення Zen 2.3 lite, x1500).

Відношення до хлориду натрію (NaCl) визначали на середовищі МПА, з різними концентраціями NaCl (1,0; 2,0; 5,0; 7,0; 9,0; 12,0; 15,0%%). Інкубацію проводили впродовж 14 діб при 28 °С. Наявність росту реєстрували візуально, оцінюючи як «гарний», «слабкий» чи «відсутність росту» [1].

Утилізацію джерел вуглецю досліджували на мінімальному середовищі ISP 9. Джерелами вуглецю були глюкоза, фруктоза, галактоза, гліцерол, лактоза, ксилоза, рамноза, манітол, сорбітол, маноза, арабіноза та цукроза, які додавали окремо до розплавленого мінімального середовища, що не містило вуглеводів, для отримання кінцевої концентрації 1% і розливали в стерильні чашки Петрі. Після застигання середовищ здійснювали посів досліджуваних ізолятів. Інкубацію проводили протягом 14-21 доби при 28 °С. Ріст штамів оцінювали як «гарний», «слабкий» чи «відсутність росту» [2, 11].

Визначення складу клітинних ліпідів проводили згідно MIS Operating Manual [53, 59] з використанням газового хроматографа Agilent 7890 (Agilent Technologies, США), капілярної колонки

ULTRA 2 (25 м x 0,2 мм x 0,33 мкм) і полум'яно-іонізаційного детектора. Для порівняльного аналізу спектрів жирних кислот за допомогою автоматичної системи ідентифікації Sherlock Microbia Identification System (MIDI Sherlock version 6.2, MIDI Library ACTIN 3.80) [59] актиноміцети вирощували у 20 мл середовища Tryptic soy broth (Merck, Німеччина), струшуючи на шейкері при 28 °C, 150 об/хв упродовж 3 діб. Після цього бульйонні культури фільтрували (діаметр пор фільтрів 0,45 мкм). Приблизно 40 мг відділеної біомаси клітин кожного штаму переносили в скляні віали для екстракції жирних кислот. Виділення та хроматографічне розділення жирних кислот здійснювали згідно стандартного протоколу. Для лізису клітин та омилення ліпідів клітин актиноміцетів використовували 1 мл суміші 1,125 М розчину NaOH у метанолі при температурі 95-100 °C впродовж 30 хв. Подальше метилювання жирних кислот здійснювали додаванням кислого розчину 2 мл 6.0 N HCl у метанолі при 80 °C впродовж 10 хв. Екстраговані метилові ефіри жирних кислот нейтралізували 0,3 М розчином NaOH [59]. Потім для проведення хроматографічного аналізу пробу у кількості 2 мкл вводили в режимі split з коефіцієнтом 40:1, температура випаровувача 250 °C. Розділення проводили в режимі програмування температури: початкова температура 170 °C з наступним градієнтом 5 °C/хв до 270 °C. Вміст жирних кислот виражали у відсотках до загальної суми площ піків. Після цього проводили ідентифікацію досліджуваних штамів [59].

Статистичний аналіз складу жирних кислот проводився з використанням програмного забезпечення MIDI Library Generation System (Microbial ID, Inc., Newark, Del.). Ця програма використовує двовимірний кластерний аналіз. Спорідненість виражається в евклідовій відстані (EDs), як відстань у двовимірному просторі [10].

3.2. Морфологічна характеристика актинобактерій

Із обростань черепашнику було виділено 20 (Lim 2.1, Lim 2.2 ... Lim 12.3), а із обростань бетонних поверхонь 19 (Conc 19, Conc 20 ... Conc 44) ізолятів актинобактерій [7]. У свою чергу, із проб мідій виділено 14 актиноміцетних ізоляти (Myt 1, Myt 2 ... Myt 12b) [4].

У всіх випадках для ізоляції актиноміцетів із морських об'єктів найкращим середовищем із використаних виявилось органічне середовище Гаузе 2. На цьому середовищі спостерігали найбільшу кількість і різноманітність колоній актиноміцетів. При посівах зразків проб на щільні середовища Чапека, Ешбі, крохмаль-аміачний і ґрунтовий аґари актиноміцети росли погано (на чашках виявлялися поодинокі колонії).

Після отримання чистих культур, завдяки декілька разовим пересівам на м'ясо-пептонний аґар (МПА), вівсяний аґар (ВА), Гаузе 2 і крохмаль-казеїновий аґар (ККА), вивчено культурально-морфологічні властивості виділених ізолятів. У наукових працях багатьох дослідників відмічається, що актиноміцети при рості на поживних середовищах демонструють значну різноманітність структурних характеристик колоній [19, 41, 51]. Винятком не стали й актинобактерії, виділені із Чорного моря. Ізольованим культурам притаманна здатність утворювати різноманітні колонії при рості на різних поживних середовищах. Ця властивість залежить і від складу середовищ і віку культур, а також зумовлена плеоморфізмом, (включаючи морфологічну варіабельність) видів актиноміцетів, у тому числі гетерогенністю популяції в середині одного виду.

На рисунках 3.1 і 3.2 продемонстровано відмінності в морфологічних ознаках колоній актиноміцетів штамів Lim 7.1 і Myt 7ch на різних за складом поживних середовищах.

В таблиці 3.1, як приклад, наведено ознаки колоній штамів Lim 3.3 і Conc 42, виділених із обростань черепашнику і бетонних поверхонь, відповідно, і штаму Myt 7ch, виділеного із мушлі мідій.

Потрібно зауважити, що колонії деяких штамів, які утворили субстратний міцелій, легко знімаються з поживних середовищ, інші – міцно вростають в аґаризоване середовище.

Отримані результати дослідження морфологічних ознак колоній актиноміцетів, виділених із чорноморських об'єктів [4, 7], підтверджують дані інших науковців щодо морфологічної варіабельності колоній актинобактерій, ізольованих із різних джерел. Так, Yanti et al. [82] зазначають, що актиноміцети, виділені з мангрового осаду, ростуть на середовищах різного складу, утворюю-



Рис. 3.1. Колонії актинобактерій штаму Lim 7.1 на:
а) вівсяному агарі, б) ККА, в) МПА

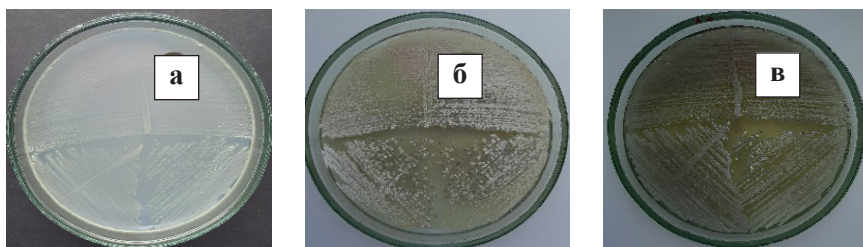


Рис. 3.2. Колонії актинобактерій штаму Myt 7ch
на: а) вівсяному агарі, б) ККА, в) Гаузе 2

чи різноманітні колонії, що відрізняються повітряним міцелієм, краєм і висотою субстратного міцелію, кольором зрілої спори, наявністю ексудату, пігментами та текстурою колоній [82]. Про плеоморфізм актинобактерій мова йде і в повідомленні Jayashanth [39], в якому автор детально описує морфологічні варіанти різних представників актинобактерій. Maria et al. [51] пишуть про різноманітність субстратного і повітряного міцелію актиноміцетів, виділених із зразків ґрунту, при рості на різних за складом середовищах, у тому числі і на середовищах ISP [39, 51].

При дослідженні особливостей росту і морфології колоній чорноморських актиноміцетів із використанням середовищ ISP відмічено ріст переважної більшості усіх виділених штамів. Зокрема, майже усі штами актиноміцетів, ізольованих з обростань черепашику, росли на використаних середовищах (табл. 3.2).

Таблиця 3.1

Ознаки морфології колоній ізолюваних актинобактерій

Середовище	Штам Lim3.3	Штам Conc 42	Штам Myt 7ch
МПА	Бежеві колонії з білувато-бежевим повітряним міцелієм	Колонії бежевого кольору із темно сірим повітряним міцелієм	Округлі, жовтувато-бежеві колонії, із білимповітряним міцелієм
ВА	Темно-бежевіколоніїіз коричневою пігментацією колоніїі середовища	Колонії світло бежевого кольору із темно сірим повітряним міцелієм	Округлі, не пігментовані колонії із білим повітряним міцелієм
Гаузе 2	Світло-бежеві колонії з білувато-бежевим повітряним міцелієм	Колонії темно бежевого кольору із темно сірим повітряним міцелієм	Округлі, жовті колонії, із білимповітряним міцелієм
ККА	Темно-бежеві колонії з сіруватою пігментацією повітряного міцелію	Колонії темно коричневого кольору із темно сірим повітряним міцелієм	Округлі, жовтуваті колонії із білим повітряним міцелієм

Однак деякі штами виявились досить вибагливими, а саме штами Lim 7.1 та Lim 7.2, ріст яких на середовищах ISP-1, ISP-2 і ISP-3 був бідним та спостерігався із затримкою, незважаючи на те, що ці середовища є повноцінними і рекомендуються для культивування актиноміцетів [51, 55]. Цей факт свідчить про те, що специфічні умови морського середовища впливають на фізіологію актинобактерій [7]. Водночас, на базовому середовищі ISP-9 досить активний ріст реєстрували для всіх штамів крім Lim 7.1 (рис. 3.3). Найменш придатним для росту усіх штамів із обростань черепашнику виявилось середовище ISP-6, одними із компонентів якого є цитрат амонію заліза та тіосульфат натрію.

На ISP середовищах спостерігали різнокольорову пігментацію субстратного міцелію, формування та пігментацію повітряного міцелію, а також здатність виділених штамів синтезувати ме-

Таблиця 3.2

Характеристика росту штамів актинобактерій, ізольованих із обростань черепашику на середовищах ISP

Штам	ISP-1	ISP-2	ISP-3	ISP-4	ISP-5	ISP-6	ISP-7	ISP-9
Lim 2.1	+	+	+	+	+	-	+	+
Lim 2.2	+	+	±	+	+	-	+	+
Lim 3.1	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 3.2	+	+	+	+	+	-	+	+
Lim 3.3	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 3.4	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 4	+	+	±	+	+	-	+	+
Lim 5.1	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 5.2	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 6.1	+	+	+	+	+	±	+	+
Lim 6.2	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 7.1	±	±	±	+	+	-	+	-
Lim 7.2	+	±	±	+	+	-	+	+
Lim 9.1	+	+	+	+	+	-	+	+
Lim 9.2	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 10	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 12.1	+	+	+	+	+	-	+	+
Lim 12.2	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 12.3	+	+	+	+	+	-	+	+
Lim Sb	+	+	+	+	+	-	+	+

Примітка: «+» - наявність щільного росту; «+» - слабкий ріст; «-» - відсутність росту; * - здатність утворювати водорозчинний пігмент; ** - здатність утворювати меланоїдні пігменти.

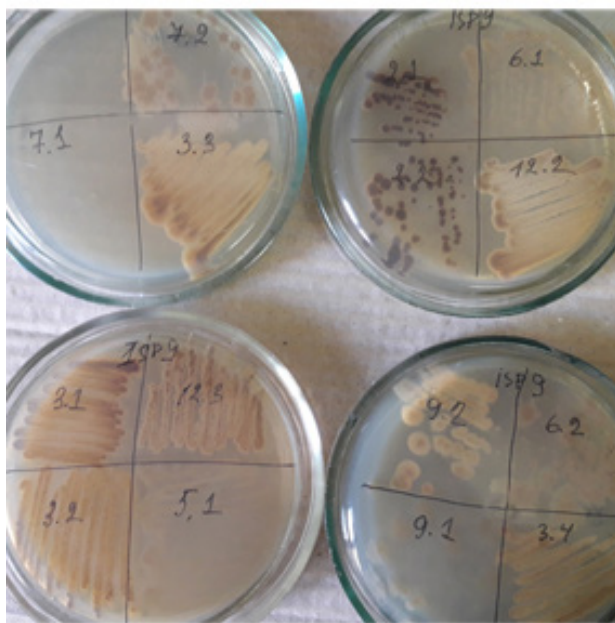


Рис. 3.3. Фотографії субстратного міцелію штамів актинобактерій, ізольованих із обростань черепашнику, при рості на середовищі ISP-9 через 21 добу культивування

ланоїдні пігменти, які визначали на пептон-дріжджовому середовищі з залізом (ISP-6) і тирозиновому агарі (ISP-7). Наприклад, штами Lim 3.1, Lim 3.2, Lim 3.3 та Lim 3.4 характеризувались як пігментацією повітряного міцелію, так і продукцією водорозчинних пігментів від темно-бежевого до темно-коричневого кольору за культивування на середовищах ISP-1, ISP-2, ISP-3 та ISP-4. Для штамів Lim 9.2, Lim 12.2 та Lim 12.3 відмічено утворення водорозчинних пігментів лише на окремих середовищах. Загалом 35,0% штамів, виділених із обростань черепашнику, синтезують водорозчинні пігменти.

У цей же час, синтез меланоїдних пігментів чорного кольору на середовищі ISP-6 реєстрували лише для штамів Lim 3.1, Lim 3.4 та Lim 12.2, що складає 15,0% від усіх штамів, ізольованих із черепашнику [7]. Меланіни - це складні природні пігменти, що синтезуються тваринами, рослинами і мікроорганізмами. Вва-

жається, що функція меланіну в мікробах пов'язана із захистом від впливу навколишнього середовища. Наприклад, бактерії, що продукують меланіни, стійкіші до антибіотиків [46], а меланіни в грибах беруть участь у грибковому патогенезі рослин [22].

Сполуки меланіну – це нерегулярні темно-коричневі полімери, які утворюються різними мікроорганізмами шляхом ферментативного окиснення, вони захищають від електромагнітного випромінювання та володіють антиоксидантними властивостями і можуть ефективно захищати живі організми від різних антропогенних факторів та ультрафіолетового випромінювання [24, 49]. Морські актинобактерії також синтезують і виділяють темні пігменти, меланіни або меланоїди, які, окрім зазначених властивостей, вважаються корисними таксономічними критеріями [13, 50].

Варто зазначити, що більшість штамів не росли на середовищі ISP-6 – Lim 2.1, Lim 2.2, Lim 3.2, Lim 4, Lim 7.1, Lim 7.2, Lim 9.1, Lim 9.2. 12.1 та Lim 12.3. На противагу цьому, усі штами росли на середовищі ISP-7, але не продукували меланоїдні пігменти.

Для штамів, ізольованих з обростань бетону, характерна більш темна пігментація субстратного міцелію на середовищах ISP [7]. Здатність до формування водорозчинних пігментів відмічена для штамів Conc 27.1, Conc 36, Conc 41, Conc 42 та Conc 43, що складає 26,3% від усіх штамів. Усі штами із обростань бетону не росли на середовищі ISP-6 і росли на ISP-7, але меланоїдні пігменти не синтезували (табл. 3.3).

Виявлення меланоїдних пігментів у штамів актинобактерій, виділених із мушлі мідій, показало, що лише 3 штами (Myt 2, Myt 6 та Myt 7ch) із 14 здатні продукувати меланіни, при чому бактерії штаму Myt 6 синтезують меланоїди, які дифундують в обидва середовища (рис. 3.4), а бактерії штамів Myt 2 і Myt 7ch продукують пігменти лише на середовищі ISP-6 [4].

Морфологію клітин виділених актиноміцетів визначали, проводячи мікроскопію фіксованих препаратів, забарвлених фуксином. Слід зауважити, що морфологічна варіабельність властива не тільки колоніям актиноміцетів, клітини цих бактерій також схильні до різноманітності. На рисунку 3.5 наведено приклади клітин актинобактерій штамів Lim 3.3 і Lim 7.2, виділених із обростань черепашнику, і штамів Myt 5 і Myt 12a - із мідій.

Таблиця 3.3

Характеристика росту штамів актинобактерій, ізолюваних із обростань бетону на середовищах ISP

Штам	ISP-1	ISP-2	ISP-3	ISP-4	ISP-5	ISP-6	ISP-7	ISP-9
Conc 19	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 20	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 21	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 22	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 24	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 26	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 27.1	++	++	++	++	+	-	+	+
Conc 27.2	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 28.2	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 29	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 30	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 32	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 36	++	++	++	++	+	-	+	+
Conc 37	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 38	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 41	++	++	++	++	+	-	+	+
Conc 42	++	++	++	++	+	-	+	+
Conc 43	++	++	++	++	+	-	+	+
Conc 44	+	+	+	+	+	-	+	+

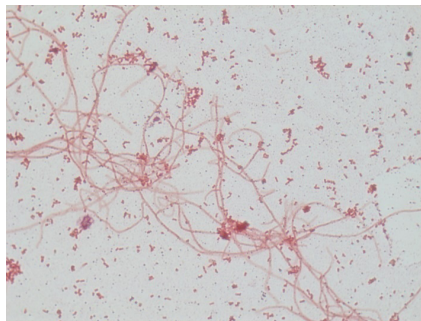
Примітка: «+» - наявність щільного росту; «-» - відсутність росту; * - здатність утворювати водорозчинний пігмент.



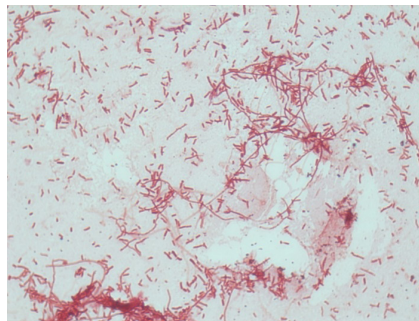
а)

б)

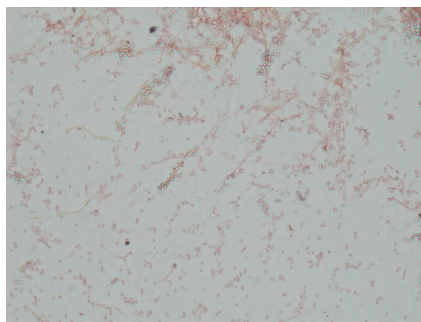
**Рис. 3.4. Меланоїдні пігменти штаму Myt 6 на середовищах
а) ISP-6, б) ISP-7**



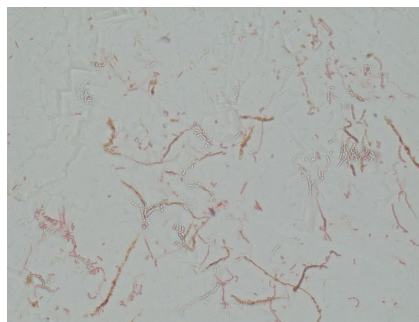
Lim 3.3



Lim 7.2



Myt 5



Myt 12a

**Рис. 3.5. Морфологія клітин актинобактерій штамів Lim 3.3,
Lim 7.2, Myt 5 і Myt 12a (світловий мікроскоп Carl Zeiss Axio,
програмне забезпечення Zen 2.3 lite, x1500)**

Клітини більшості актинобактерій у препаратах представлені короткими паличками невеликих розмірів, розташованих по-одиноці, парами у ланцюжках, V-подібно, хаотично. Окрім того, поряд з короткими паличками зустрічались ниткоподібні клітини. Клітини деяких досліджених штамів були у вигляді кокоподібних форм. У препаратах одночасно могли спостерігати різні форми клітин: від кокоподібних до нитчастих [4, 7].

3.3. Фізіолого-біохімічні властивості актинобактерій

Оптимальний температурний діапазон росту виділених штамів актиноміцетів був у межах від 25 до 37 °С. У цих температурних межах ростуть усі досліджені штами (рис. 3.6-3.8). Більшість штамів (більше 60,0%) із різних джерел виділення гарно росли і при температурі 45 °С. Зауважимо, що 80,0% штамів актиноміцетів, виділених із обростань черепашнику і мідій, демонстрували гарний ріст при 10 °С. При цьому температурному режимі гарно росли менше 60,0% штамів із бетону.

З урахуванням того, що досліджувані актинобактерії ізолювані з морського середовища, доречним було дослідити їх відношення до різних концентрацій хлориду натрію, що є однією із фізіологічних ознак, які характеризують актиноміцети. Здебільшо-

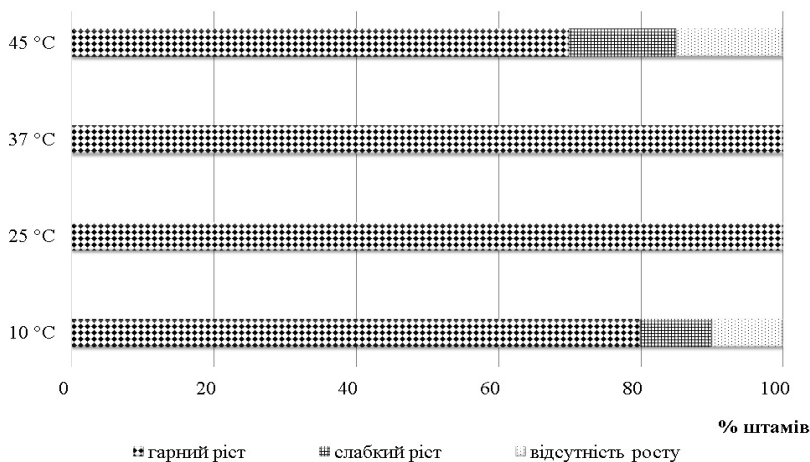


Рис. 3.6. Частка штамів актинобактерій, ізолюваних із обростань черепашнику, здатних рости за різних температур

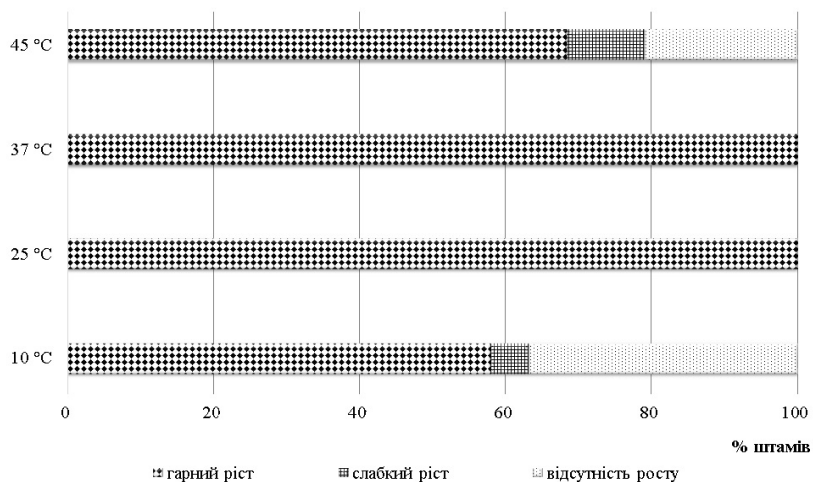


Рис. 3.7. Частка штамів актинобактерій, ізольованих із обростань бетону, здатних рости за різних температур

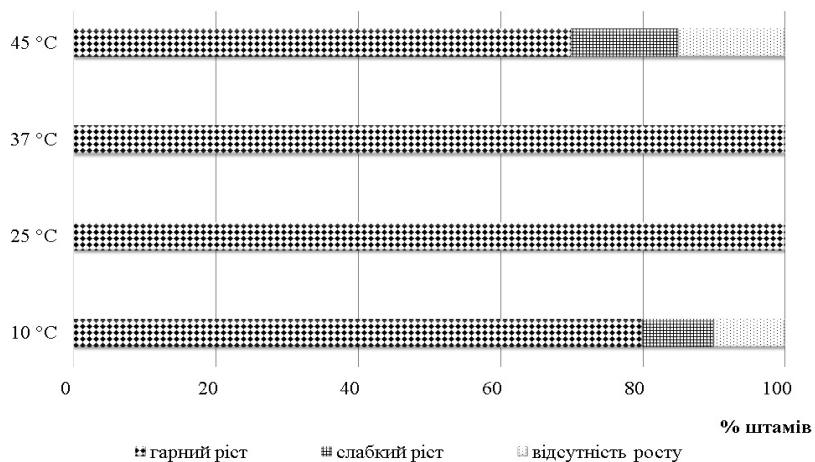


Рис. 3.8. Частка штамів актинобактерій, ізольованих із мідій, здатних рости за різних температур

го стійкість до NaCl притаманна актинобактеріям, які мешкають в морських екосистемах і може розглядатись як непрямий доказ їх автохтонного морського походження [36, 37, 40, 80]. Результати, отримані при визначенні відношення виділених актинобактерій до хлориду натрію, наведено на рис. 3.9-3.11.

Ізольовані актинобактерії росли при граничній концентрації NaCl 12,0%. При такій концентрації фіксували ріст 20,0% штамів, ізольованих із черепашнику і 26,5% штамів, ізольованих з бетонних споруд. Цілком ймовірно, що ці штами є автохтонними і морське середовище є для них природним середовищем існування, хоча можливим є і те, що дані актиноміцети в морі можуть бути і алохтонними, тобто привнесеними з суходолу, і перебувають там, зберігаючи свою життєздатність у вигляді спор [4, 7]. Наші міркування і припущення підтверджуються й іншими дослідниками. Так, наприклад, у роботі Antony-Babu et al. [12] йдеться про те, що види *Streptomyces* мають космополітичне розповсюдження, оскільки вони утворюють безліч спор, які легко диспергуються, а в публікації Anderson and Wellington [11] обговорюється, що ці нитчасті бактерії добре адаптовані до морського середовища [11,

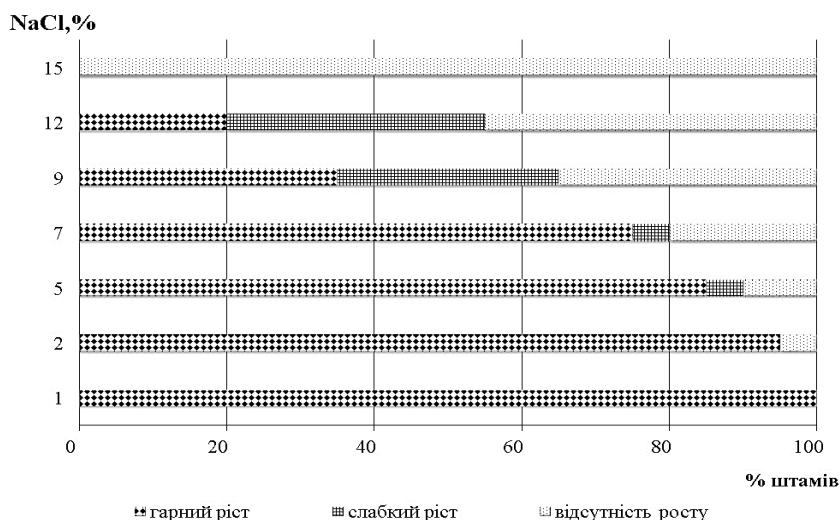


Рис. 3.9. Частка штамів актинобактерій, ізольованих із обростань черепашнику, толерантних до різних концентрацій NaCl

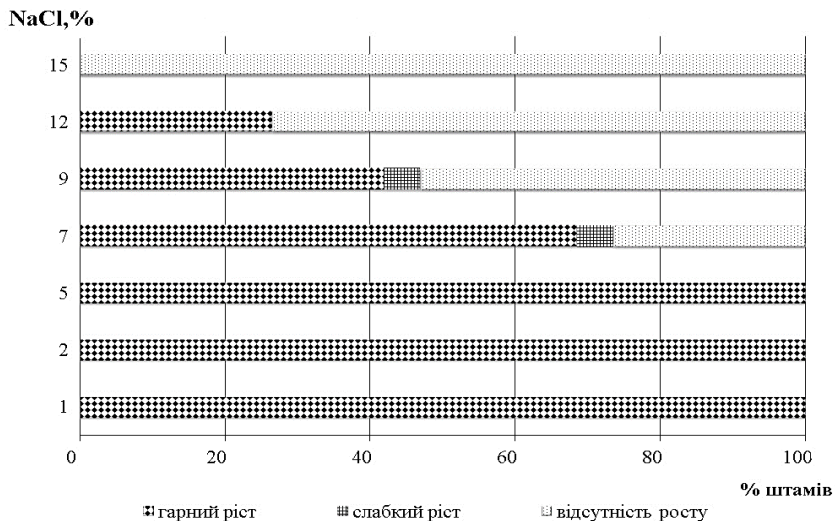


Рис. 3.10. Частка штамів актинобактерій, ізольованих із обростань бетону, толерантних до різних концентрацій NaCl

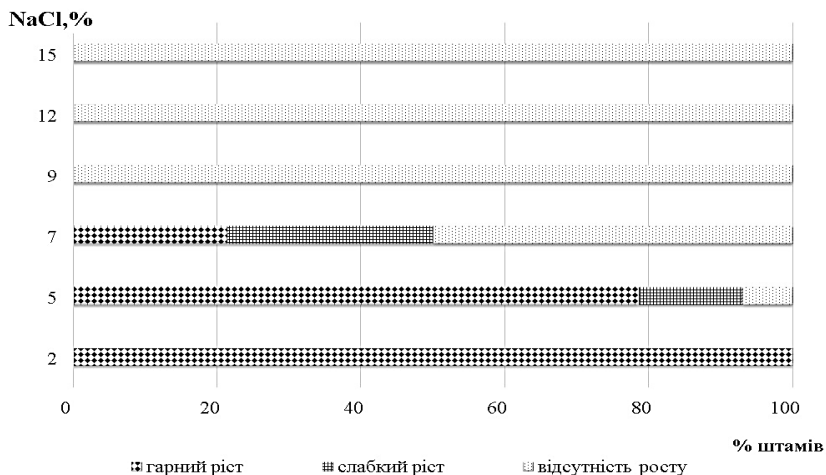


Рис. 3.11. Частка штамів актинобактерій, ізольованих із мідій, толерантних до різних концентрацій NaCl

12]. Про виділення актинобактерій із різноманітних екстремальних ніш йдеться у публікаціях й інших авторів [35, 61].

При додаванні 5,0% NaCl гарний ріст демонстрували 85,0% штамів, ізольованих з обростань черепашнику, і 100,0% штамів, ізольованих з бетону; при додаванні 7,0% NaCl, відповідно, 75,0% і 68,5%; при додаванні 9,0% NaCl гарний ріст відмічено для 35,0% штамів із черепашнику і 42,0% штамів із бетону. Найменш стійкими до NaCl виявились штами Lim 9.1 та Lim 9.2.

Штами актинобактерій, ізольовані з мідій, виявилися більш чутливими до хлориду натрію. Для них гранична концентрація NaCl – 7%. При такій концентрації спостерігався ріст 48,2% виділених штамів. При додаванні у середовище 2% NaCl гарний ріст демонстрували усі штами, 5% – 85,0%. Найменш стійкими до хлориду натрію виявились штами Myt 1, Myt 12a і Myt 12b.

За типом харчування актиноміцети є гетеротрофами (хемоорганотрофами). Для багатьох актиноміцетів, наприклад для представників роду *Streptomyces*, характерна олігокарбофілія, вони можуть рости на середовищах з низьким вмістом поживних речовин, що свідчить про їх можливість концентрувати поживні речовини. Для них відзначається наявність метаболічних шляхів та ферментних систем, рідкісних для інших мікроорганізмів [15, 49, 56, 65].

У проведених дослідженнях встановлено, що виділені штами актиноміцетів здатні залучати у свій метаболізм різні джерела вуглецю [4, 7]. Усі використані вуглецеві субстрати споживалися бактеріями із черепашнику та із бетонних споруд (рис. 3.12-3.14).

За результатами проведених досліджень максимальна кількість штамів (85,0-95,0%), ізольованих із обростань черепашнику, росте, використовуючи для конструктивного і енергетичного метаболізму лактозу, глюкозу, гліцерол, галактозу та рамнозу. Здатність рости у присутності ксилози продемонстрували лише 35,0% штамів.

Виходячи з отриманих даних, найкращим вуглецевим субстратом для виділених актиноміцетів була лактоза. За спроможністю бути метаболізованими актинобактеріями із черепашнику джерела вуглецю можна розташувати у такому порядку (від найспоживанішого до найменш придатного): лактоза > глюкоза >

гліцерол/галактоза/рамноза > цукроза/манноза/манітол/сорбітол > арабіноза > фруктоза > ксилоза.

Для штамів, ізолюваних із обростань бетону, максимально сприятливим вуглеводом для росту виявилась рамноза – 94,7%. Більше 80,0% відсотків штамів демонстрували гарний ріст при додаванні у середовище фруктози, глюкози, маннози та манітолу. Мінімальна кількість штамів (31,6% та 21,6%, відповідно) росли у присутності арабінози та ксилози.

За ступенем утилізації актиноміцетами, ізолюваними з обростань бетону, використані вуглецеві субстрати можна розташувати у наступному порядку: рамноза > глюкоза/фруктоза/манноза/манітол > цукроза/сорбітол/галактоза > гліцерол > арабіноза > ксилоза.

Іншими дослідниками також показано, що найменш придатним середовищем для росту актинобактерій є середовище з ксилозою [6].

Щодо актинобактерій, виділених із мідій, то штами Myt 1 і Myt 10 не здатні метаболізувати фруктозу і арабінозу та мають дуже помірний ріст на середовищах з ксилозою і сорбітолом.

Джерело вуглецю

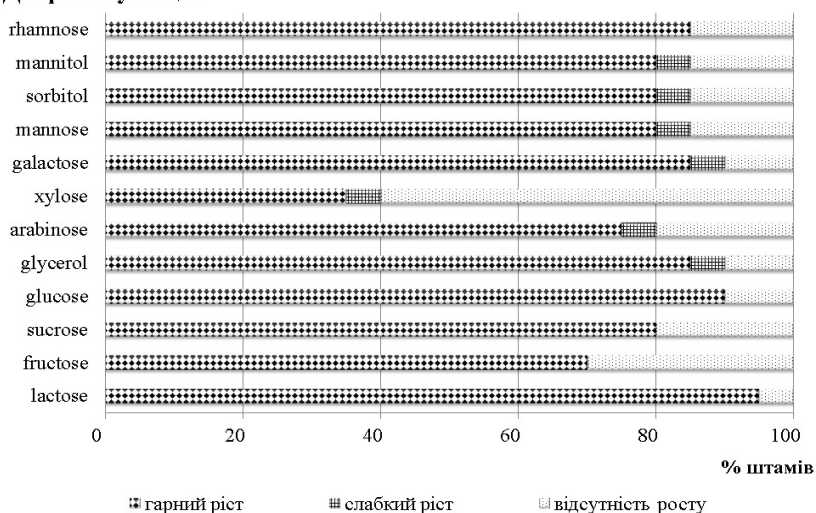


Рис. 3.12. Частка штамів актинобактерій, ізолюваних із обростань черепашнику, здатних до ферментації джерел вуглецю

Джерело вуглецю

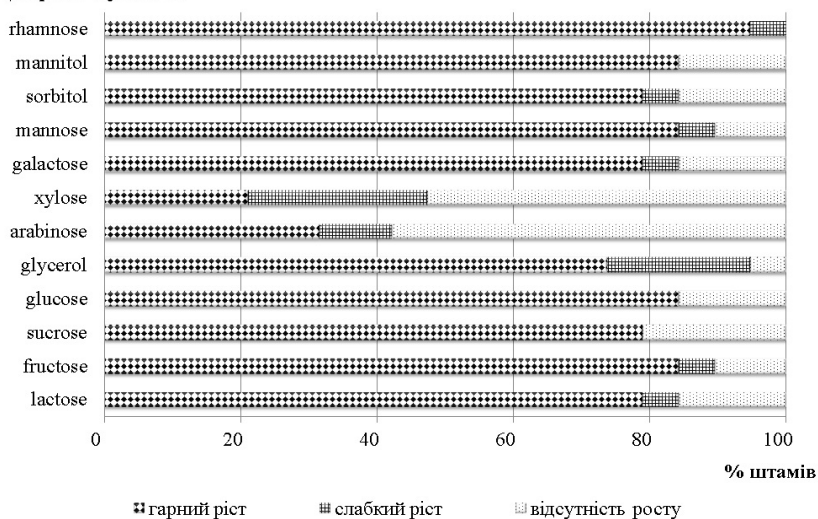


Рис. 3.13. Частка штамів актинобактерій, ізольованих із обростань бетону, здатних до ферментації джерел вуглецю

Джерело вуглецю

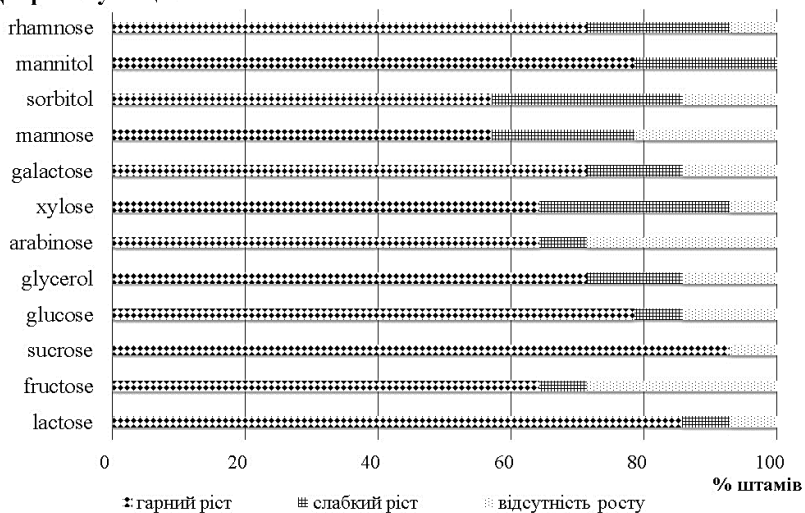


Рис. 3.14. Частка штамів актинобактерій, ізольованих із мідій, здатних до ферментації джерел вуглецю

Найменшою здатністю залучати у свій метаболізм різні вуглецеві субстрати характеризувалися штами Myt 12a та Myt 12b. Для культивування цих штамів придатними є багатші органічні середовища, наприклад, Гаузе 2. Натомість, штам Myt 11 демонстрував гарний ріст на усіх вуглецевих субстратах [4].

Таким чином, штамам актиноміцетів, виділеним із різних джерел Чорного моря, притаманна досить висока метаболічна активність, що може бути запорукою активації різних метаболічних шляхів і є одним із можливих механізмів адаптації до мінливих умов довкілля.

3.4. Ідентифікація та спектри жирних кислот актинобактерій

Відомо, що ідентифікація актиноміцетів не до кінця відпрацьована. Це пояснюється з одного боку ототожненням видів із так званими “типовими” штамами стрептоміцетів, з іншого – описом нових видів без урахування внутрішньовидової мінливості. Встановлено, що, завдяки мінливості, у межах виду зустрічаються численні різновиди, які є, по суті, варіантами, природними або штучними мутантами з властивостями відмінними від материнського штаму [2].

Одним із підходів до попередньої ідентифікації актиноміцетів, принаймні до роду, є порівняння їх жирнокислотних спектрів [44], оскільки аналіз жирнокислотного складу загальних клітинних ліпідів є однією із важливих хемотаксономічних характеристик, яка корелює з результатами ідентифікації за молекулярно-генетичними показниками [74,79].

У цих дослідженнях проаналізовані результати визначення жирнокислотного складу, отримані для 31 штаму актиноміцетів, ізольованих із біологічних обростань бетонних поверхонь, природного черепашнику, пластику, металу та води Одеської затоки Чорного моря [3]. Завдяки автоматизованій системі ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI Library ACTIN 3.80) [59] встановлено, що досліджені штами актиноміцетів з різними індексами подібності відносяться до двох родів *Streptomyces* і *Nocardiosis*. Результати ідентифікації наведено у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

**Ідентифікація актинобактерій, виділених із різних джерел
Чорного моря, за спектрами жирних кислот допомогою
бібліотеки MIDI Sherlock**

Штам	Рід	Джерело виділення	Індекс спорідненості
Lim 2.2	Streptomyces	черепашник	0.063
Lim 3.1	Streptomyces	черепашник	0.053
Lim 3.2	Streptomyces	черепашник	0.065
Lim 5.2	Streptomyces	черепашник	0.166
Lim 6.1	Streptomyces	черепашник	0.404
Lim 6.2	Streptomyces	черепашник	0.225
Lim 7.1	Nocardiopsis	черепашник	0.001
Lim 7.2	Streptomyces	черепашник	0.061
Lim 9.1	Streptomyces	черепашник	0.609
Lim 9.2	Streptomyces	черепашник	0.268
Lim 10	Streptomyces	черепашник	0.302
Lim 12.1	Streptomyces	черепашник	0.110
Lim 12.2	Streptomyces	черепашник	0.072
Lim 12.3	Streptomyces	черепашник	0.132
Conc 1	Nocardiopsis	бетон	0.015
Conc 3	Streptomyces	бетон	0.002
Conc 5_1	Streptomyces	бетон	0.040
Conc 6b	Streptomyces	бетон	0.091
Conc 6s	Streptomyces	бетон	0.109
Conc 9	Streptomyces	бетон	0.517
Conc 11	Streptomyces	бетон	0.002
Conc 13	Streptomyces	бетон	0.014
Conc 15	Streptomyces	бетон	0.272
Conc 16a	Streptomyces	бетон	0.077
Conc 21	Streptomyces	бетон	0.006
Conc 24	Streptomyces	бетон	0.265
Conc 29	Nocardiopsis	бетон	0.035
Conc 32	Streptomyces	бетон	0.005
Met 2	Nocardiopsis	метал	0.152
Plast 1	Streptomyces	пластик	0.250
Sea 2	Streptomyces	морська вода	0.066

Переважна більшість штамів (87,1% від усіх досліджених) за результатами ідентифікації віднесена до роду *Streptomyces* і лише 4 штами (12,9%) – до роду *Nocardiosis*. Як представники роду *Nocardiosis* ідентифіковано 2 штами із обростань бетону (Conc 1 і Conc 29) та по одному штаму, виділених із черепашнику (Lim 7.1) і металу (Met 2). Отримані результати доповнюють численні наукові публікації щодо космолітичного розповсюдження представників роду *Streptomyces*. Зокрема, стрептоміцети досить часто і в переважній більшості виділяються із різних джерел морських (океанських) середовищ різних частин світу [23, 61, 64]. Так, наприклад, у публікації Tenebro et al. [70] повідомляється про ізоляцію із морських відкладень західно-центральної частини Філіппін 2212 штамів, які були ідентифіковані як стрептоміцети [70]. Із морських губок Південно-Китайського моря Wei Sun et al. [69] виділено 77 ізолятів, представників різних родів актиноміцетів; одними із домінуючих були представники роду *Streptomyces*, більше того, саме штам стрептоміцетів (*Streptomyces anulatus* S71) синтезував сполуку ароматичних полікетидів – ангуциклін [69]. Про виділення представників родів *Streptomyces* і *Nocardiosis*, з цитоксичною і антагоністичною активністю із різних відкладень і проб морської води, зібраних поблизу узбережжя Червоного моря в Єгипті мова йде у праці Abdelfattah et al. [8].

Відомо, що актиноміцети за жирнокислотним складом поділяють на два типи. Види, у клітинах яких переважають жирні кислоти з розгалуженим ланцюгом, відносять до першого типу, а види, у клітинах яких значний відсоток насичених або мононенасичених жирних кислот з прямим ланцюгом, – до другого типу [52].

За даними літературних джерел профілі клітинних жирних кислот представників роду *Streptomyces* складаються переважно з 12-17 насичених жирних кислот з розгалуженим ланцюгом з ISO- та ANTEISO- положенням метильної групи. Метиліві розгалужені жирні кислоти є маркерами актиноміцетів [20, 44, 71]. Проведений хроматографічний аналіз жирнокислотних спектрів виділених актиноміцетів роду *Streptomyces* показав наявність у їх складі ізомерів розгалужених насичених і ненасичених жирних кислот із загальною кількістю атомів вуглецю від 10 до 17 (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

**Жирнокислотний склад (%) клітин актинобактерій
роду *Streptomyces***

Жирна кислота	10:0 ISO	11:0 ANTEISO	12:0 ISO	13:0 ISO	13:0 ANTEISO	14:0 ISO	15:0 ISO	15:0 ANTEISO	15:0
Штам									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Lim 2.2	*-	0,28	0,63	0,66	1,16	10,84	8,97	38,74	2,07
Lim 3.1	0,5	-	-	0,11	0,35	2,82	5,8	55,09	1,91
Lim 3.2	-	-	1,73	0,39	0,66	7,13	5,9	32,14	0,84
Lim 5.2	-	-	0,47	0,7	0,7	7,6	13,71	31,77	2,09
Lim 6.1	0,09	0,11	0,39	0,33	0,76	3,6	7,67	34,07	2,11
Lim 6.2	0,05	0,26	0,48	0,49	1,4	4,78	7,55	33,87	1,86
Lim 7.2	-	-	-	-	0,13	2,91	6,46	48,54	1,64
Lim 9.1	-	0,07	0,17	0,22	0,47	6,05	10,26	34,33	1,84
Lim 9.2	0,14	0,3	0,62	0,3	0,79	8,12	9,96	28,54	2,33
Lim 10	-	-	0,56	0,46	0,68	9,14	10,67	26,0	1,96
Lim 12.1	-	-	-	-	-	5,43	7,75	43,8	1,43
Lim 12.2	-	-	0,11	0,1	0,33	3,08	6,58	35,01	1,07
Lim 12.3	-	-	-	0,06	0,16	3,1	5,35	42,62	1,32
Conc 3	-	-	-	-	0,24	6,65	5,63	48,34	1,08
Conc 5_1	-	-	-	0,57	0,6	2,54	17,46	41,64	0,57
Conc 6b	0,08	0,1	0,14	0,33	0,46	4,86	7,52	33,16	1,86
Conc 6s	-	0,08	-	0,25	0,39	2,43	7,17	35,06	1,75
Conc 9	-	-	-	0,29	0,39	0,39	15,11	34,28	0,76
Conc 11	0,97	-	-	0,34	0,38	7,31	6,32	27,12	2,2
Conc 13	0,24	-	-	0,16	0,27	4,87	7,58	24,23	1,5
Conc 15	-	-	-	0,48	0,43	5,44	12,22	33,67	2,47
Conc 16a	0,11	0,59	0,18	0,44	1,53	2,05	8,58	48,89	1,67
Conc 21	0,74	-	-	0,14	0,32	8,59	4,37	30,3	1,71
Conc 24	0,15	-	0,35	0,24	0,38	15,69	6,03	29,7	1,77
Conc 32	1,94	-	-	0,16	0,34	10,66	4,61	25,82	1,59
Plast 1	-	0,2	0,62	0,7	1,16	10,92	7,93	39,5	2,07
Sea 2	1,28	-	-	0,06	0,14	2,88	3,39	48,58	0,91

Примітка: *- не виявлено.

Продовження таблиці

16:1 ISO H	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:0	16:0 9? METHYL	17:1 ANTEISO C	17:0 ANTEISO	17:0 ISO	17:1 CIS 9	17:0 CYCLO
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
3,14	14,03	4,0	5,22	-	1,65	5,53	1,16	0,35	-
0,92	8,7	1,99	3,77	1,06	2,72	9,78	1,17	0,49	1,23
1,77	10,84	1,07	2,23	-	3,38	5,61	1,11	0,19	2,62
3,06	16,14	4,86	5,26	2,17	1,88	5,16	2,09	0,51	0,49
2,83	12,08	5,37	6,49	3,01	5,54	10,61	-	2,34	0,17
4,0	12,78	5,13	4,87	2,65	5,05	9,04	1,72	0,83	-
1,14	9,91	0,96	3,01	2,02	4,14	9,31	1,43	0,43	3,35
3,19	19,31	3,06	4,59	1,92	1,88	8,38	2,2	0,4	0,71
7,28	19,87	3,71	2,76	2,32	2,62	5,2	1,47	0,54	0,97
6,89	23,43	2,82	3,65	1,83	2,06	5,16	1,92	-	1,7
1,69	15,18	1,65	3,19	2,1	3,83	6,55	1,38	0,52	3,15
1,13	19,71	1,12	4,02	2,08	3,45	13,59	2,86	0,42	2,3
1,39	14,68	3,48	5,5	1,18	2,57	11,06	1,47	0,54	1,19
0,9	11,69	0,61	2,81	1,22	3,17	6,22	0,99	-	1,59
2,52	10,91	1,73	2,46	0,58	0,96	12,46	4,43	-	-
4,14	13,8	10,17	6,6	1,81	3,19	7,25	1,54	0,74	0,26
1,87	9,31	10,42	9,53	1,72	3,81	10,22	2,03	0,55	0,26
1,31	9,83	2,38	3,79	2,25	3,51	17,4	6,39	-	-
4,21	14,25	7,74	5,08	1,11	2,13	4,72	0,84	0,59	-
6,28	13,47	7,63	3,67	2,39	4,3	6,79	1,11	0,44	-
2,24	11,86	6,4	9,26	2,02	1,7	6,12	2,26	0,53	0,85
0,96	4,77	5,54	6,25	1,99	3,56	8,71	2,11	0,61	0,2
6,03	14,43	4,7	4,05	1,32	3,81	6,45	0,64	0,48	2,04
2,76	19,76	4,03	7,04	0,96	1,74	4,87	1,53	0,43	1,11
5,17	16,28	4,24	4,01	1,07	2,84	5,95	0,78	0,39	1,15
3,14	15,07	4,0	5,22	-	1,65	5,61	1,18	0,43	-
0,71	10,87	1,69	3,83	1,35	3,62	12,73	1,23	0,52	2,96

Встановлено, що у спектрах стрептоміцетів провідну роль відігравали 12-метилтетрадеканова кислота (її кількість у відсотковому відношенні коливалася від 22,82% до 55,09%), 14-метилпентадеканова кислота (4,77%-23,43%), 12-метилтридеканова кислота (0,39%-15,69%), 14-метилгексадеканова кислота (4,72%-17,4%) та 13-метилтетрадеканова кислота (3,39%-17,46%). Майже усі штами містили невеликий відсоток C17:0 CYCLO (цис-9,10-метилгексадеканової кислоти), що є корисним маркером для ідентифікації бактерій роду *Streptomyces* [52].

Статистичний аналіз жирнокислотних профілів досліджених штамів актиноміцетів роду *Streptomyces*, проведений за допомогою програмного забезпечення MIDI Library Generation System дав змогу збудувати дендрограму на основі евклідової відстані (рис. 3.15).

Статистичні відмінності у кількісних показниках 9-цис-гексадецененової кислоти у жирнокислотному профілі стрептоміцетів є підґрунтям для виокремлення двох груп. Для першої групи характерним є відсоткове відношення 16:1 CIS 9 (пальмітолеїнової кислоти) від 0,61% до 2,82%, для другої – від 3,06% до 10,42%.

Кількісні відмінності у відсотковому відношенні 13-метилтетрадеканової кислоти обумовлюють поділ штамів першої групи на дві підгрупи (А і Б) на евклідовій відстані 15 [3].

Для підгрупи А характерним є наявність C15:0 ISO (13-метилтетрадеканової кислоти) у відсоткових межах від 10,61% до 17,46%, для підгрупи Б – від 3,39% до 7,75%.

Для другої групи також має місце поділ на дві підгрупи (В і Г) на евклідовій відстані 17,5, але за іншими ознаками. У штамів підгрупи В відсоткове відношення 14-метилгексадеканової кислоти становить від 0,96% до 4%, а 15-метилпентадеканової кислоти – від 1,16% до 2,26%. Для підгрупи Г відсоткове відношення для C16:1 ISO складає від 4,21%-6,28%, а для C17:0 ISO – від 0,64% до 1%.

Щодо виділених актиноміцетів, ідентифікованих як представники роду *Nocardiosis*, аналіз хроматограм показав, що склад жирних кислот клітин містить ізомери насичених та ненасичених жирних кислот із загальною кількістю атомів вуглецю від 13 до 19 (табл. 3.6). У жирнокислотних профілях досліджених

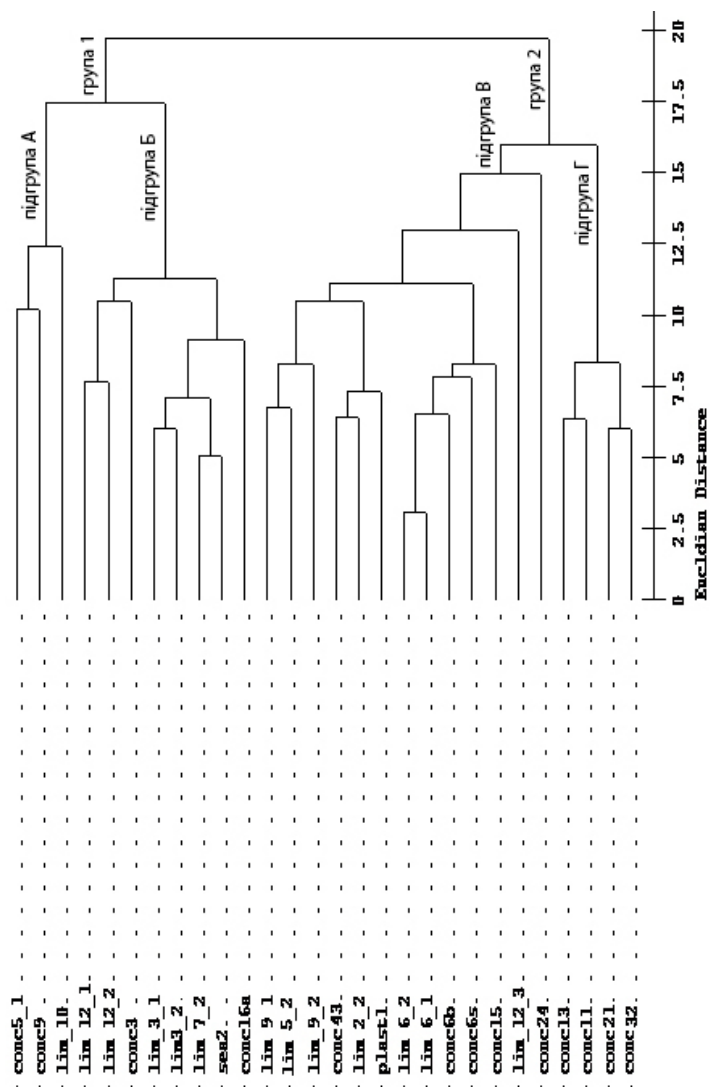


Рис. 3.15. Дендрограма, побудована на основі аналізу жирнокислотного складу стрептоміцетів

Таблиця 3.6

**Жирнокислотний склад (%) клітин актинобактерій
роду *Nocardiosis***

Жирна кислота	Штам			
	Lim 7.1	Conc 1	Conc 29	Met 2
13:0 ISO	0,13	0,13	0,24	*-
13:0 ANTEISO	0,63	0,86	0,74	1,67
14:0 ISO	1,3	1,0	1,18	12,01
14:0	0,5	0,22	0,23	0,79
15:0 ISO	1,64	1,47	1,05	1,48
15:0 ANTEISO	9,14	10,36	7,08	6,83
15:0	-	0,31	24,93	-
16:0 ISO	15,61	19,2	1,79	36,71
16:1 CIS 9	1,45	2,71	2,38	-
16:0	2,26	3,46	2,38	1,69
17:1 ANTEISO C	1,22	-	3,78	-
17:0 ISO	3,1	2,31	1,73	1,8
17:0 ANTEISO	22,59	29,42	22,59	9,5
17:1 CIS 9	4,59	3,25	6,18	-
17:0	1,67	1,55	2,26	1,93
17:0 10 METHYL	0,98	0,66	1,03	-
18:0 ISO	1,82	1,36	1,55	1,89
18:1 CIS 9	16,39	14,45	12,17	-
18:0	3,86	4,61	4,3	1,35
19:0 ANTEISO	-	0,41	0,4	-
19:0	0,23	-	-	-

Примітка: *- не виявлено.

штамів актиноміцетів роду *Nocardiopsis* переважали такі жирні кислоти: 12-метилтетрадеканова кислота (від 6,83% до 10,36%), 14-метилпентадеканова кислота (1,79%-36,71%), 14-метилгексадеканова кислота (9,5%-29,42%), (9*Z*)-октадеценева кислота (від 12,17% до 16,39%) [3].

Привертає увагу особливість спектру жирних кислот штаму *Nocardiopsis* sp. Conc 29, у профілі якого переважала пентадеканова кислота (C15:0). Загальна кількість цієї кислоти сягала 24,93%, тоді як у інших штамів цього роду вона склала 0,31%, або не виявлялася зовсім (табл. 3.6).

Проведений хроматографічний аналіз показав, що для всіх виділених актиноміцетів роду *Nocardiopsis* притаманною є наявність вищих жирних кислот із загальною кількістю атомів вуглецю 18-19 (16-метилгептадеканова, (9*Z*)-октадеценева, октадеканова, 16-метилоктадеканова та нонадеканова кислоти) [3].

Свого часу в опублікованих результатах досліджень Kroppenstedt [44] і Hozzein et al. [33] показано, що бактерії роду *Nocardiopsis* характеризуються розгалуженими ізомерами насичених жирних кислот, серед яких основними є 14-метилгептадеканова кислота (C16:0 ISO) і 14-метилгексадеканова кислота (C17:0 ANTEISO) [33, 44]. Також цими авторами показано наявність у жирнокислотних профілях *Nocardiopsis*, правда дещо у меншій кількості, 10-метил розгалуженої туберкулостеаринової кислоти, тобто 10-метилоктадеканової кислоти (C18:010 METHYL), та її попередника ненасиченої цис-9,10-октадеценевої кислоти (C18:1 CIS). Отримані результати визначення складу клітинних ліпідів штамів актиноміцетів роду *Nocardiopsis*, виділених із Чорного моря, не відрізняються від вище наведених показників зазначених авторів.

Зауважимо, що жирнокислотні профілі актиноміцетів обох родів характеризуються наявністю ізомерів розгалужених насичених жирних кислот, що свідчить про їх належність до першого типу актиноміцетів [52].

Отже, в результаті проведених мікробіологічних досліджень вперше актиноміцети ізольовано із біологічних обростань черепашнику, бетону та інших поверхонь, а також із мушлі мідій Одеської затоки Чорного моря; досліджено їх морфологічні, куль-

туральні, фізіолого-біохімічні і хемотаксономічні властивості. За результатами попередньої ідентифікації встановлено, що незважаючи на досить високу морфологічну варіабельність, здатність утворювати різні морфотипи колоній при рості на поживних середовищах, всі штами актиноміцетів представлені двома родами: *Streptomyces* і *Nocardiopsis* із суттєвим домінуванням представників роду *Streptomyces*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білявська Л. О. Актинобактерії роду *Streptomyces* і їхні метаболіти у біорегуляції рослин: дис. ... док. біол. наук: 03.00.07. – Київ, 2018. – 485 с.
2. Валагурова Е. В., Козырицкая В. Е., Иутинская Г. А. Актиномицеты рода *Streptomyces*, описание видов и компьютерная программа их идентификации. – Киев: Наукова думка, 2003. – 618 с.
3. Коротаєва Н. В., Потапенко К. С., Страшнова І. В., Метеліцина І. П., Іваниця В. О. Спектри жирних кислот актинобактерій з біологічних обростань Одеської затоки Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2021. – № 3. С 60–70. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3\(53\).245369](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).245369)
4. Коротаєва Н. В., Страшнова І. В., Васильєва Н. Ю., Потапенко К. С., Метеліцина І. П., Філіпова Т. О., Іваниця В. О. Характеристика актинобактерій, ізольованих із *Mytilus galloprovincialis* Одеської затоки Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2021. – № 3. – С. 84–98. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3\(53\).246392](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).246392)
5. Потапенко К. С., Коротаєва Н. В., Іваниця В. О. Вторинні метаболіти морських актинобактерій з антибіотичною активністю // Мікробіологія і біотехнологія. – 2021. – № 3. – С. 28–43. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3\(53\).245323](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).245323)
6. Сищикова О. В. Біологічні властивості та таксономічний склад стрептоміцетів природних ґрунтів техноземів Криворіжжя // Мікробіологія і біотехнологія. – 2014. – № 1. – С. 91–104.
7. Страшнова І. В., Коротаєва Н. В., Потапенко К. С., Васильєва Н. Ю., Чабан М. М., Штеніков М. Д., Лісютін Г. В.,

- Іваниця В. О. Актинобактерії обростання твердих субстратів Одеської затоки Чорного моря // Морський екологічний журнал. – 2021. – № 2. – у друці.
8. Abdelfattah M. S., Elmallah M. I. Y., Hawas U. W., El-Kassem L. T. A., Eid M. A. G. Isolation and characterization of marine-derived actinomycetes with cytotoxic activity from the Red Sea coast // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. – 2016. – V. 6, № 8. – P. 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.004>
 9. Amin D. H., Abdallah N. A., Abolmaaty A., Tolba S., Wellington E. M. H. Microbiological and molecular insights on rare Actinobacteria harboring bioactive prospective // Bulletin of the National Research Centre. – 2020. – P. 1–12. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0266-8>
 10. Analysis User's Manual. – Ver 6.0. – Newark, Del. – 2005. – 50 p.
 11. Anderson A. S., Wellington E. M. H. The taxonomy of Streptomyces and related genera // Journal Systematic and Evolution Microbiology. – 2001. – V. 51, № 3. – P. 797–814. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-797>
 12. Antony-Babu S., Stach J. E., Goodfellow M. Genetic and phenotypic evidence for *Streptomyces griseus* ecovars isolated from a beach and dune sand system // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2008. – V. 94, № 1. – P. 63–74.
 13. Arai T., Mikami Y. Choromogenecity of Streptomyces // Appl. Microbiol. – 1972. – V. 23. – P. 402–406.
 14. Arul J. P., Jha B. Intertidal marine sediment harbours Actinobacteria with promising bioactive and biosynthetic potential // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – P. 1–15. doi:10.1038/s41598-017-09672
 15. Baral B., Akhgari A., Metsä-Ketelä M. Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges // Synthetic and Systems Biotechnology. – 2018. – V. 3, № 3. – P. 163–178. doi: 10.1016/j.synbio.2018.09.001
 16. Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.-P. et al. Taxonomy, physiology and natural products of Actinobacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2016. – V. 80. – P. 1–43.

17. Berdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading // *J. Antibiot.* – 2012. – V. 65. – P. 385–395.
18. Bhatti A. A., Haq S., Bhat R. A. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health // *Microb. Pathogenesis.* – 2017. – V. 111. – P. 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.036>
19. Bhuneshwari S., Roymon M. G. Review on current techniques in isolation and characterization of *Streptomyces* from soil // *Ind. J. Sci. Res.* – 2017. – V. 13, № 2. – P. 226–232.
20. Bossio D. A., Fleck J. A., Scow K. M., Fujii R. Alteration of soil microbial communities and water quality in restored wetlands // *Soil Biol Biochem.* – 2006. – V. 38. – P. 1223–1233.
21. Bredholdt H., Galatenko O. A., Engelhardt K., Fjærvik E., Terekhova L. P., Zotchev S. B. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity // *Environmental Microbiology.* – 2007. – V. 9, № 11. – P. 2756–2764. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01387.x
22. Butler M. J., Day A. W. Fungal melanins: a review // *Can. J. Microbiol.* – 1998. – V. 44. – P. 1115–1136.
23. Cumsille A., Undabarrena A., Gonzalez V., Claveras F., Rojas C., Camara B. Biodiversity of actinobacteria from the South Pacific and the assessment of *Streptomyces* chemical diversity with metabolic profiling // *Marine Drugs.* – 2017. – V. 15. – P. 1–21. doi:10.3390/md15090286
24. Dastager S. G., Li W. J., Dayanand A., Tang S-K., Tian X-P., Zhi X-Y. et al. Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces* // *African Journal of Biotechnology.* – 2006. – V. 5, № 8. – P. 1131–1134.
25. Davies-Bolorunduro O. F., Adeleye I. A., Akinleye M. O., Wang P. G. Anticancer potential of metabolic compounds from marine actinomycetes isolated from Lagos Lagoon sediment // *Journal of Pharmaceutical Analysis.* – 2019. – V. 9, № 3. – P. 201–208. doi: 10.1016/j.jpha.2019.03.004
26. Dhakal D., Pokhrel A. R., Shrestha B., Sohng J. K. Marine Rare Actinobacteria: Isolation, Characterization, and Strategies for Harnessing Bioactive Compounds // *Frontiers in Mi-*

- crobiology. – 2017. – V. 8, № 1106. – P. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2017.01106
27. Ding T., Yang L-G., Zhang W-D., Shen Y-H. The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity // RSC Advances. – 2019. – V. 9, № 38. – P. 21964–21988. <https://doi.org/10.1039/C9RA03579F>
 28. Ettoumia B., Chouchanec H., Guesmia A., Mahjoubi M., Brusetti L., Neifar M. et al. Diversity, ecological distribution and biotechnological potential of Actinobacteria inhabiting seamounts and non-seamounts in the Tyrrhenian Sea // Microbiological Research. – 2016. – V. 186–187. – P. 71–80. doi: 10.1016/j.micres.2016.03.006
 29. Fenical W., Jensen P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria // Nat. Chem. Biol. – 2006. – V. 2. – P. 666–673.
 30. Gozari M., Bahador N., Jassbi A. R., Mortazavi M. S., Hamzehei S., Eftekha E. Isolation, distribution and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of cultivable actinobacteria from the Oman Sea sediments // Acta Oceanol. Sin. – 2019. – V. 38, № 12. – P. 84–90. <https://doi.org/10.1007/s13131-019-1515-2>
 31. Gromyko O., Tistechok S., Roman I., Aravitska O., Luzhetskyy A., Parnikoza I., Fedorenko V. Isolation and characterization of culturable actinobacteria associated with *Polytrichum strictum* (Galindez Island, the maritime Antarctic) // Ukrainian Antarctic Journal. – 2021. – V. 1. – P. 82–97. <https://doi.org/10.33275/1727-7485.1.2021.668>
 32. Han S. K., Nedashkovalskaya O. I., Mikhailov V. V., Kim S. B., Bae K. S. *Salinibacterium amurskyense* gen nov., sp. nov., a novel genus of the family Microbacteriaceae from marine environment // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2003. – V. 53. – P. 2061–2066.
 33. Hozzein W. N., Trujillo M. E. Nocardiosis. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Eds. M. E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey and, W. B. Whitman – Springer, 2015. doi:10.1002/9781118960608.gbm00195

34. Hozzein W. N., Mohany M., Alhawsawi S. M. M., Zaky M. Y., Al-Rejaie S. S., Alkhalifah D. H. M. Flavonoids from marine-derived actinobacteria as anticancer drugs // *Curr. Pharm. Des.* – 2021. – V. 27. – P. 505–512. doi: 10.2174/1381612826666201216160154
35. Hui M. L.-Y., Tan L. T.-H., Letchumanan V., He Y.-W., Fang C.-M., Chan K.-G. et al. The Extremophilic Actinobacteria: From Microbes to Medicine // *Antibiotics.* – 2021. – V. 10. – P. 1–15. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060682>
36. Iizuka T., Jojima Y., Fudou R., Yamanaka S. Isolation of myxobacteria from the marine environment // *FEMS Microbiology Letters.* – 1998. – V. 169, № 2. – P. 317–322. doi: [10.1111/j.1574-6968.1998.tb13335.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13335.x)
37. Imada C., Masuda S., Kobayashi T., Hamada-Sato N., Nakashima T. Isolation and Characterization of Marine and Terrestrial Actinomycetes Using a Medium Supplemented with NaCl // *Actinomycetologica.* – 2010. – V. 24. – P. 12–17.
38. Jagannathan S. V., Manemann E. M., Rowe S. E., Callender M. C., Soto W. Marine Actinomycetes, new sources of biotechnological products // *Marine Drugs.* – 2021. – V. 19. – P. 1–30. <https://doi.org/10.3390/md19070365>
39. Jayashanth E. Actinobacteria – morphology, physiology, biochemistry, diversity and Industrial Applications of genus Actinobacteria: Microbiology Assignment, 2015. – P. 1–16. doi:10.13140/RG.2.1.2632.5928
40. Jenifer J. S. C. A., Donio M. B. S., Michaelbabu M., Vincent S. G. P., Citarasu T. Haloalkaliphilic *Streptomyces* spp. AJ8 isolated from solar salt works and its' pharmacological potential // *Springer Open Journal.* – 2015. – V. 5. – P. 1–12. doi: 10.1186/s13568-015-0143-2
41. Jiang Y., Li Q., Chen X., Jiang C. Isolation and cultivation methods of Actinobacteria // *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications* / Eds. D. Dhanasekaran, Y. Jiang. – InTech: London, UK, 2016. – P. 39–57.
42. Kashfi R., Kelsey C., Gang D. J., Cal D. R., Gang D. R. Metabolomic diversity and identification of antibacterial activities of bacteria isolated from marine sediments in Hawai'i and Puerto

- Rico // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2020. – V. 7. – P. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00023>
43. Khan S. N., Khan A. U. Breaking the spell: Combating multi-drug resistant ‘Superbugs’ // *Front. Microbiol.* – 2016. – V. 7. – P. 174.
44. Kroppenstedt R. M. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms // *Chemical Methods in Bacterial Systematics* / Eds. M. Goodfellow, D. E. Minnikin. – London: Academic Press, 1985. – P. 173–199.
45. Lewin G. R., Carlos C., Chevrette M. G., Horn H. A., McDonald B. R., Stankey R. J. Evolution and Ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications // *Annu Rev Microbiol.* – 2016. – V. 70, № 1. – P. 235–254. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095748
46. Lin W. P., Lai H. L., Liu Y. L., Chiung Y. M., Shiao C. Y., Han J. M. et al. Effect of melanin produced by a recombinant *Escherichia coli* on antibacterial activity of antibiotics // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* – 2005. – V. 38. – P. 320–326.
47. Maldonado L. A., Fenical W., Jensen P. R., Kauffman C. A., Mincer T. J., Ward A. C. et al. *Salinispora arenicola* gen. nov., and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – V. 55. – P. 1759–1766.
48. Malve H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology // *Journal of pharmacy bioallied sciences.* – 2016. – V. 8. – P. 83–91. doi: 10.4103/0975-7406.171700
49. Manivasagan P., Venkatesan J., Kim S.-K. Introduction to Marine Actinobacteria // *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications* / Ed. Se-Kwon Kim. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. – P. 1–19. <https://doi.org/10.1002/9783527665259.ch01>
50. Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K., Kim S.-K. Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives // *Microbiological Research.* – 2013. – V. 168, № 6. – P. 311–332. doi: 10.1016/j.micres.2013.02.002
51. Maria A. B. F., Sharmili A. S., Anbumalaramathi J. Isolation and characterization of actinomycetes from marine soil // *MOJ Biol*

- Med. – 2018. – V. 3, № 6. – P. 221–225. doi: 10.15406/mo-jbm.2018.03.00103
52. McNabb A., Shuttleworth R., Behme R., Colby W. D. Fatty acid characterization of rapidly growing pathogenic aerobic actinomycetes as a means of identification // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1997. – V. 35, № 6. – P. 1361–1368.
53. MIS Operation Manual. www.midi-inc.com. September. – 2012. – Newark.
54. Parte A. C., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J. P., Reimer L. C., Goker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2020. – V. 70. – P. 5607–5612. doi: 10.1099/ijsem.0.004332
55. Qinyuan Li, Xiu Chen, Yi Jiang, Chenglin Jiang. Cultural, Physiological, and Biochemical Identification of Actinobacteria // *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications* / Eds. D. Dhanasekaran and Yi Jiang. – IntechOpen, 2016. <http://dx.doi.org/10.5772/61462>
56. Ribeiro I., Girão M., Alexandrino D. A. M., Ribeiro T., Santos C., Pereira F. et al. Diversity and Bioactive Potential of Actinobacteria Isolated from a Coastal Marine Sediment in Northern Portugal // *Microorganisms*. – 2020. – V. 8, № 11. – P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111691>
57. Sabido E. M., Tenebro C. P., Suarez A. F. L., Ong S. D. C., Von L. Trono D. J., Amago D. S. et al. Marine sediment-derived *Streptomyces* strain produces angucycline antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* harboring SCCmec type 1 gene // *J Mar Sci Eng* – 2020. – V. 8. – P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/jmse8100734>
58. Salvan R., Sharma V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria // *Microbiological Research*. – 2020. – V. 231. – P. 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>
59. Sasser M. Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters (GC-FAME). Technical Note 101. Newark, DE: MIDI. – 2006.

60. Sathiyaseelan K., Saranraj P. Antagonistic activity of marine actinobacteria – a review // Indo – Asian Journal of Multidisciplinary Research. – 2016. – V. 2, № 4. – P. 698–717.
61. Sayed A. M., Hassan M. H. A., Alhadrami H. A., Hassan H. M., Goodfellow M., Rateb M. E. Extreme environments: Microbiology leading to specialized metabolites // J. Appl. Microbiol. – 2020. – V. 128. – P. 630–657. doi: 10.1111/jam.14386
62. Shaala L. A., Youssef D. T. A., Alzughaibi T. A., Elhady S. S. Antimicrobial chlorinated 3-phenylpropanoic acid derivatives from the Red sea marine actinomycete *Streptomyces coelicolor* LY001 // Mar Drugs. – 2020. – V. 18, № 9. – P. 1–12. <https://doi.org/10.3390/md18090450>
63. Shirling E. B., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1966. – V. 16. – P. 313–340.
64. Silva L. J., Crevelin E. J., Souza D. T., Lacerda-Junior G. V., Oliveira V. M., Ruiz A. L. T. G. et al. Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer discovery // Scientific Reports. – 2020. – V. 10. – P. 1–15. doi: 10.1038/s41598-020-69786-2
65. Solan M., Whiteley N. Stressors in the Marine Environment: Physiological and Ecological Responses / Societal Implications, 2016. – Oxford: Oxford University Press. – P. 70–79.
66. Subramani R., Aalbersberg W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites // Microbiol. Res. – 2012. – V. 167. – P. 571–580.
67. Subramani R., Aalbersberg W. Culturable rare actinomycetes: Diversity, isolation and marine natural product discovery // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – V. 97. – P. 9291–9321.
68. Subramani R., Sipkema D. Marine Rare Actinomycetes: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products // Marine Drugs. – 2019. – V. 17, № 249. – P. 1–35. doi: 10.3390/md17050249
69. Sun W., Zhang F., He L., Karthik L., Li Z. Actinomycetes from the South China Sea sponges: isolation, diversity, and potential for aromatic polyketides discovery // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6. – P. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01048>

70. Tenebro C. P., Trono D. J. Von L., Vicera C. V. B., Sabido E. M., Ysulat J. A., Macaspac A. J. M. et al. Multiple strain analysis of species from Philippine marine sediments reveals intra species heterogeneity in antibiotic activities // Scientific reports. – 2021. – V. 11. – P. 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96886-4>
71. Terahara T., Naemura T., Nampo Y., Kobayashi T., Imada C., Hamada M. et al. *Streptomyces otsuchiensis* sp. nov., a biosurfactant-producing actinobacterium isolated from marine sediment // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2019. – V. 69 – P. 3740–3744. doi 10.1099/ijsem.0.003638
72. Tuttle R. N., Demko A. M., Patin N. V., Kapono C. A., Donia M. S., Dorrestein P. et al. Detection of natural products and their producers in ocean sediments // Appl. Environ. Microbiol. – 2019. – V. 85. – P. 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.02830-18>
73. Ulfah M., Kasanah N., Handayani N. S. N. Bioactivity and genetic screening of marine Actinobacteria associated with red algae *Gelidiella acerosa* // Indonesian Journal of Biotechnology. – 2017. – V. 22, № 1. – P. 13–21. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.25920>
74. Vasyurenko Z. P., Frolov A. F. Fatty Acid composition of bacteria as a chemotaxonomic criterion // J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. – 1986. – V. 30, № 3. – P. 287–293.
75. Velasco-Alzate K. Y., Bauermeister A., Tangerina M. P., Lotufo T. M. C., Ferreira M. J. P., Jimenez P. C. Marine bacteria from Rocas Atoll as a rich source of pharmacologically active compounds // Marine Drugs. – 2019. – V. 17. – P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/md17120671>
76. Vicente J., Stewart A., Song B. Hill R. T., Wright J. L. Biodiversity of actinomycetes associated with caribbean sponges and their potential for natural product discovery // Mar. Biotechnol. – 2013. – V. 15. – P. 413–424.
77. Wang S., Zhou Y., Zhang G. *Nocardioides flavus* sp. nov., isolated from marine sediment // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2016. – V. 66. – P. 5275–5280. doi: 10.1099/ijsem.0.001507
78. Ward A. C., Bora N. Diversity and biogeography of marine actinobacteria // Curr. Opin. Microbiol. – 2006. – V. 9. – P. 279–286.

79. Welch D. F. Applications of cellular fatty acid analysis // Clin. Microbiol. Rev. – 1991. – V. 4. – P. 422–438.
80. Yan C., Xue Q., Chen Z.-Q., Zhang R. Classification and Salt-tolerance of Actinomycetes in the Qinghai Lake Water and Lakeside Saline Soil // Journal of Sustainable Development. – 2009. – V. 2, № 1. – P. 107–110. doi:10.5539/JSD.V2N1P107
81. Yang-Mei Z., Bai-Lian L., Xin-Heng Z., Xiao-Jun H., Hong Y. L., Ying Z. Anandins A and B, Two Rare Steroidal Alkaloids from a Marine *Streptomyces anandii* H41-59 // Marine drugs. – 2017. – V. 15, № 11. – P. 1–9. doi: 10.3390/md15110355
82. Yanti A. H., Setyawati T. R., Kurniatuhadi R. Composition and Characterization of Actinomycetes Isolated from Nipah Mangrove Sediment, Gastrointestinal and Fecal Pellets of Nipah Worm (*Namalycastis Rhodhocorde*) / A. H. Yanti, T. R. Setyawati, R. Kurniatuhadi // International Conference of Mangroves and Its Related Ecosystems: abstract book: OP Conf. Series: Earth and Environmental Science. – 2019. – P. 1–11. doi:10.1088/1755-1315/550/1/012003
83. Yi H., Schumann P., Sohn K. Chun J. *Serinicoccus marinus* gen nov., sp. nov., a novel actinomycete with 1-ornithin and 1-serine in the peptidoglycan // International J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – V. 54. – P. 1585–1589.

РОЗДІЛ 4. АЕРОБНІ СПОРОТВІРНІ БАКТЕРІЇ ГЛИБОКОВОДНИХ ОСАДІВ ЧОРНОГО МОРЯ

Штеніков М.Д., Васильєва Н.Ю., Іваниця В.О.

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082, Україна,
тел.(0482) 68 79 64, e-mail: shtenikovnik@gmail.com

Анотація

З глибоководних відкладень Чорного моря виділено ізоляти споротвірних бактерій, які методом аналізу профілів жирних кислот віднесено до 14 видів родів *Bacillus*, *Paenibacillus* та *Brevibacillus*. Виділені бактерії охарактеризовані за антагоністичною активністю по відношенню до опортуністичних патогенів людини. За результатами скринінгу було відібрано *Bacillus velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559. Загальні характеристики геномів цих бактерій укладаються в діапазон значень, властивий відповідним видам. Методом рідинної хромато-маспектрометрії у бактерій штаму *Bacillus velezensis* ONU 553 виявлено та ідентифіковано 90, *B. pumilus* ONU 554 – 33, *B. subtilis* ONU 559 - 43 екзометаболіти. Серед них виявлено антибіотики класів ліпопептидів та амікумацинів, а також пентапептид GPFPI. Виявлені сполуки, які ідентифіковані для бацил вперше, потребують подальшої верифікації. Для ряду сполук вперше ідентифіковано біосинтетичні генні кластери. Розраховані за профілями жирних кислот індекси термофільності та аналіз амінокислотних спектрів за методом Moura вказують на неаборигенність штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559 для донних відкладень. Виділені і вивчені штами морських бактерій поповнили Колекцію морських мікроорганізмів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, а отримані дані щодо геномів та екзометаболітів морських бактерій можуть слугувати науковою основою для розробки нових фармацевтичних препаратів.

Ключові слова: морські бактерії, батіаль, Чорне море, *Bacillus*, геном, екзометаболом, антагонізм, бактеріоцини, антибіотики

Вступ

Екологія споротвірних бактерій у морському середовищі взагалі та морських донних відкладеннях зокрема залишається маловивченим питанням. Систематична наукова робота в даному напрямку розпочалася відносно недавно, і зроблено в ньому значно менше, у порівнянні із ступенем вивченості мікробіоти ґрунту. Зокрема, загадковими залишаються питання про їх таксономічний склад та закономірності варіювання між мікробіотопами [70, 76, 85, 87, 88].

Зокрема, протягом багатьох років дослідження морських споротвірних бактерій буксували через такий, що важко усувається, систематичний дефект у метагеномних даних, а саме неможливість селективно отримати ДНК з вегетативних клітин та ендоспор (виділення ДНК з ендоспор традиційними методами неможливо) [137]. Ця проблема була вирішена технічно лише у 2013 році. З використанням цього методу для аналізу з'ясувалося, що частка ендоспор серед морських споротвірних бактерій вища за долю вегетативних клітин, тобто в цілому відтворюється ситуація, відома на суходолі – бацили вірні своєму зимогенному способу життя.

Крім того, частка фірмікут взагалі і тим більше споротвірних бактерій у мікробних спільнотах різноманітних біотопів моря рідко перевищує 30%, не сягаючи таких значень, як на суходолі; переважна частина фірмікут в донних відкладеннях представлена видами класу *Clostridia* [46, 47, 68, 82]. Це легко можна пояснити відносно низькою адаптивною перевагою здатності до спороутворення у морському середовищі у порівнянні суходолом, особливо ґрунтами – основним місцем мешкання аеробних споротвірних бактерій. Дане міркування підтримується рядом фактів. Так, серед представників родини *Bacillaceae* відомо кілька родів, що втратили здатність до утворення ендоспор – і це саме морські роди (наприклад, *Marinococcus*) [131]. Також серед морських представників близьких до споротвірних бактерій за всіма іншими ознаками відомо багато штамів з обмеженим або взагалі незареєстрованим спороутворенням [57, 104].

Дані факти роблять актуальним питання про автохтонність споротвірних бактерій для морського середовища. Дуже ймовір-

ним, на перший погляд, є припущення про те, що аеробні споротвірні бактерії є цілком суходільною групою і для морських біотопів є лише компонентами алохтонної біоти. Проте, з початку ХХІ століття було описано ряд видів споротвірних бактерій різного ступеня галофільності, що виділяються з морських та таласогалинних водойм і за даними молекулярної філогенетики утворюють компактний кластер з приблизно двох десятків родів [58]. Дані організми, судячи з усього, є автохтонними саме для морського середовища. Також відомо кілька десятків видів власне роду *Bacillus*, що ізолюються виключно або переважно з моря. Дані факти свідчать про неодноразовий «вихід» споротвірних бактерій у море з наступною адаптацією до проживання в ньому. Питання про кількість таких епізодів виходу лишається відкритим, але його вивчення обіцяє дати в майбутньому багато матеріалу для дослідження явищ молекулярної конвергенції на різних рівнях структури геному.

Одним із небагатьох фактів, що були з'ясовані у відношенні аутоекології, є переважання аеробних споротвірних фірмікут (на противагу протеобактеріям) у донних осадах ізольованих водойм, порівняно із відкритими, та велика кількість спорогенних паличок у донних відкладеннях пересолених глибоководних басейнів. Це досить легко пояснити насиченням донних осадів замкнених водойм матеріалом річкового виносу, що містить багато ендоспор ґрунтових споротвірних бактерій [84, 124].

Ці мікроорганізми регулярно ізолюються з різноманітних морських середовищ, але майже завжди у невеликих кількостях. Це може бути наслідком того, що базові властивості морського середовища – стабільність фізико-хімічних умов у часі та просторі, роблять надлишковим і навіть дезадаптивним головний еволюційний здобуток даної групи, який її і визначає – здатність до утворення ендоспор. Захоронені у донних відкладеннях спори без біотурбації (яка у морі значно менш активна, ніж на суходолі) приречені на тривале зберігання і зрештою – на загибель (значна частка якої є наслідком спонтанного випадкового проростання, до якого схильні ендоспори) [136].

Окремою проблемою є з'ясування сінекологічного аспекту екології морських споротвірних бактерій. Суходольні бактерії да-

ної групи активно вступають у взаємодію з іншими видами, серед них відомі як ефективні паразити тварин, зокрема людини, рослин, так і мутуалісти, зокрема ризобактерії, що сприяють росту рослин (в англomовній літературі відомі як PGPR - plant growth promoting rhizobacteria). Знання щодо сінекології морських споротвірних бактерій, обмежуються головним чином повідомленнями про ізоляцію даних бактерій з організмів інших істот. Зокрема, морські споротвірні бактерії відомі з покривів водоростей, паренхіми губок та кишківників молюсків і голотурій, але точна їх біологічна роль лишається загадковою [65, 73, 79, 99]. Найбільш імовірним виглядає припущення про мутуалістичний характер подібних взаємовідносин, де бацили-симбіонти отримують від господаря біотоп та нутрієнти і натомість надають йому колонізаційної резистентності завдяки своїм антибіотикам широкого спектру.

Головним рушієм досліджень біосинтетичного потенціалу морських мікроорганізмів та споротвірних бактерій зокрема протягом останніх 20 років є виснаження такого потенціалу мікроорганізмів біотопів суходолу на фоні кризи антибіотикорезистентності, про яку в різних контекстах вже згадувалося вище. Зусилля в даному напрямку вже були винагороджені відкриттям нових класів сполук у представників актинобактерій [26, 35].

Біологічно активні сполуки морських споротвірних бактерій можна поділити на дві групи: такі, що доповнюють спектри сполук, представники яких вже відомі для суходільних споротвірних бактерій, та специфічні для морських штамів речовини [110]. До перших належать гагеотетрини – специфічне розширення класу сурфактинів, фенгіцин С, та макролактин W, що відповідно доповнюють родини фенгіцинів та макролактинів [145]. Описано ряд бактеріоцинів, що є представниками вже відомих на суходолі класів, зокрема лантибіотиків, циклічних бактеріоцинів, тіопептидів та гетероциклоантрацинів – підгрупи тіазолвмісних пептидів [28, 31, 43, 106]. До унікальних для морських споротвірних бактерій класів сполук належать гагеостатини, бацилітетрини та маріхізини [143]. Виходячи з великої кількості неідентифікованих біосинтетичних кластерів у даних морських метагеномів та сиквенсів індивідуальних геномів мор-

ських споротвірних бактерій, можна очікувати на значне розширення даного переліку.

Вивчення споротвірних бактерій Чорного представлено поодинокими роботами з другої половини XX сторіччя по сьогодні, головним чином за авторством турецьких та (пост)радянських авторів [72, 90]. Воно розпочалося після обнародування пропозиції Організації Об'єднаних Націй використати глибинні ділянки Чорного моря для заховання радіоактивних відходів. Уже перші роботи показали там високу чисельність та активність чорноморської мікробіоти [72]. Не дивлячись на довгу історію її вивчення, дані про бацил у літературі наводяться, якщо не рахувати роботи авторів даної монографії, головним чином для прибережних зон пелагіалі та шельфу оксигенної зони [1, 5, 7, 8, 9, 61]. Зокрема, наявні повідомлення про виявлення ґрунт-асоційованих споротвірних бактерій; інформація про виявлення саме автохтонних морських бацил в літературі відсутня [43, 141]. Фактично, найбільш добре охарактеризованим на сьогодні аспектом біології чорноморських бацил є їх протеази, що активно вивчаються українськими дослідниками [3, 4]. Серед найцікавіших результатів варто згадати відкриття у 1974 році нового виду *Clostridium durum*, який пізніше на основі комплексу фено- та генотипових ознак (зокрема, факультативної анаеробності) після складної серії перейменувань було віднесено до роду *Paenibacillus* під назвою *P. durus* [56]. Даний штам відомий головним чином через свою здатність до фіксації атмосферного азоту навіть за наявності розчинних нітратів у середовищі.

З аналізу наведеної інформації витікає, що аеробні споротвірні бактерії володіють високим біосинтетичним потенціалом, а мікробіота донних осадів Чорного моря, яка практично не вивчена, може слугувати перспективним джерелом для пошуку споротвірних бактерій-продуцентів нових антимікробних сполук.

Виходячи з викладеного вище, в цьому розділі зосереджено увагу на вивченні біологічної різноманітності та біологічних характеристик аеробних споротвірних бактерій глибоководних донних відкладень Чорного моря та визначення їх генетичного потенціалу щодо продукції антимікробних сполук для пошуку нових антибіотиків.

4.1. Методи дослідження

4.1.1. Використані штами мікроорганізмів

У роботі було використано 130 штамів спортивірних бактерій, ізольованих з проб глибоководних донних відкладень Чорного моря, відібраних з глибини до 2080 метрів в ході експедиції М84/2 Бременського університету на науково-дослідному судні МЕТЕОР: станції 233, 242, 258, 269 та 249 [22] та переданих Б. Г. Александровим з Інституту біології моря НАНУ на кафедру мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ для мікробіологічних досліджень; та зібрані науковим співробітником БННЦ ОНУ Г.В. Лісютіним на науково-дослідному судні «MARE NIGRUM» (Румунія) - станція 116 (Рис. 4.1, табл. 4.1). Кожна проба являла собою циліндричний kern морського ґрунту, який було поділено на фрагменти довжиною по 5 сантиметрів.

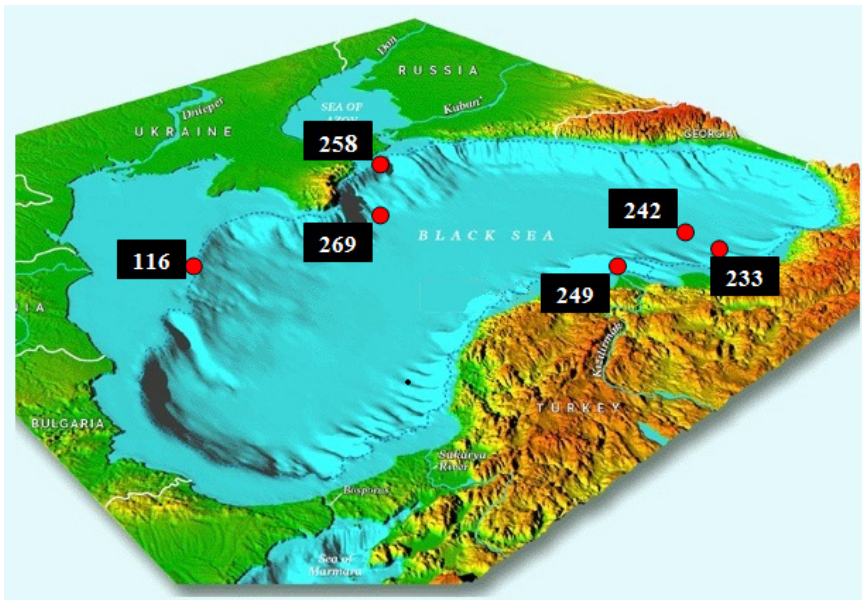


Рис. 4.1. Карта Чорного моря з позначками станцій відбору проб

Таблиця 4.1

Координати станцій відбору проб

Станція	Глибина, м	Координати	
		Широта	Довгота
249	878	N44° 37.386	E 35° 42.164
242	1499	N 41° 31.138	E 37° 37.347
233	1537	N 41° 32.670	E 37° 37.460
258	1888	N 44° 37. 243	E 35° 42.286
269	2080	N 44° 17.329	E 35° 0.081
116	183	N 44° 30.000	E 35° 05.000

Для визначення антагоністичної активності споротвірних бактерій використовували тест-штами умовно-патогенних бактерій *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* B-329, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Bacillus subtilis* ATCC 10774.

Для виділення споротвірних бактерій та визначення їх чисельності наважку донного осаду суспендували у стерильному фізіологічному розчині у співвідношенні 1 до 10 г/л, готували десятикратні розведення в стерильному фізіологічному розчині та висівали на середовище МПА. Культивування проводили за температури 25 °С впродовж двох діб. Для виявлення аеробних споротвірних бактерій приготувану суспензію донного осаду перед посівом на МПА прогрівали за 90 °С впродовж 10 хв.

Бактерії отриманих ізолятів забарвлювали методом Грама та мікроскопіювали з використанням бінокулярного мікроскопа Primo Star PC, Carl Zeiss з використанням імерсійної системи при збільшенні x1350. Робочі культури з виявленими спорами зберігали у пробірках на скошеному агаризованому середовищі МПА за температури 5 °С, а колекційні - за температури -84 °С в середовищі для зберігання з гліцерином.

4.1.2. Скринінг високоактивних антагоністів

Скринінг антагоністів здійснювали за методом радіальних штрихів на середовищі Гаузе-2. Як індикатори для скринінгу та для визначення антагоністичної активності фракцій після хромато-мас-спектрометрії використовували штами: *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* B-329, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Bacillus subtilis* ATCC 10774.

4.1.3. Методи аналізу спектрів жирних кислот

Культивування досліджуваних штамів, виділення та хроматографічне розділення метилових ефірів жирних кислот проводили згідно MIS Operating Manual [33, 103, 108]. Для аналізу жирних кислот бактерії вирощували на середовищі Tryptic soy agar (Merck, Germany) при 28 ± 1 °C впродовж 24 год. Підготовку проб та хроматографічне розділення метилових ефірів жирних кислот здійснювали згідно стандартного протоколу. Першим етапом був лізис клітин з наступним омиленням ліпідів мікроорганізмів. Омилення проводили з додаванням суміші (1 мл 1,125 М розчину NaOH у метанолі) при температурі 95-100 °C впродовж 30 хв. Подальше метилювання жирних кислот здійснювали з додаванням розчину кислого метанолу (2 мл 6,0 N HCl у метанолі) при 80 °C впродовж 10 хв. Екстраговані метилові ефіри жирних кислот нейтралізували 0,3 М розчином NaOH [108].

Визначення ЖК-спектрів виконували методом газової хроматографії з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США), колонка капілярна ULTRA 2 (25 м x 0,2 мм x 0,33 мкм), детектор полум'яно-іонізаційний. Пробу (2 мкл) вводили в режимі split з коефіцієнтом 40:1, температура випаровувача 250 °C. Розділення проводили в режимі програмування температури - початкова температура 170 °C з наступним градієнтом 5 °C/хв до 270 °C. Вміст жирних кислот виражали у відсотках до

загальної суми площ піків. Для ідентифікації досліджуваних штамів використовували бібліотеку RSTBA6 6.2 [108].

Інтерпретацію даних системи Midi Sherlock виконували за значенням найвищого *sim*-індексу з запропонованих системою для кожного штаму, за виключенням випадків, коли *sim*-індекс був занадто низьким (<0,300); в такому випадку штамп вважався як вид, який не визначено.

Підрахунок Heat Adaptation Index виконували за формулою [40]:

$$NAI = \frac{p(n14:0) + p(n16:0) + p(i14:0) + p(i15:0) + p(i16:0) + p(i17:0)}{p(a15:0) + p(a17:0) + p(n16:1) + p(i17:1(n-10)) + p(16:1\omega7calcohol)}$$

де *p* є часткою певної жирної кислоти.

За допомогою онлайн-інструменту за адресою <https://www.alyoung.com/> розраховували індекс Сімпсона для біологічної різноманітності споротвірних бактерій донних відкладень.

4.1.4. Визначення фізіолого-біохімічних властивостей бактерій

Тести на утилізацію гліцеролу, ерітрітолу, D-арабінози, L-арабінози, D-рібози, D-ксилози, L-ксилози, D-адонітолу, Метил-βD-ксілопіранозиду, D-галактози, D-глюкози, D-фруктози, D-маннози, L-сорбози, L-Рамнози, дульцитолу, інозитулу, D-манітолу, D-сорбітолу, метил-αD-маннопіранозиду, метил-αD-глюкопіранозиду, N-ацетилглюкозаміну, амігдаліну, арбутіну, ескулін цитрату феруму, саліцину, D-целобіози, D-мальтози, D-лактози, D-мелібіози, D-цукрози, D-трегалози, інуліну, D-меліцитози, D-рафінози, амілодекстрину, глікогену, ксилітолу, гентиобіози, D-туранози, D-ліксози, D-тагатози, D-фукози, L-фукози, D-арабітолу, L-арабітолу, натрію глюконату, натрію 2-кетоглюконату та натрію 3-кетоглюконату здійснювали з використанням тест-системи API 50CH (bioMérieux, Inc., Marcy l'Etoile, France), згідно з рекомендаціями виробника [102].

Визначення чутливості до антибіотиків еритроміцину, олеандоміцину, ріфампіцину, ампіциліну, тетрацикліну, стрептоміцину, нетілміцину, бензилпеніциліну, канаміцину, оксациліну, цефазоліну, левоміцетину, левофлораксацину, азитроміцину, цефо-

перазону, лінкоміцину, цефалексину, цефіксиму та фурагіну виконували за допомогою тесту Байера-Кірбі на середовищі МПА [2].

4.1.5. Аналіз спектрів моносахаридів

Для визначення загального складу моноцукрів до зразку бактеріальної біомаси об'ємом у дві бактеріологічні петлі додавали 2 мл 2М трифтороцтової кислоти [55]. Гідроліз проводили при 100 °С впродовж 6 год. Гідролізат упарювали, промивали водою для видалення кислоти. Для отримання альдонітрильних похідних моносахаридів до екстракту додавали дериватизуючу суміш (гідроксиламін солянокислий у метанолі). Розчинений екстракт витримували впродовж 25 хв при 75 °С. Після ацетилювання до реакційної суміші додавали 1 мл дихлорметану. Дихлорметановий шар відбирали, висушували та розчиняли в 300 мкл суміші гептан/етилацетат (1:1 о/о).

Моносахариди визначали методом газо-рідинної хромато-мас-спектрометрії на системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent technologies, USA), колонка капілярна HP-5ms (30м×0,25мм ×0,25мкм). Температура випаровувача 250 °С, температура інтерфейсу 280 °С. Розділення проводили в режимі програмування температури - початкову температуру 160 °С витримували впродовж 8 хв, піднімали з градієнтом 5 °С/хв до 240 °С. Кінцеву температуру витримували впродовж 6 хв. Пробу об'ємом 1 мкл, вводили в режимі поділу потоку 1:50. Детектування проводили в режимі SCAN в діапазоні (38-400 m/z). Швидкість потоку газу носія через колонку 1,2 мл/хв. Ідентифікацію проводили за часом утримання стандартів моносахаридів та з використання бібліотеки мас-спектрів NIST 02. Кількісний аналіз проводили шляхом додавання розчину внутрішнього стандарту в досліджувані проби. В якості внутрішнього стандарту використовували розчин сорбітолу.

4.1.6. Аналіз спектрів амінокислот

Для визначення загальної кількості амінокислот дві бактеріологічні петлі бактеріальної біомаси поміщали до віали, додавали 2 мл водного розчину 6N соляної кислоти та поміщали в термостат при 110 °С [62]. Гідроліз проводили впродовж 24 год.

Після чого 0,5 мл відцентрифугованого екстракту/гідролізату упарювали на ротаторному випаровувачі, тричі промиваючи дистильованою водою для видалення соляної кислоти. Ресуспендували в 0,5 мл дистильованої води та фільтрували крізь мембранні фільтри з регенованої целюлози з порами 0,2 мкм. Отримання флуоресцентних похідних проводили в автоматичному програмованому режимі перед введенням проби в хроматографічну колонку з використанням OPA (orthophthalaldehyde) та FMOС (9-fluorenylmethylchloroformate). Амінокислоти визначали методом газо-рідинної хромато-мас-спектрометрії на системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent technologies, USA), колонка капілярна HP-5ms (30м×0,25мм×0,25мкм). Ідентифікацію амінокислот проводили шляхом порівняння часу утримання з стандартною сумішшю амінокислот (Agilent 5061-3334). Кількісна оцінка рангової кореляції між рядами спадання вмісту для амінокислот була виконана з використанням тесту Кендела, реалізованого в бібліотеці ScyPy мови програмування Python [12, 132].

4.1.7. Аналіз спектрів екзометаболітів

Визначення спектру екзометаболітів виконували за методом [98], для цього бактерії вирощували в триптоно-соєвому бульйоні (Sigma-Aldrich) та середовищі М наступного складу: соєва мука – 20 г/л, картопляний крохмаль – 3 г/л, екстракт дріжджів – 1 г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1 г/л, MgSO_4 – 1 г/л, KH_2PO_4 – 0,6 г/л, рН 7,0 протягом 7 діб на шейкері за температури 28 °С за частоти обертання 180 об/хв. Екзометаболіти з культуральної рідини досліджуваних штамів екстрагували етилацетатом та бутанолом у співвідношенні 1:1, упарювали досуха та розчиняли в метанолі для подальших маніпуляцій. Отримані загальні екстракти фракціонували методом колонкової гель-фільтраційної хроматографії з використанням колонки довжиною 1 м, заповнені LH 20 Sephadex (Sigma-Aldrich). Елюцію здійснювали метанолом в якості рухомої фази за швидкості потоку один мл/хв. Фракції збирали кожні 15 хв, концентрували шляхом випаровування та розчиняли в 0,5 мл метанолу.

Компонентний склад загальних екстрактів та їх активних фракцій аналізували методом рідинної хромато-мас-спектрометрії

високої роздільної здатності на рідинному хромато-мас-спектрометрі amaZone (Brucker, Daltonics), колонка ВЕН C18 50×2.1 мм, 1.7мкм (Waters, Germany), рухома фаза А – вода з 0,1% мурашиної кислоти та В – ацетонітрил з 0,1% мурашиної кислоти. Використовували лінійний градієнт від 5 до 95% впродовж 9 хв. Кожна отримана фракція була протестована на предмет антимікробної активності.

4.1.8. Методи виділення та секвенування геномної ДНК

Виділення ДНК здійснювали за модифікованим методом [36]. Для очищення виділеної загальноклітинної ДНК від домішок РНК до ресуспендованої проби додавали 20 мкл попередньо активованої РНКазі з концентрацією 5 мкг/мл. Проби витримували при 37 °С впродовж 3-4 год, суміш повільно перемішували з інтервалами в 30 хв. Аналіз якості та чистоти виділеної ДНК проводили на нанодропі Denovix DS-11FX+ та з використанням горизонтального електрофореза в 1,5% агарозному гелі при постійній напрузі в 150 В впродовж 40 хв. Всі використані реагенти були від Sigma, ферменти – від New England Biolabs. Секвенування ДНК було виконано в Інституті фармацевтичних досліджень Гельмгольца землі Саар. Отриману геномну ДНК секвенувано з використанням двох бібліотек з короткою та довгою вставкою на приладі HiSeq 1500 (Illumina).

4.1.9. Збірка та аналіз загальних характеристик геномів

Збірка рідів *de novo* виконана з використання асемблеру Newbler (версія 2.8, Roche). Для визначення виду на основі даних гену 16S рРНК та повногеномного порівняння використовували інструмент TYGS [86], пошук секреторних сигналів у первинній структурі обраних протеїнів - Signal IP [14]. Обрахування OrthoANI виконували за допомогою Ezbiocloud [139] та програми OAT [74]; для обрахування GGDC застосували також програми OAT. Анотування геному виконували за допомогою серверів PATRIC [133] та NCBI PGAP [126], порівняльний аналіз - SEED [96] та BEACON [64].

Пошук та аналіз кластерів біосинтетичних генів здійснили за допомогою antiSMASH [21], PRISM 3 [116], Bagel4 [129] та

BiG-SCAPE [92]. Пошук детермінант патогенності виконували за допомогою IslandViewer [20] та VirulenceFinder 2.0 [63], для пошуку детермінант резистентності використано ResFinder [142], профагових елементів – FASTER [15], Phigaro [120] та PhageWeb [119]. Реконструкцію метаболітів за даними конкретного кластеру виконували для всіх кластерів, окрім трансАТ-ПКС, за допомогою PRISM 3 [116], а для кластерів трансАТ-ПКС - з використанням TransATog [59]. Експериментально верифіковані референтні генетичні кластери були взяті з бази даних MiBIG [67]. Візуалізацію гомології для біосинтетичних кластерів здійснили за допомогою Easyfig [121] та Mauve [34]. За результатами PATRIC будували карту геному засобами цього сервера.

4.2. Мікробіота глибоководних донних відкладень Чорного моря

4.2.1. Чисельність споруутворювальних бактерій

Проведені дослідження виявили складний характер залежності чисельності мезофільних і психрофільних бактерій та ендоспор в їх популяціях від рівня горизонту та географічних точок відбору зразків донних відкладень.

Загальне мікробне число (ЗМЧ) та кількість ендоспор демонструють різні картини розподілу по горизонтах (табл. 4.2, 4.3). Так, ЗМЧ як психрофілів так і мезофілів приблизно лінійно ростуть з глибиною, що суперечить усталеним знанням про вертикальний розподіл мікроорганізмів у донних відкладеннях морських водойм. На станції 242 виявлено два піки чисельності мезофілів, пояснити які важко через відсутність у наданих нам даних експедиції Бременського університету щодо геологічної структури керну з цієї станції (рис. 4.2). Висока концентрація мезофілів також відмічена на станції 258, горизонті 30-35, що складається з карбонату як цементуючого компоненту, а не вкраплень. Пік цих бактерій на горизонті 45-50 станції 269 (10^7 КУО/г) розташований у зразку в прошарку сапропелю. Відомо, що сапропель через свою насиченість слабко окисненими сполуками вуглецю має високу концентрацію мікроорганізмів до 10^7 КУО/г [123], а в нашому випадку цей показник перевищено на порядок.

Динаміка вмісту психрофілів дещо співпадає з відміченими тенденціями для мезофілів, хоча відсутній пік на станції 242 у горизонті 25-30, натомість виражений на горизонті 20-25 (рис. 4.3).

Вміст ендоспор психрофілів, в то же час, демонструє щось на зразок параболическої залежності від глибини горизонту, хоча на глибинах біля 50 см їх концентрації також значно вищі за поверхневі (рис. 4.5). Концентрація ендоспор мезофілів натомість мало залежить від глибини та станції, помітні лише кілька піків на станціях 242 та 269 (горизонт 20-25 см), 258 (35-40 см) та 269, горизонт 45-50 см (рис. 4.4). Ці максимуми вже відповідають чисельності мезофілів без урахування здатності до утворення ендоспор. Динаміка концентрації ендоспор психрофілів важко піддається поясненню. Можливо, це свідчить про наявність у чорноморських донних відкладеннях значної популяції автохтонних ендоспороутворювальних бактерій.

Інтерпретація отриманих даних з точки зору характеру мікробіоти різних типів відкладень та геологічної історії седиментогенезу потребує певної обережності з ряду причин. Самі керни мають тонку шарувату структуру, але потужність окремих шарів (глина, піщані відкладення, кокколіти, сапропель) сягає лише кількох міліметрів, в той час як відбір проб проводився кожні 5 см. Крім того, за спостереженнями учасників німецької експедиції, гази, що виділялися з донних відкладень, часто порушували природню шаруватість, що також додає певної умовності отриманим результатам.

Отримані результати цілком підтверджують відоме спостереження щодо переважання аспорогенних форм над спорогенними у морських донних відкладеннях [45,107]. Відношення ЗМЧ мезофілів та психрофілів до вмісту ендоспор відповідних фізіологічних груп мало залежать від горизонту практично на всіх станціях та тримаються на рівні 20 (рис. 4.6 та 4.7).

Окремі випадки перевищення цього показника характерні для горизонту 25-35 см станції 258, де наявний потужний шар глини. Цей ефект спостерігається як для психрофілів, так і мезофілів. Це супроводжується відносно низькою концентрацією ендоспор у даних пробах. Можна припустити, що ця глина була нанесена з річковим стоком під час розмиву певних масивів глини

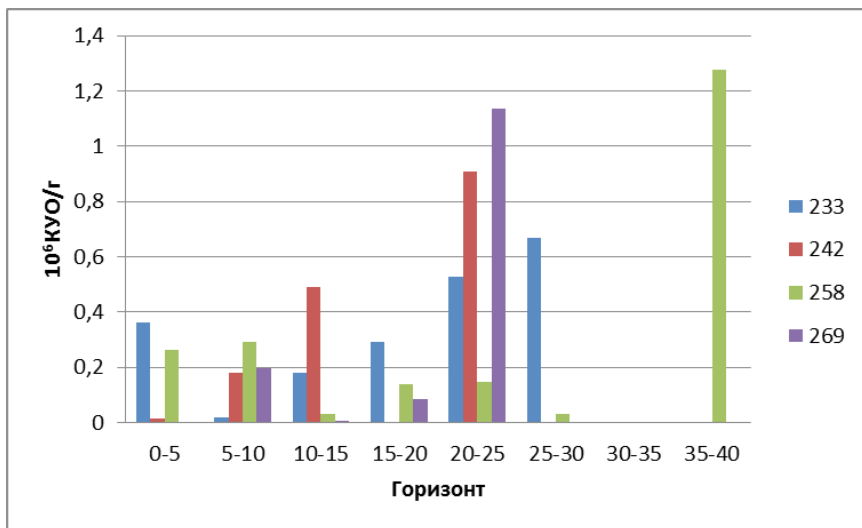


Рис. 4.2. Вміст вегетативних клітин мезофілів на різних горизонтах осаdів

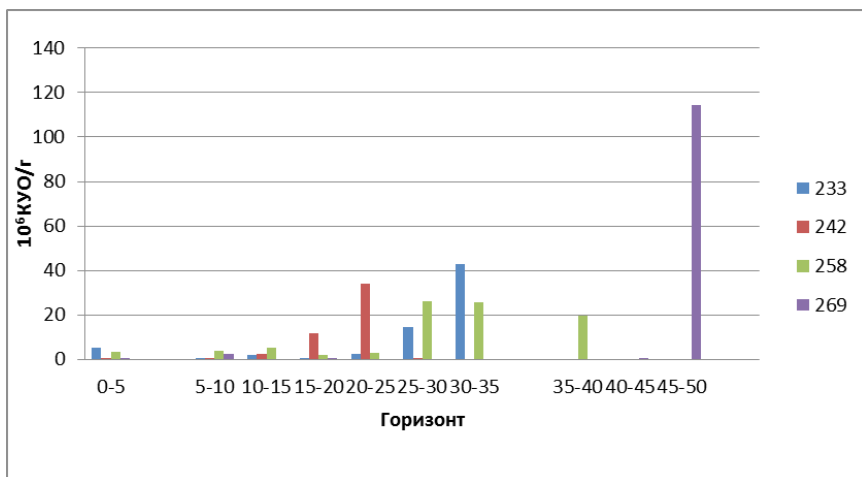


Рис. 4.3. Вміст вегетативних клітин психрофілів на різних горизонтах осаdів

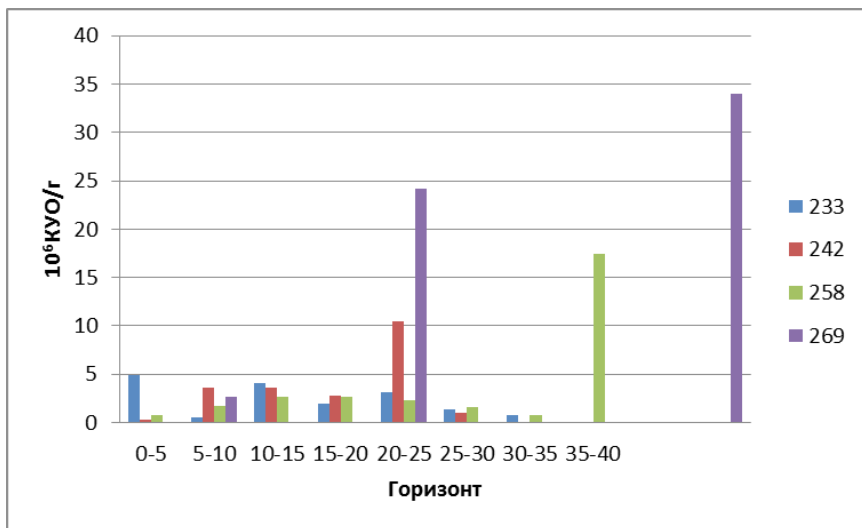


Рис. 4.4. Вміст ендоспор мезофілів на різних горизонтах осадів

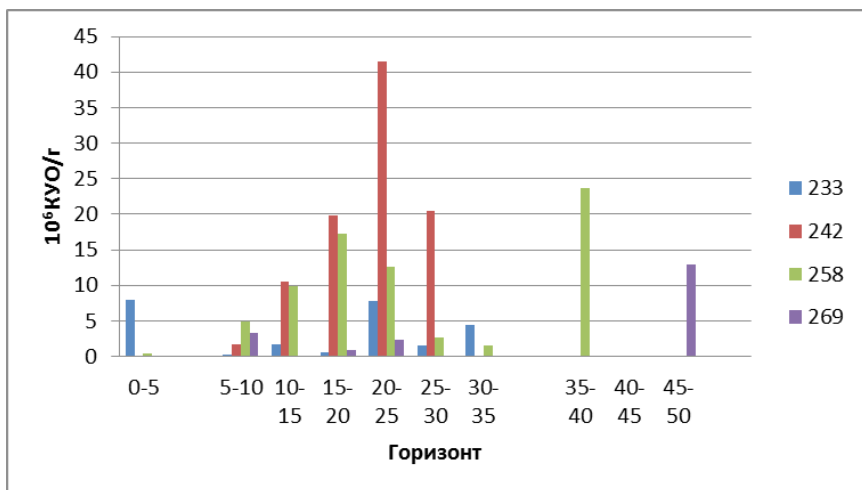


Рис. 4.5. Вміст ендоспор психрофілів на різних горизонтах осадів

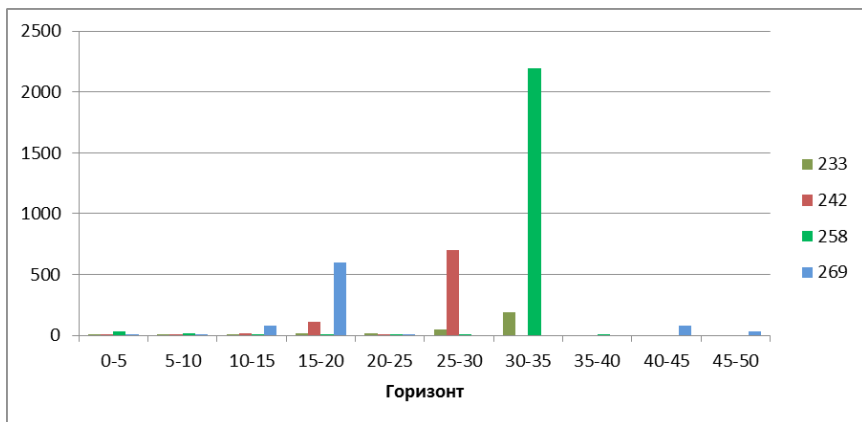


Рис. 4.6. Співвідношення ЗМЧ мезофілів та вмісту ендоспор мезофілів

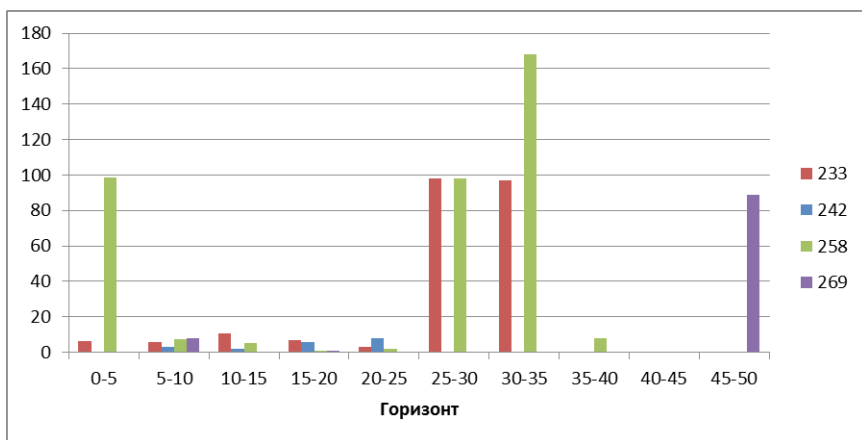


Рис. 4.7. Відношення ЗМЧ психрофілів до вмісту ендоспор психрофілів

Таблиця 4.2
Чисельність ендоспор мезофілних бактерій у донних відкладеннях Чорного моря

Горизонт, см	Станція 233		Станція 242		Станція 258		Станція 269	
	ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори
0-5	$3,64 \times 10^5 \pm 6158$	$4,97 \times 10^4 \pm 322$	$1,58 \times 10^4 \pm 249$	$3,58 \times 10^3 \pm 12$	$2,65 \times 10^5 \pm 840$	$7,84 \times 10^3 \pm 67$	$1,4 \times 10^3 \pm 4$	$6 \times 10^1 \pm 3$
5-10	$1,86 \times 10^4 \pm 38$	$4,94 \times 10^3 \pm 39$	$1,8 \times 10^5 \pm 1067$	$3,57 \times 10^4 \pm 95$	$2,93 \times 10^5 \pm 2704$	$1,76 \times 10^4 \pm 72$	$1,96 \times 10^5 \pm 7$	$2,64 \times 10^4 \pm 51$
10-15	$1,82 \times 10^5 \pm 2407$	$4,06 \times 10^4 \pm 284$	$4,9 \times 10^5 \pm 5335$	$3,6 \times 10^4 \pm 135$	$3,11 \times 10^4 \pm 96$	$2,61 \times 10^4 \pm 95$	$8 \times 10^4 \pm 234$	$1 \times 10^2 \pm 3$
15-20	$2,92 \times 10^5 \pm 2202$	$2 \times 10^4 \pm 165$	$3,13 \times 10^7 \pm 149422$	$2,73 \times 10^4 \pm 65$	$1,4 \times 10^5 \pm 1082$	$2,64 \times 10^4 \pm 75$	$8,4 \times 10^4 \pm 3409$	$1,4 \times 10^2 \pm 3$
20-25	$5,28 \times 10^5 \pm 4667$	$3,13 \times 10^4 \pm 308$	$9,1 \times 10^5 \pm 3485$	$1,04 \times 10^5 \pm 551$	$1,46 \times 10^5 \pm 884$	$2,27 \times 10^4 \pm 122$	$1,13 \times 10^5 \pm 8562$	$2,42 \times 10^5 \pm 922$
25-30	$6,68 \times 10^5 \pm 7137$	$1,39 \times 10^4 \pm 81$	$7,16 \times 10^6 \pm 83727$	$1,02 \times 10^4 \pm 51$	$3,27 \times 10^4 \pm 200$	$1,58 \times 10^4 \pm 93$	0	0
30-35	$1,40 \times 10^6 \pm 10083$	$7,38 \times 10^3 \pm 33$	#	#	$1,77 \times 10^7 \pm 77439$	$8,06 \times 10^3 \pm 71$	#	#
35-40	#	#	#	#	$1,28 \times 10^6 \pm 23023$	$1,74 \times 10^5 \pm 1222$	#	#
40-45	#	#	#	#	#	#	$2 \times 10^4 \pm 524$	$2,6 \times 10^2 \pm 3$
45-50	#	#	#	#	#	#	$1,14 \times 10^7 \pm 153513$	$3,4 \times 10^5 \pm 890$

- проби з цього горизонту відсутні

Таблиця 4.3

Чисельність ендоспор психролерантних бактерій у донних відкладеннях Чорного моря

Горизонт	Станція 233		Станція 242		Станція 258		Станція 269	
	ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори
0-5	$5 \times 10^5 \pm 7315,5$	$7,88 \times 10^4 \pm 659,3$	$4,6 \times 10^3 \pm 18$	0	$3,41 \times 10^5 \pm 1351$	$3,45 \times 10^3 \pm 62$	$2 \times 10^1 \pm 1$	$6 \times 10^2 \pm 2$
5-10	$1,64 \times 10^4 \pm 53$	$2,9 \times 10^3 \pm 13$	$5,4 \times 10^4 \pm 983$	$1,69 \times 10^4 \pm 79$	$3,58 \times 10^5 \pm 1395$	$4,86 \times 10^4 \pm 284$	$2,6 \times 10^5 \pm 2030$	$3,24 \times 10^4 \pm 114$
10-15	$1,82 \times 10^5 \pm 2407$	$1,68 \times 10^4 \pm 58$	$2,22 \times 10^5 \pm 2670$	$1,05 \times 10^5 \pm 842$	$5,02 \times 10^5 \pm 2642$	$9,8 \times 10^4 \pm 585$	0	0
15-20	$4,4 \times 10^4 \pm 425$	$6,28 \times 10^3 \pm 20$	$1,14 \times 10^6 \pm 8175$	$1,98 \times 10^5 \pm 1817$	$1,83 \times 10^5 \pm 684$	$1,72 \times 10^5 \pm 448$	$7,5 \times 10^3 \pm 420,6$	$8,88 \times 10^3 \pm 76,1$
20-25	$2,48 \times 10^5 \pm 2238$	$7,83 \times 10^4 \pm 860$	$3,39 \times 10^6 \pm 8540$	$4,15 \times 10^5 \pm 1700$	$2,87 \times 10^5 \pm 701$	$1,26 \times 10^5 \pm 1478$	0	$2,36 \times 10^4 \pm 16,4$
25-30	$1,44 \times 10^6 \pm 6087$	$1,47 \times 10^4 \pm 325$	$1,02 \times 10^4 \pm 51$	$2,05 \times 10^5 \pm 685$	$2,61 \times 10^6 \pm 9339$	$2,67 \times 10^4 \pm 89$	0	0
30-35	$4,27 \times 10^6 \pm 21655,5$	$4,4 \times 10^3 \pm 490,5$	#	#	$2,55 \times 10^6 \pm 8835$	$1,51 \times 10^4 \pm 86$	#	#
35-40	#	#	#	#	$1,94 \times 10^6 \pm 5892$	$2,36 \times 10^5 \pm 830$	#	#
40-45	#	#	#	#	#	#	$4 \times 10^3 \pm 250$	0
45-50	#	#	#	#	#	#	$1,14 \times 10^7 \pm 122459$	$1,29 \times 10^5 \pm 2821$

- проби з цього горизонту відсутні

і тому вони, на відміну від ґрунтових виносів, збіднені на ендоспори.

Цей показник для психрофілів демонструє схожу картину – нечисленні пікові значення на рівномірному фоні, частина піків збігається з такими для мезофілів, але в цілому їх більше. Видимий «сапропельний» пік на станції 269 (горизонт 45-50) та пік на станції 258 (горизонт 0-5 см) – співпадають з зоною кокколітового мулу, який на цьому горизонті властивий усім пробам.

Отримані результати загальної чисельності гетеротрофних бактерій узгоджуються з даними інших авторів. Відомо, що чисельність бацил у відносно замкнутих водоймах і гіпооксигенних водах вище, ніж у відкритих оксигенних [101]. Ймовірно, виявлений розподіл мікробіоти донних відкладень моря відповідає цій залежності [9,107].

Для пояснення встановлених фактів, які носять ймовірно стохастичний характер, необхідно провести масштабні дослідження мікроорганізмів різних таксономічних груп з різних районів моря та провести їх ідентифікацію, з підключенням метагеномних досліджень. Тільки детальне з'ясування структури мікробіоти донних відкладень у співставленні їх з гідрологічними, гідрохімічними та кліматичними умовами в часовому вимірі дасть можливість певною мірою впевнено судити про характер та причини зміни її чисельності з глибиною та координатами станції.

Інформації щодо розподілу мікробного населення донних відкладень дуже мало, а щодо Чорного моря взагалі відсутня у вільному доступі. Це може бути пов'язано активним вивченням мікробіоти глибоко захоронених донних відкладень (нижче метра від поверхні дна). Проте в поодиноких дослідженнях виявлена крива залежності вмісту бактерій від глибини в осадах, подібна отриманій в нашій роботі [32, 52].

4.2.2. Видова різноманітність споротвірних бактерій

Ідентифікацію ізольованих гетеротрофних споротвірних бактерій здійснювали методом хемотаксономії з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США) шляхом порівняння спектрів жирних кислот з наявними спектрами в автоматичній системі.

Виявлено, що різноманітність досліджуваних бактерій донних відкладень описується класичним розподілом: є менша кількість більш чисельних видів та велика кількість менш чисельних видів. Індекс Сімпсона виявився рівним 0,1, що свідчить про низьке біологічне різноманіття даного угруповання.

Таблиця 4.4

Видова різноманітність досліджуваних споротвірних бактерій

Вид	Частка, %
<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A	17,91
<i>Bacillus subtilis</i>	14,18
<i>Brevibacillus reuszeri</i>	14,18
<i>Bacillus viscosus</i>	11,94
<i>Bacillus licheniformis</i>	8,96
<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup B	5,22
<i>Bacillus</i> sp. GC group 22	4,48
<i>Bacillus atrophaeus</i>	3,73
<i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A	3,73
<i>Bacillus luciferensis</i>	2,24
<i>Bacillus halmapalus</i>	1,49
<i>Paenibacillus larvae</i>	0,75
<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup A	0,75
<i>Brevibacillus choshinensis</i>	0,75
<i>Bacillus oleronius</i>	0,75
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> GC subgroup B	0,75
Невизначені штами	8,46
Разом	100

Близько 45% усіх ізолюваних та ідентифікованих штамів належать до трьох видів – *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* та *Brevibacillus reuszeri* (табл. 4.4). Всі ці види звичайно виділяються з ґрунту та є аеробними [37, 53]. З трійки видів споротвірних бактерій, до якої входять *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, що звичайно домінують у морському середовищі, в досліджених донних відкладах важливе місце посідає саме *B. subtilis* [13]. Важливо також відмітити високу подібність кількісного та якісного складу штамів, виділених з різних станцій, що знаходяться на великій глибині. Натомість *B. pumilus* та *B. cereus* представлені 5 та 1 штамом, відповідно, що в сумі складає 4,6% від загального числа.

Незвично виглядає велика різниця у частотах виділення між штамми *Bacillus megaterium* різних GC груп, що сягає майже 23%. Цікавою обставиною є висока частка виділення *Bacillus* sp. GC group 22, який не може бути ідентифікованим до виду за допомогою використаної версії системи MIDI Sherlock. Деякі дослідники ідентифікують такі штами як *Bacillus firmus* [61, 135].

Несподіваним фактом є виділення з проб різних станцій трьох штамів *Bacillus luciferensis*, типовий штам якого було виділено у 1997 році з вулканічного ґрунту на Південних Сендвічевих островах (Субантарктика) [80].

Залежність видового різноманіття від горизонту показує їх певну одноманітність за видовими спектрами (табл. 4.5).

Два з найбільш чисельних видів – *Bacillus megaterium* та *Bacillus subtilis* представлено на всіх горизонтах, окрім одного (25-30 см) у випадку першого і на всіх, окрім двох (25-30 та 30-35 см), для другого. Цікаво, що третій з «трійки лідерів» за чисельністю в колекції вид *Brevibacillus reuszeri* виявлено лише на трьох горизонтах (0-5, 5-10 та 15-20 см). Можна припустити, що видове різноманіття пулу ендоспор поступово знижується з глибиною і, відповідно, з віком донних відкладень.

Так, на першому горизонті (0-5 см) виявлено 4 унікальних (не виявлених на інших горизонтах) види (а саме *Bacillus megaterium* GC subgroup B, *Bacillus luciferensis*, *Bacillus oleronius* та *Lysinibacillus sphaericus* GC subgroup B) та 6 неідентифікованих ізолятів. На горизонті 5-10 см унікальних видів вже 2 (*Paenibacillus larvae* та *Bacillus cereus* GC subgroup A), а неви-

**Таксономічний склад споротвірних бактерій
на різних горизонтах донних осадів**

Горизонт, см	Вид
0-5	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup B, <i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A, <i>Brevibacillus reuszeri</i> , <i>Bacillus</i> sp. GC group 22, <i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A, <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus viscosus</i> , <i>Bacillus luciferensis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus oleronius</i> , <i>Lysinibacillus sphaericus</i> GC subgroup B, 6 неідентифікованих штамів.
5-10	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus viscosus</i> , <i>Paenibacillus larvae</i> , <i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A, <i>Bacillus atrophaeus</i> , <i>Brevibacillus reuszeri</i> , <i>Bacillus cereus</i> GC subgroup A, 3 неідентифікованих штами.
10-15	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i> , <i>Bacillus</i> sp. GC group 22, <i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A, <i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A
15-20	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Brevibacillus choshinensis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A, <i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A, <i>Brevibacillus reuszeri</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus halmapalus</i>
20-25	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A, <i>Bacillus atrophaeus</i>
25-30	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus</i> sp. GC group 22, <i>Bacillus subtilis</i>
30-35	<i>Bacillus</i> sp. GC group 22, <i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A, <i>Bacillus viscosus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>
45-50	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A, <i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A, <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>

Видові патерни спорогвірних бактерій з різних станцій

Станція 233		Станція 242		Станція 258		Станція 269	
Вид	%	Вид	%	Вид	%	Вид	%
<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A	18,75	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	20,50	<i>Bacillus subtilis</i>	18,20	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A	50
<i>Brevibacillus reuszeri</i>	18,75	<i>Bacillus subtilis</i>	15,40	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A	15,20	<i>Bacillus licheniformis</i>	10
<i>Bacillus viscosus</i>	15,0	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A	12,80	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup B	15,20	<i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A	10
<i>Bacillus licheniformis</i>	13,0	<i>Bacillus viscosus</i>	12,80	<i>Bacillus</i> sp. GC group 22	12,10	<i>Bacillus subtilis</i>	10
<i>Bacillus subtilis</i>	13,0	<i>Bacillus licheniformis</i>	7,70	<i>Bacillus viscosus</i>	9,0	<i>Bacillus viscosus</i>	10
<i>Bacillus atrophaeus</i>	6,0	<i>Bacillus luciferensis</i>	5,10	<i>Bacillus licheniformis</i>	6,10	<i>Lysinibacillus</i> <i>sphaericus</i> GC subgroup B	10
<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup B	4,0	<i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A	5,10	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	6,10	-	-
<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup A	2,0	<i>Bacillus atrophaeus</i>	2,60	<i>Bacillus</i> <i>atrophaeus</i>	3,0	-	-
<i>Bacillus</i> sp. GC group 22	4,0	<i>Bacillus</i> sp. GC group 22	2,60	<i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A	3,0	-	-
<i>Bacillus luciferensis</i>	2,0	<i>Bacillus oleronius</i>	2,60	<i>Brevibacillus</i> <i>choshinensis</i>	3,0	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A	2,0	-	-	<i>Paenibacillus</i> <i>larvae</i>	3,0	-	-
Не визначено	4,0	Не визначено	12,8	Не визначено	6,10	-	-

значених - три. Серед більш глибоких горизонтів унікальні види (*Brevibacillus choshinensis* та *Bacillus halmapalus*) виявлено лише на горизонті 15-20 см [61].

При порівнянні між собою розподілів видів по окремих станціях помітним стає факт великої їх схожості (табл. 4.6). В усіх випадках *Bacillus megaterium* GC subgroup A входить до трійки найбільш численних представників. Цей факт знаходить підтвердження при порівнянні між собою індексів різноманітності Сімпсона, розрахованих для станцій 233, 242, 258 та 269, які дорівнюють, відповідно, 0,1; 0,1; 0,08 та 0,2, тобто практично не відрізняються.

Видову приналежність 11 досліджуваних штамів за порівнянням спектрів жирних кислот, наявних в автоматичній системі, встановити не вдалося. Це може свідчити про те, що можливо вони відносяться до ще невідомих науці видів, і можуть слугувати цікавими об'єктами для подальших досліджень.

Таким чином, всі штами аеробних споротвірних бактерій, виділені в ході дослідження з донних відкладень Чорного моря, належать до видів, що відомі з суходолу чи мають космополітичне поширення. Виходячи з їх чисельності у донних осадах та екстремальних умов в місцях їх виявлення можна припустити, що найбільш ймовірно вони відносяться до алохтонної мікробіоти, яка сформувалася шляхом виносу споротвірних бактерій з біотопів суходолу в море з наступним осіданням на дно і захороненням у товщі морських осадів, де завдяки високій стійкості ендоспори довгий час можуть зберігати життєздатність. Зібрана колекція культур споротвірних бактерій, яка включена до складу Колекції морських та практично корисних мікроорганізмів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, може слугувати перспективним джерелом для подальших пошуків продуцентів біологічно активних сполук.

4.3. Антимікробна активність спороутворювальних бактерій

Більшість досліджень, що фокусуються на пошуку продуцентів антибіотиків, стосуються мікроорганізмів ґрунту. Морське середовище є значно менш дослідженим у цьому плані, і може слугувати перспективним джерелом для пошуку нових проду-

центів для біотехнологічних досліджень. Особливо це стосується такого специфічного за своїми екстремальними умовами регіону Світового Океану, як Чорне море, в якому вода з глибини 100-150 м насичена сірководнем і характеризується глибоко анаеробними умовами, що робить цю водойму унікальною [113, 141]. Виходячи з цього, можна очікувати на виявлення у цьому середовищі нових антимікробних механізмів та продуцентів нових антибіотиків. Пошук та розробка нових антимікробних препаратів може мати велике значення для боротьби з полірезистентними збудниками інфекційних захворювань [32, 81].

Вивчення антагоністичної активності природних ізолятів бактерій цікаве не лише з прикладної, але і з фундаментальної точки зору – це дає уявлення про характер та ступінь вираженості конкурентних відношень у біотопі, з якого виділені ці бактерії-антагоністи [52, 81].

При проведенні дослідження виділених та ідентифікованих 247 ізолятів споротвірних бактерій антагоністично активними виявилися 79, що становить близько 32%. З таблиці 4.7 видно, що найбільш активними досліджувані штами були до *Candida albicans* ATCC 10231 (середній розмір зон інгібування росту - 21,75 мм), *Proteus vulgaris* ATCC 6896 (20,72 мм) та *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (16,53 мм). Найменш чутливими виявилися тест-штами *Pseudomonas aeruginosa* B-329 (6,52 мм), *Escherichia coli* ATCC 25922 (8,56 мм), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 (8,79 мм) [113].

Встановлено високий ступінь антагонізму споротвірних бактерій до грам-позитивних бактерій *S. aureus* та *B. cereus*. Частка активних бактерій по відношенню до них сягає 89% та 85%, відповідно, серед усіх активних штамів. Антагонізм до представників ентеробактерій (*Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) дорівнював, відповідно, 68, 60 та 51%. На найнижчому рівні була антагоністична активність по відношенню до *Pseudomonas aeruginosa*. Характерною деталлю є суттєва різниця між середньою антагоністичною активністю досліджуваних штамів по відношенню до індикаторних штамів *B. cereus* та *B. subtilis*. Найбільшу активність серед усіх ідентифікованих видів (86%) виявили представники видів *P. larvae*, *P. macerans* та

Таблиця 4.7

Антимікробна активність ізолюваних спорогвірних бактерій з глибоководних відкладень Чорного моря

Вид, штам	Станція, горизонт (см)	1*	2	3	4	5	6	7	8	9
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>B. licheniformis</i> 055	233, 0-5	3,0	4,0	4,0	5,0	0,0	2,0	3,0	3,0	3,0
<i>B. megaterium</i> 955	233, 0-5	24,0	0,0	34,0	7,0	29,0	0,0	6,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i> 219	233, 5-10	24,0	0,0	32,0	13,5	27,0	5,0	6,5	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i> 211	233, 5-1	32,5	0,0	35,0	17,0	35,0	6,0	17,5	8,5	0,0
<i>B. subtilis</i> 203	233, 5-10	29,0	0,0	35,0	13,5	25,0	8,0	13,0	8,0	0,0
<i>B. subtilis</i> 204	233, 5-10	32,0	0,0	35,0	15,0	30,0	11,0	11,5	2,0	2,5
<i>B. atrophaeus</i> 200	233, 5-10	35,0	2,5	35,0	19,0	35,0	7,0	21,0	9,0	0,0
<i>B. cereus</i> 213	233, 5-10	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i> 212	233, 5-10	32,0	0,0	35,0	14,5	35,0	7,5	15,0	4,0	0,0
<i>B. atrophaeus</i> 010	233, 10-15	5,0	3,5	4,0	10,0	5,0	5,0	2,5	1,0	0,0
<i>B. licheniformis</i> 043	233, 15-20	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. licheniformis</i> 014	233, 15-20	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. pumilus</i> 002	233, 15-20	0,0	0,0	8,0	6,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. pumilus</i> 004	233, 15-20	3,5	3,5	5,0	9,5	0,0	4,0	3,0	2,0	2,0
<i>B. megaterium</i> 003	233, 15-20	0,0	0,0	7,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
<i>B. licheniformis</i> 012	233, 15-20	0,0	0,0	6,5	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10
<i>B. licheniformis</i> 99B	233, 20-25	0,0	0,0	2,5	10,5	5,0	0,0	0,0	0,0	6,5
<i>B. atrophaeus</i> 99A	233, 20-25	3,5	0,0	0,0	14,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0
<i>B. licheniformis</i> 005	233, 25-30	0,0	0,0	10,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. licheniformis</i> 001	233, 30-35	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i> 920	233, 0-5	-**	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	-	9,0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 921	233, 0-5	-	11,0	10,0	-	11,0	11,0	-	-	12,0
<i>B. pumilus</i> 99A	258, 0-5	33,0	0,0	30,0	14,0	35,0	5,0	18,5	10,0	0,0
<i>B. megaterium</i> ONU 554	258, 0-5	35,0	0,0	36,0	29,0	0,0	5,0	0,0	3,0	32,0
<i>B. pumilus</i> 232	258, 5-10	0,0	0,0	5,0	3,5	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>P. larvae</i> 018	258, 5-10	25,5	0,0	30,0	15,5	26,5	4,0	7,5	8,5	5,0
<i>P. larvae</i> 019	258, 5-10	5,5	0,0	0,0	14,5	0,0	3,5	0,0	0,0	6,5
<i>B. subtilis</i> 231	258, 5-10	35,0	5,0	35,0	16,0	28,0	7,5	18,0	9,0	8,0
<i>B. subtilis</i> 217	258, 5-10	27,5	3,0	35,0	16,5	35,0	9,0	10,0	7,5	0,0
<i>B. subtilis</i> 247	258, 10-15	19,5	2,0	28,0	15,0	22,0	9,5	10,5	10,0	0,0
<i>B. atrophaeus</i> 246	258, 10-15	0,0	0,0	3,5	6,50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i> 021	258, 10-15	6,0	3,0	11,0	20,0	35,0	12,5	12,5	14,0	0,0
<i>B. subtilis</i> 239	258, 30-35	30,0	0,0	35,0	14,5	30,0	7,0	17,0	13,0	0,0
<i>B. megaterium</i> 035	258, 30-35	34,0	0,0	35,0	20,0	35,0	13,0	21,5	15,0	0,0
<i>B. megaterium</i> 069	242, 0-5	0,0	0,0	1,50	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>P. macerans</i> 953	242, 0-5	-	9,0	15,5	-	16,5	15,5	-	-	7,0

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>B. reuszeri</i> 031	242, 0-5	2,0	0,0	4,0	19,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. megaterium</i> 957	242, 0-5	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	-	9,0
<i>B. megaterium</i> 067	242, 0-5	4,5	0,0	1,5	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i> 959	242, 0-5	-	0,0	10,0	-	0,0	8,0	-	-	0,0
<i>B. subtilis</i> ONU 559	242, 0-5	30,0	2,50	31,0	19,0	36,5	12,5	19,0	8,0	4,0
<i>B. pumilus</i> 229	242, 0-5	21,5	0,0	32,5	5,0	21,5	0,0	0,0	5,0	0,0
<i>B. agaradhaerens</i> 960	242,0-5	-	14,0	13,5	-	13,5	15,5	-	-	7,0
<i>B. subtilis</i> 923	242, 0-5	30,0	2,5	33,0	13,5	33,0	5,5	9,0	3,5	0,0
<i>B. subtilis</i> 961	242, 0-5	-	0,0	9,0	-	0,0	0,0	-	-	0,0
<i>B. subtilis</i> 967	242, 0-5	-	0,0	6,0	-	0,0	5,5	-	-	0,0
<i>B. subtilis</i> 968	242, 0-5	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	-	13,0
<i>B. megaterium</i> 032	242, 0-5	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i> 970	242, 0-5	-	11,0	13,0	-	0,0	12,0	-	-	0,0
<i>B. megaterium</i> 980	242, 0-5	-	7,0	7,5	-	0,0	0,0	-	-	0,0
<i>B. licheniformis</i> 986	242, 0-5	-	0,0	0,0	-	0,0	10	-	-	0,0
<i>B. pumilus</i> 989	242, 0-5	-	9,0	0,0	-	0,0	0,0	-	-	0,0
<i>B. subtilis</i> 001	242, 5-10	35,0	0,0	16,0	12,5	35,0	2,0	3,0	13,0	3,5
<i>B. subtilis</i> 013	242,10-15	35,0	0,0	35,0	16,0	35,0	3,5	17,0	8,0	0,0
<i>B. pumilus</i> 041	242, 10-15	7,0	0,0	20,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. atrophaeus</i> 008	242, 10-15	0,50	3,0	1,5	5,0	0,0	1,5	1,0	0,0	2,0

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>B. megaterium</i> 040	242,10-15	35,0	0,0	16,0	7,5	27,0	3,0	4,5	11,0	0,0
<i>B. licheniformis</i> 249	242, 15-20	0,0	0,0	0,0	7,5	2,50	1,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i> 251	242, 15-20	0,5	1,5	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5
<i>B. subtilis</i> 248	242, 15-20	0,0	2,0	6,0	6,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
<i>B. licheniformis</i> 245	242, 25-30	0,0	0,0	7,5	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i> 033	242, 25-30	0,0	1,5	1,5	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. pumilus</i> 932	269, 0-05	-	5,0	5,0	-	0,0	13,0	-	-	5,0
<i>B. megaterium</i> 063	269, 0-05	12,0	0,0	23,5	0,0	13,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. pumilus</i> 049	269, 45-50	1,5	0,0	17,5	10,5	35,0	2,0	4,5	10,0	0,0
<i>B. megaterium</i> 051	269, 45-50	9,0	0,0	20,5	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i> 053	269, 45-50	35,0	0,0	30,0	19,0	33,0	12,5	19,5	8,0	0,0
<i>B. megaterium</i> 054	269, 45-50	28,0	0,0	35,0	15,0	29,5	3,5	16,5	14,0	0,0
<i>B. licheniformis</i> 048	269, 45-50	18,0	0,0	22,5	6,5	27,5	2,0	8,0	8,0	0,0
<i>B. atrophaeus</i> 993	249, 0-16	-	15,0	16,0	-	15,0	0,0	-	-	14,0
<i>B. subtilis</i> 997	249, 0-16	-	0,0	27,0	-	15,0	10,0	-	-	28,0
<i>B. subtilis</i> 941	116, 0-02	-	9,0	15,0	-	13,0	12,0	-	-	13,0
<i>B. subtilis</i> 943	116, 0-02	-	15,0	11,0	-	18,0	14,0	-	-	13,0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 946	116, 0-02	-	7,5	7,5	-	8,50	14,0	-	-	19,5
<i>B. subtilis</i> 902	116, 0-05	-	0,0	6,0	-	13,0	11,0	-	-	12,5
<i>B. subtilis</i> 903	116, 0-05	-	5,5	5,5	-	11,5	0,0	-	-	7,0

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>B. subtilis</i> ONU 553	116, 0-05	29,0	0,0	29,0	0,0	0,0	31,5	31,0	30,0	9,0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 905	116, 0-05	-	7,5	15,5	-	6,5	13,0	-	-	14,0
<i>B. agaradhaerens</i> 906	116, 0-05	-	7,5	13,5	-	6,5	15,5	-	-	14,0
<i>B. subtilis</i> 907	116, 0-05	-	6,5	7,0	-	7,0	11,5	-	-	12,5
<i>B. amyloliquefaciens</i> 908	116, 0-05	-	7,0	8,0	-	11,5	15,5	-	-	8,5
<i>B. subtilis</i> 909	116, 0-05	-	16,0	14,0	-	16,0	-	-	-	14,0
Середнє***		20,72	6,52	16,53	11,83	21,75	8,56	11,98	8,79	10,06
Частка активних штамів (%)		68	38	89	85	57	60	51	47	39

Примітка: *- 1. *Proteus vulgaris* ATCC 6896, 2. *Pseudomonas aeruginosa* B-329, 3. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, 4. *Bacillus cereus* ATCC 14579, 5. *Candida albicans* ATCC 10231, 6. *Escherichia coli* ATCC 25922, 7. *Salmonella enterica* NCTC 6017, 8. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, 9. *Bacillus subtilis* ATCC 10774;

** - Не визначено;

*** Середнє значення розміру зон відсутності росту тест штамів у міліметрах без урахування нульових значень.

B. atrophaeus. Значна активність відмічалася у бактерій видів, які відомі з даних літератури як продуценти бактеріоцинів та антибіотиків - *B. subtilis* з показником 60% та *B. licheniformis* - 58%, *B. amyloliquefaciens* - 57%, відповідно.

Цікаво, що дуже близьке значення до вищезгаданих штамів продемонстрували споротвірні бактерії виду *B. agaradhaerens* (66%), для якого не зареєстровано здатності до синтезу антибіотиків чи бактеріоцинів. Найбільш низька активність відмічалася для штамів видів *B. megaterium* (26%), *B. pumilus* (19%), *B. cereus* (17%) та *B. reuszeri* (6%) [113].

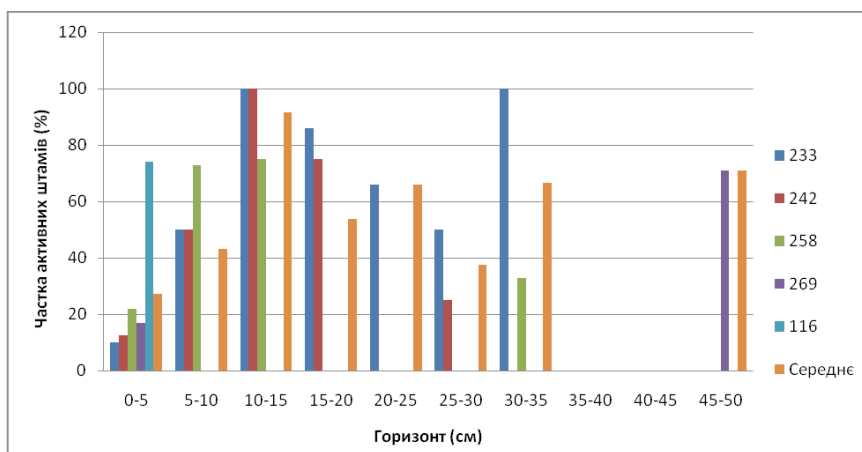


Рис. 4.8 Частка (%) активних штамів споротвірних бактерій на різних горизонтах осадів

Антимікробна активність досліджуваних штамів певним чином залежала від глибини горизонту, з якого вони були отримані, хоча чіткої закономірності встановити неможливо. Характер даної залежності можна описати як поступове зростання частки антагоністично активних штамів від поверхні до глибини 15 см, із наступним поступовим зниженням до значень 40% на горизонті 25-30 см (рис. 4.8).

Таким чином, отримані дані свідчать про перспективність природним чином законсервованих морських бактерій у донних відкладеннях Чорного моря для пошуку продуцентів нових анти-

мікробних препаратів проти збудників опортуністичних інфекцій людини.

За показниками антимікробної активності було відібрано штами *B. subtilis* ONU 553 (висока активність по відношенню до ентеробактерій), *B. megaterium* ONU 554 (активний по відношенню до грам-позитивних бактерій, включаючи *S. aureus*) та *B. subtilis* ONU 559 (активний по відношенню до *C. albicans*) для подальших досліджень їх біологічних властивостей, аналізу спектра екзометаболітів та геномів шляхом їх секвенування [113].

Активні штами, наведено в табл. 4.7, під видовими назвами, які було встановлено за результатами ідентифікації шляхом порівняння жирнокислотних спектрів. Результати аналізу секвенованих геномів даних штамів змінили ідентифікацію двох штамів (*B. megaterium* ONU 554 було перевизначено як *B. pumilus*, а *B. subtilis* ONU 553 як *B. velezensis*). У подальшому тексті для позначення трьох обраних штамів використовується саме видова ідентифікація, визначена за геномними показниками.

4.4. Біологічна характеристика *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554, *B. subtilis* ONU 559

4.4.1. Культуральна та морфологічна характеристика

Згідно з даними літератури, для видів *B. velezensis*, *B. pumilus* та *B. subtilis* характерне поєднання високої різноманітності морфотипів колоній та одноманітність морфології клітин [80]. Отримані дані узгоджуються з цими положеннями. Так, всі три штами: *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 демонструють дуже різну морфологію колоній. Колонії штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. pumilus* ONU 554 мають слизову консистенцію, діаметр 6,5-7,0 мм. Поверхня опукла, матова, у бактерій штаму *B. velezensis* ONU 553 - в слабко рельєфних складках, а в *B. pumilus* ONU 554 має блискучий піднесений валик з краю та складчастість в самому центрі. Край колоній *B. pumilus* ONU 554 гладенький, колір сірувато-жовтуватий; для *B. velezensis* ONU 553 ті ж параметри, відповідно: край складнохвилястий, а колір біло-сіруватий.

Морфологія колоній штаму *B. subtilis* ONU 559 за тих самих умов культивування відчутно відрізняється. Вони майже повні-

стю пласкі за винятком тонкого невисокого валику по краю, мають діаметр 7,0-7,5 мм. Край хвилястий, поверхня матова, гладенька, консистенція мучниста.

Всі описані вище особливості морфології колоній лежать в межах відомих характеристик для відповідних видів [80].

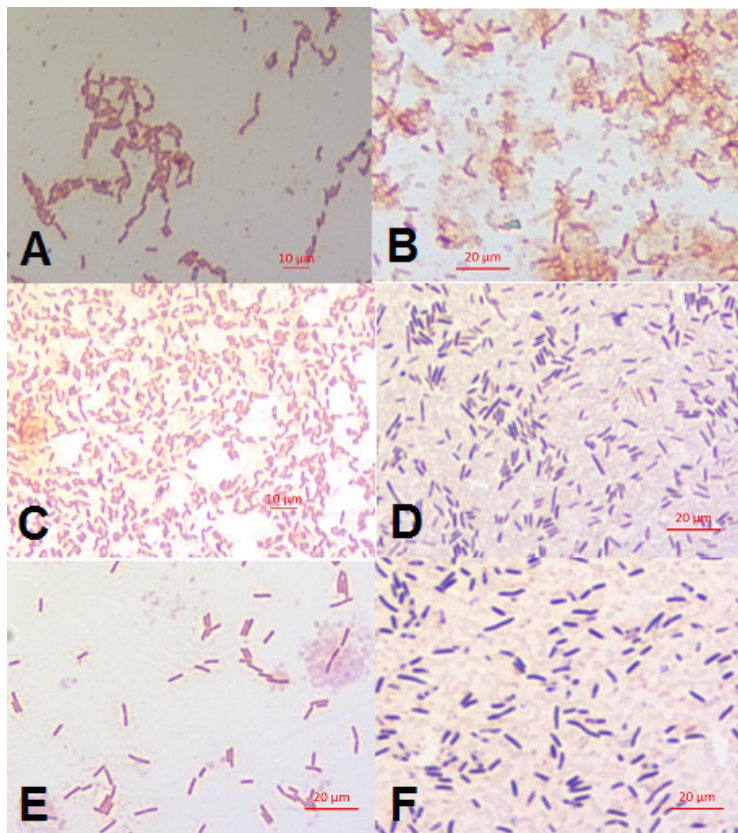


Рис. 4.9. Мікрофотографії бактерій *B. velezensis* ONU 553 (A), 24 год; *B. velezensis* ONU 553 (B), 96 год; *B. pumilus* ONU 554 (C), 24 год; *B. pumilus* ONU 554 (D), 96 год; *B. subtilis* ONU 559 (E), 24 год; *B. subtilis* ONU 559 (F), 96 год; забарвлення за Грамом, світлопольна мікроскопія (x1350)

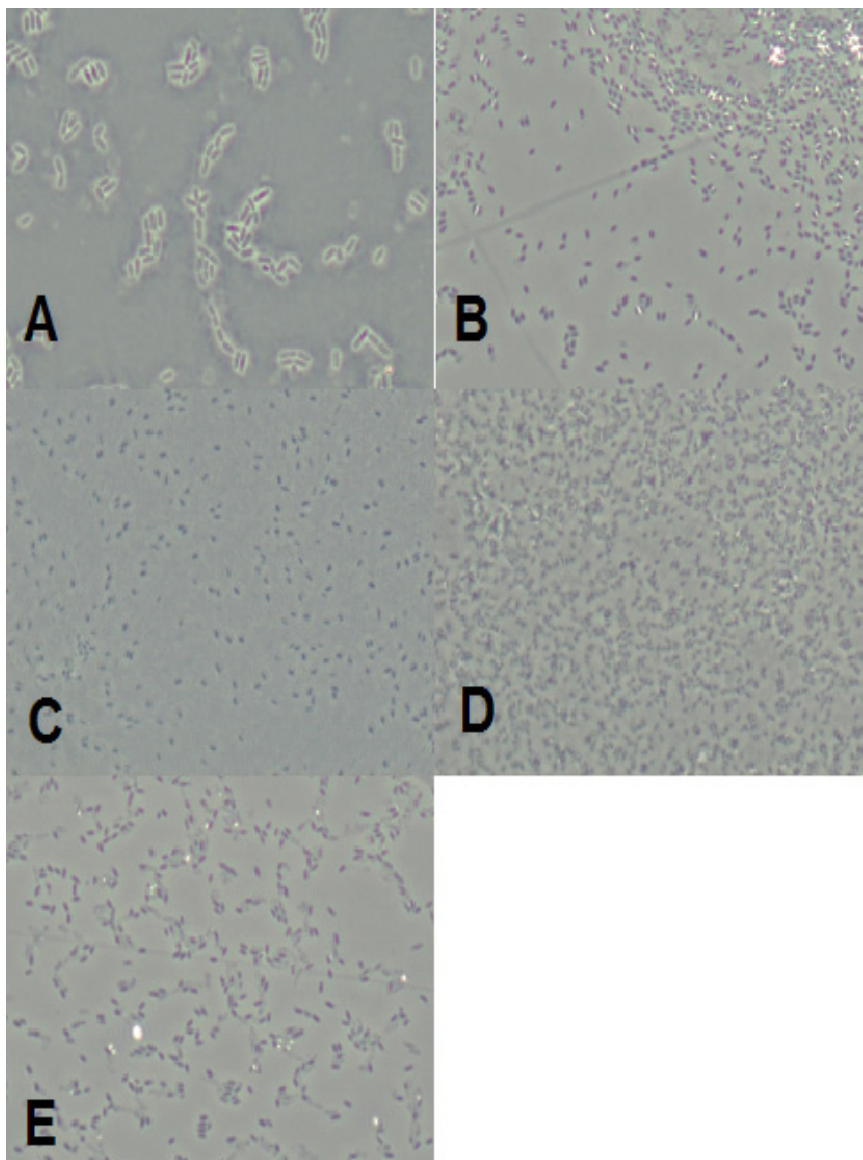


Рис. 4.10. Мікрофотографії бактерій *B. velezensis* ONU 553 (A), 24 год; *B. velezensis* ONU 553(B), 96 год; *B. pumilus* ONU 554 (C), 24 год; *B. pumilus* ONU 554 (D), 96 год; *B. subtilis* ONU 559 (E), 96 год; фазово-контрастна мікроскопія (x1350)

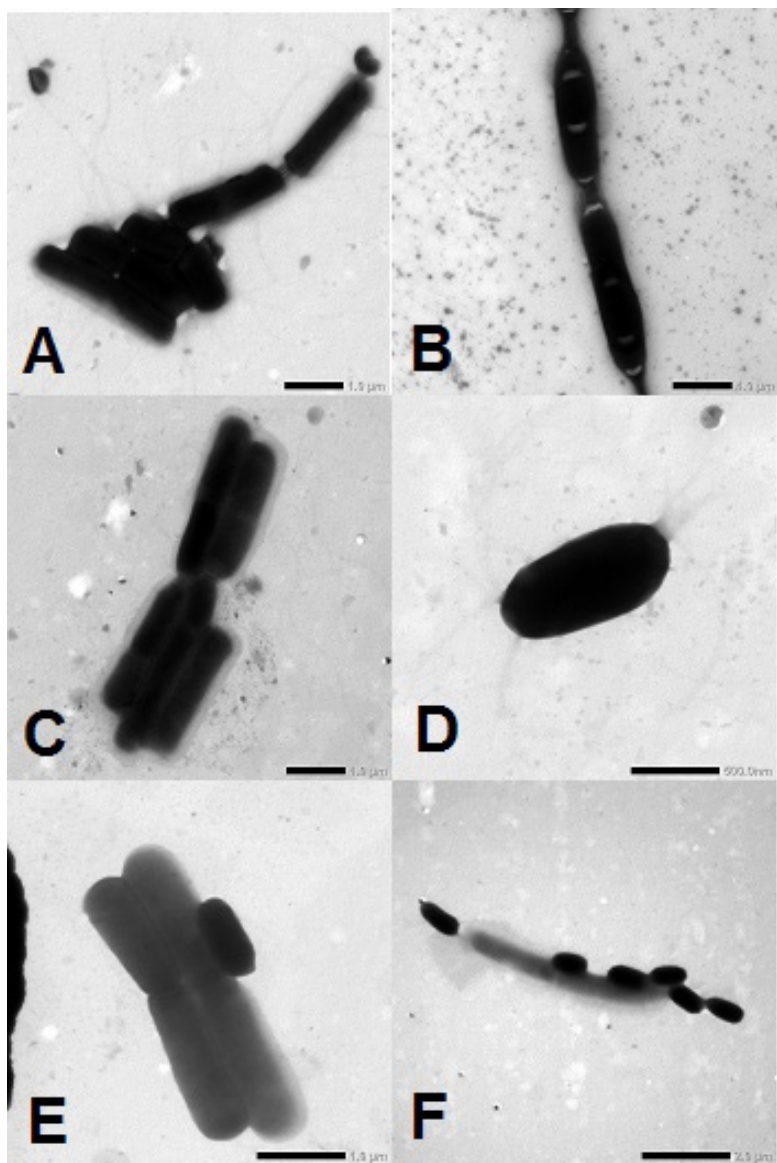


Рис. 4.11. Електронні мікрофотографії бактерій, зроблені з використанням трансмісивної електронної мікроскопії (x15000):
 А, В – *B. velezensis* ONU 553; С, D – *B. pumilus* ONU 554;
 Е, F - *B. subtilis* ONU 559

Дані мікроскопії бактерій та ендоспор досліджених штамів також підтримують уявлення про уніформність клітин трьох видів. Згідно даним літератури, ступінь вираженості їх забарвлення за грам-позитивним типом значною мірою залежить від віку культури (рис. 4.9) [80]. Розміри клітин цих бактерій складаються в діапазон 0,6-0,8 мкм в ширину та 2-3 мкм у довжину (рис. 4.11). Клітини поодинокі або попарні, рідко в невеликих ланцюжках. Ендоспори бактерій мають форму близьку до циліндричної (4.10, 4.11).

4.4.2. Фізіолого-біохімічні властивості

Вивчення фізіолого-біохімічних властивостей продемонструвало, що для штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. pumilus* ONU 554 відмічено по одному принциповому відхиленню від типів реакцій, характерних для 85% штамів відповідних видів (табл. 4.8). Відмічено, що споріднені види *B. velezensis* та *B. amyloliquefaciens* практично не відрізняються за патернами утилізації цукрів [44].

Для штаму *B. velezensis* ONU 553 відмічена атипова відсутність здатності до утилізації гентибіози, а для *B. pumilus* ONU 554 - рафінози. Якщо генетика утилізації бацилами гентибіози не відома з даних літератури, то для рафінози вона вивчена. При секвенуванні геному нами показано відсутність компонентів відповідного оперону *raf* у бактерій *B. pumilus* ONU 554. Бактерії *B. subtilis* ONU 559 відрізняються від типового штаму п'ятьма ознаками. Генетичні детермінанти ознак здатності до утилізації трегалози, сахарози, глікогену та амілодекстрину, виявлені в геномі за даними автоматичного анотатора PATRIC, хоча не були виявлені в даному дослідженні. Відсутність здатності до утилізації гентибіози важко піддається інтерпретації через пояснені вище обставини. Вцілому, такі результати щодо *B. subtilis* ONU 559 суперечать його надійній ідентифікації до даного виду за всіма іншими методами і дають підстави підозрювати атиповість даного штаму (що також виглядає ймовірним на фоні масштабних геномних делецій у порівнянні з геномом типового штаму – див. розділ 4.6.1.).

Вивчення резистентності до антибіотиків показало, що на тлі відносно низької антибіотикорезистентності бактерій роду *Bacillus* неклінічного походження бактерії, ізовані з відкла-

Таблиця 4.8
Утилізація вуглеводів бактеріями *B. velezensis* ONU 553 (A), *B. pumilus* ONU 554 (B),
B. subtilis ONU 559 (C)

	Саліцин	Д-целобіоза	Д-мальтоза	Д-лактоза	Д-мелібіоза	Д-цукроза	Д-трегалоза	Інулін	Метил-β-D-ксілопіранозид	Д-меліцитоза	Д-рафіноза	Амілодекстрин	Глікоген	Ксилітол	Гентиобіоза	Д-тураноза	Д-ліксоза	Д-тагатоza	Д-фруктоза	L-фруктоза	Метил-α-D-маннопіранозид	Метил-α-D-глюкопіранозид	Д-арабітол	L-арабітол	Натрію глікоконат	Натрію 2-кетоглікоконат	Натрію 3-кетоглікоконат
С	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
В	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
А	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Контроль	Гліцерол	Ерітрітол	Д- арабіноза	Д-арабіноза	Д-підоза	Д-ксілоза	Інулін	Метил-β-D-ксілопіранозид	Д-галактоза	Д-глюкоза	Д-фруктоза	Д-манноза	Ксилітол	Гентиобіоза	Д-тураноза	Д-ліксоза	Д-тагатоza	Д-фруктоза	L-фруктоза	Метил-α-D-маннопіранозид	Метил-α-D-глюкопіранозид	Д-арабітол <td>L-арабітол</td> <td>Натрію глікоконат</td> <td>Натрію 2-кетоглікоконат</td> <td>Натрію 3-кетоглікоконат</td>	L-арабітол	Натрію глікоконат	Натрію 2-кетоглікоконат	Натрію 3-кетоглікоконат
	Ескулін	цитрат ферулу																									

* - реакція протилежна такій, що властива більш ніж 85% штамів даного виду. ** - на другий день спостерігається зміна кольору середовища з червоного на пурпурний

день, виявилися вразливими майже до всіх антибіотиків, використаних для тесту (табл. 4.9). Надзвичайно висока чутливість бактерій до антибіотиків часто навіть заважала точному вимірюванню зон затримки росту, які могли сягати в діаметрі половини діаметру чашки Петрі. Високою виявилася лише резистентність до беталактамних антибіотиків, так, до цефіксиму *B. pumilus*

Таблиця 4.9

Резистентність до антибіотиків штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554, *B. subtilis* ONU 559

Антибіотик	<i>B. velezensis</i> ONU 553	<i>B. pumilus</i> ONU 554	<i>B. subtilis</i> ONU 559
Еритроміцин	32	22	28
Олеандоміцин	31	26,5	30,5
Ріфампіцин	24,5	29,5	16
Ампіцилін	27,5	35	35,5
Тетрациклін	7	37	31
Стрептоміцин	27	28	29,5
Нетілміцин	+	31,5	35
Бензилпеніцилін	14	23,3	23
Канаміцин	28,8	28,5	24
Оксицилін	24	20,80	30
Цефазолін	36	29	34
Левоміцетин	31,3	28	29
Левофлорксацин	40,5	+	33
Азитроміцин	25,5	24	22,3
Цефоперазон	32,5	27,5	34
Лінкоміцин	25,5	18	29
Цефалексин	42	31,5	47
Цефіксим	17	R	15
Фурагін	29	28,5	35,5

Примітка. Дані наведено як радіуси зон затримки росту в мм. R– резистентний. + - чутливий, але зону затримки росту не вдалося виміряти через інтерференцію.

ONU 554 навіть виявився повністю резистентним. Несподіваною є відносна нечутливість штаму *B. velezensis* ONU 553 до дії тетрацикліну.

4.5. Біохімічний склад *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554, *B. subtilis* ONU 559

4.5.1. Спектри жирних кислот

Аналіз спектрів жирних кислот досліджених штамів в цілому виявив риси характерні для представників роду *Bacillus* та групи видів *Bacillus subtilis*, зокрема [11]. До даної групи, окрім вищезазначеного, входять такі види, як *Bacillus megaterium*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. amiloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. mojavensis* тощо [80, 85]. Багато штамів групи є продуцентами різноманітних біологічно активних речовин, зокрема антибіотиків та бактеріоцинів.

Для представників роду *Bacillus* характерним є переважання розгалужених жирних кислот із довжиною вуглецевого ланцюга від 14 до 17 атомів (табл. 4.10). Також до характеристики ЖК-спектрів, притаманних групі *Bacillus subtilis* входить значне переважання насичених жирних кислот над ненасиченими, яке наближається до 100% в деяких випадках, значення індексу теплової адаптації (heat adaptation index - далі HAI), близькі до одиниці, а значення співвідношення 15:ізо та 15:антеізо жирних кислот (індекс a15/i15) між 1,0 та 3,0 [73]. Ознаки останньої групи були у випадку досліджених штамів проявлені так само чітко, як це зазвичай, характерно для групи *Bacillus subtilis*. Ця обставина стане нижче предметом обговорення. Підрахунок HAI виконували за формулою [40]:

$$HAI = \frac{(n14:0) + p(n16:0) + p(i14:0) + p(i15:0) + p(i16:0) + p(i17:0)}{p(a15:0) + p(a17:0) + p(n16:1) + p(i17:1(n-10)) + p(16:1\omega7calcohol)}$$

де p - частка певної жирної кислоти.

Значення sim-індексів, що вказують на подібність визначеного жирнокислотного спектру до такого у типового штаму цього виду, визначеного за стандартною методикою, для всіх штамів виявилися досить високими для видової ідентифікації, тобто більшими за 0,500.

Таблиця 4.10

**Спектри жирних кислот *B. velezensis* ONU 553,
B. pumilus ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559**

Жирна кислота	<i>Bacillus velezensis</i> ONU 553	<i>Bacillus pumilus</i> ONU 554	<i>Bacillus subtilis</i> ONU 559
15:0 anteiso	37,16	42,69	36,50
15:0 iso	25,47	42,89	22,75
17:0 iso	10,16	2,09	13,79
17:0 anteiso	8,60	4,81	12,95
16:0	3,81	0,90	2,19
16:0 iso	2,97	1,59	2,89
17:1 iso w10c	1,96	0,41	2,05
16:1 w11c	1,63	0,33	0,88
17:1 iso w5c	1,46	0,64	0
14:0 iso	1,22	0,70	0,80
14:0	0,91	0,49	0,30
16:1 w7c alcohol	0,70	0,35	0,59
17:0	0,64	0	0
13:0 anteiso	0,36	0	0
14:0 anteiso	0,27	0	0
11:0 2OH	0,24	0	0
15:1 w5c	1,46	0,53	0,49
13:0 anteiso	0	0,43	0,16
13:0 iso	0	0,40	0,13
15:0 iso 3OH	0	0,23	0
18:0	0	0	0,79
17:0 iso 3OH	0	0	0,20
19:0 iso	0	0	0,30
19:0 anteiso	0	0	0,17
17:0 2OH	0	0	0,14
17:1 iso I/anteiso B	0,99	0,52	1,91
% C:15	0,63	0,86	0,59
% насичених ЖК	91,80	97,22	94,08
a15/i15	1,46	0,995	1,60
HAI	0,89	1,00	0,81
sim -індекс 1	0.812	0,655	0,846
sim -індекс 2	-	0,607	-

Показники HAI та a15/i15, що є оцінкою термофільності та були розроблені саме для представників роду *Bacillus*, розраховані за формулами, запропонованими Diomandé et al. [40]. Їх значення інтерпретується наступним чином: якщо HAI приймає значення близьке до одиниці, то штам мезофільний; якщо він більший чи менший, то, він ідентифікується, відповідно, як термофільний чи психрофільний. Аналогічно інтерпретується коефіцієнт a15/i15: мезофільні штами мають значення між 1 та 3, термофільні та психрофільні – менші за 1 та більші за 3, відповідно [11].

Інтерпретуючи в такому ключі отримані дані, можна дійти висновку, що показники HAI та a15/i15 штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 характерні для мезофільних бактерій [40, 41], що підтверджує також їх активний ріст за інкубації при 30 °C.

Також слід відзначити унікальні для кожного штаму жирні кислоти – для *B. velezensis* ONU 553 це 17:0, 13:0 anteiso, 14:0 anteiso, 11:0 2ОН. Для *B. pumilus* ONU 554 такою жирною кислотою є 15:0 iso 3ОН, для *B. subtilis* ONU 559 - 18:0, 17:0 iso 3ОН, 17:0 2ОН, 19:0 iso, 19:0 anteiso [11].

4.5.2. Амінокислотний склад

Вміст виявлених амінокислот по спаданню масової долі у бактерій досліджуваних штамів принципово не відрізняється (табл. 4.11).

В роботі [89] було запропоновано метод аналізу амінокислотного складу для організмів різних біологічних ніш. Авторам вдалося виявити, що за розташування амінокислот за спаданням їх вмісту організми різних біотопів демонструють певні сигнатури чи патерни чергування амінокислот у таких спектрах.

Аналіз отриманих нами даних не виявив однозначної відповідності з жодним із запропонованих Моуга патернів. Спостерігається певне наближення до інвертованого патерну, характерного для біоти піщаних ґрунтів (у зростаючій кількості: аргінін-лізин-лейцин-аланін-аспарагін/аспартат), що може мати відношення до вихідного місця походження даних штамів.

Також встановлено, що компоненти патерну, характерного для морських організмів, групуються на початку переліку аміно-

кислот, практично не відтворюючи досить цікавий саме в даному випадку мотив (по зростанню: аланін-триптофан-гліцин-глютамін/глутамат-лейцин). Для об'єктивного порівняння порядків було використано тест рангової кореляції Кендела. Результати обрахування даного показнику наведено у таблиці 4.12.

Таблиця 4.11

**Амінокислотний склад *B. velezensis* ONU 553,
B. pumilus ONU 554, *B. subtilis* ONU 559**

<i>Bacillus velezensis</i> ONU 553	*Частка, %	<i>Bacillus pumilus</i> ONU 554	Частка, %	<i>Bacillus subtilis</i> ONU 559	Частка, %
L-Arg	18,12	Gly	19,83	L-Arg	17,67
Gly	17,21	L-Arg	16,61	Gly	17,53
L-Glu	13,25	L-Leu	9,73	L-Glu	10,24
L-Leu	7,29	L-Glu	9,65	L-Ala	8,40
L-Ala	7,21	L-Ala	7,03	L-Leu	7,91
L-Pro	6,83	L-Iso	6,43	L-His	6,56
L-Iso	6,62	L-His	5,97	L-Iso	6,35
L-Tyr	4,88	L-Tyr	4,68	L-Tyr	4,89
L-His	4,62	L-Pro	4,39	L-Pro	4,81
L-Phe	3,94	L-Phe	4,09	L-Phe	3,92
L-Ser	3,25	L-Ser	3,28	L-Ser	3,17
L-Val	3,12	L-Val	2,85	L-Val	2,86
L-Asp	2,30	L-Asp	2,31	L-Asp	2,57
L-Thr	1,35	L-Thr	1,58	L-Met	1,71
L-Met	-	L-Met	1,57	L-Thr	1,42

Примітка: * - Частка (%) від загальної суми площ піків

Значення коефіцієнту рангової кореляції Кендела для наборів амінокислот дослідних штамів та даних літератури

Штам	А		В	
	τ	p-value	τ	p-value
<i>B. velezensis</i> ONU 553	0,544	0,01	0,128	0,542
<i>B. pumilus</i> ONU 554	0,544	0,01	0,032	0,879
<i>B. subtilis</i> ONU 559	0,384	0,067	0,032	0,879

Примітка: Порівняння проведено за даними амінокислотного пулу: А – біоти піщаних ґрунтів, В – біоти океану [89], τ – коефіцієнт кореляції Кендела. Значення τ вважається значущим, якщо відповідне значення p-value менше за 0,05.

Амінокислотні патерни штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. pumilus* ONU 554 демонструють значущу і пряму кореляцію з відповідним патерном біоти піщаних ґрунтів, в той час як їх кореляція з патерном океанічної біоти слабка і незначуща. Це можна інтерпретувати як аргумент на користь походження досліджуваних штамів з піщаних пляжів узбережжя Чорного моря. Амінокислотний патерн штаму *B. subtilis* ONU 559 не корелює з жодним з запропонованих, що можна в свою чергу пояснити його походженням з біотопів суходолу [11].

4.5.3. Спектри моноцукрів

Вміст моносахаридів для досліджених чорноморських споротвірних бактерій носить в цілому очікуваний характер (табл. 4.13). У грам-позитивних бактерій рибоза входить до складу РНК та у більшості бацил до тейхоевих кислот, і цілком природно очікувати її наявність у тій самій ролі у клітинних стінках штамів філогенетично близьких видів [109]. Рамноза для бацил відома лише у складі ендоспор та її наявність, окрім *B. velezensis* ONU 553, може свідчити про початок процесу ендоспороутворення у бактерій. Цікавою в цьому контексті є відсутність рідкісного цукру хіновози, характерного для ендоспор *B. subtilis* та вегета-

тивних форм деяких штамів цього виду [138]. Велика кількість глюкози пояснюється з позицій її ролі в енергетичному обміні прокариот та зокрема фірмікут [11].

Високий вміст галактози відомий для *Bacillus anthracis*, що відрізняє даний вид навіть з досить однорідної групи *B. cereus*. У невеликій кількості, приблизно на два порядки меншій за відповідні показники для глюкози, галактоза також давно відома як компонент клітин *Bacillus subtilis*, проте її точна локалізація та функція в клітині невідомі [100, 138]. Арабіноза невідома як компонент клітин бацил та взагалі фірмікут. Серед прокариот вона відома лише для деяких актинобактерій як компонент арабіногалактану[42, 51].

Таблиця 4.13

**Моносахаридний склад *B. velezensis* ONU 553,
B. pumilus ONU 554, *B. subtilis* ONU 559**

Моносахарид	<i>Bacillus subtilis</i> ONU 553	<i>Bacillus pumilus</i> ONU 554	<i>Bacillus subtilis</i> ONU 559
Арабіноза	3,8210*	4,8189	1,8306
Галактоза	2,6950	4,0278	5,7860
Глюкоза	53,7670	6,7654	37,0567
Рамноза	0	17,4851	1,7592
Рибоза	6,7820	0	1,1844
L-ідитол	5,7000	9,5021	8,2531
Міоінозитол	0	3,6773	3,3938

Примітка: *вміст у % від загальної суми площ піків.

У досліджених штамів виявлені також два багатоатомні спирти - L-ідитол (у всіх штамів) та міоінозитол (у всіх штамів, окрім *B. velezensis* ONU 553), у штаму *B. subtilis* ONU 559 - редукуючий дисахарид тураноза, у штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. pumilus* ONU 554 – глікозидсалірепін.

Таким чином, аналіз результатів біохімічного складу за індексами термофільності та аналізом амінокислотних спектрів за методом Моуга дають підстави вважати, що досліджувані штами бактерій не відносяться до аборигенних представників морської біоти, але для підтвердження цього необхідно провести додаткові дослідження [11].

4.6. Характеристика геномів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554, *B. subtilis* ONU 559

4.6.1. Загальна характеристика геномів

Для з'ясування загальної характеристики геномів досліджуваних штамів та виявлення генів, що відповідають за синтез біологічно активних, зокрема антимікробних, сполук та уточнення попередньої ідентифікації, проведеної за спектрами жирних кислот, досліджуваних бактерій донних осадів активних антагоністів, було проведено секвенування геномів з використанням сервера TYGS, інструментарій якого поєднує алгоритми повногеномного порівняння та 16S рДНК філогенію.

Отримані таким чином результати виявили, що геноми бактерій *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559, попередньо ідентифіковані як представники виду *B. subtilis*, належать, відповідно до видів *B. velezensis* (група *B. subtilis*, підгрупа *B. amyloliquefaciens*) та *B. subtilis*. Геном бактерій *B. pumilus* ONU 554, раніше ідентифікованих як *B. megaterium*, демонструє найбільшу подібність до геному *B. pumilus* SH-B9 [6, 114].

Показник цифрової ДНК-ДНК гібридизації (dDDH) пари геномів *Bacillus subtilis* ATCC 6051 та *Bacillus subtilis* ONU 559 складає 88,2%, що вище за межу видів у 70%. Різниця вмісту ГЦ-пар між цими геномами складає 0,05%, що також менше за межу видової подібності у 0,1%. Для геному штаму *Bacillus velezensis* ONU 553 з геномом штаму *Bacillus velezensis* FZB42 показник dDDH дорівнює 90,06%, що значно перевищує межу видової подібності за даним критерієм (70%). Відповідний показник для пари штамів *B. velezensis* ONU 553 та типового для свого виду штаму *B. amyloliquefaciens* DSM7 складає 56,3%, що відповідно нижче за поріг у 95%. Дане порівняння було проведено з метою спроби вирішити одну з головних проблем ідентифікації

штамів виду *B. velezensis* – їх відмінності від спорідненого виду *B. amyloliquefaciens*. Вміст ГЦ пар *Bacillus velezensis* ONU 553 складає 46,69%, що незначно перевищує максимальний відомий показник для даного виду (46,64%) – різниця показників складає 0,05%, що відповідає показнику типового штаму [80]. Дещо більш проблематичною, як було сказано вище, є видова ідентифікація штаму *Bacillus pumilus* ONU 554. Показник dDDH з типовим штамом цього виду *Bacillus pumilus* NCTC 10337 складає лише 64,5%, що менше за критерій у 70% [17]. Різниця ГЦ-вмісту становить 0,22, що значно перевищує критичний показник видового розмежування.

На жаль, ряд інструментів повногеномного порівняння не зміг бути реалізований на базі TYGS, тому прийнято рішення для підтвердження видової ідентифікації зробити додатковий аналіз таксономічного статусу даних геномів за допомогою методів orthoANI та GGCD, реалізованих у програмі OAT. Дана програма також надає можливість побудови теплової карти результатів, накладеної на філогенетичне дерево досліджених геномів, що, на нашу думку, є оптимальним засобом представлення подібних результатів. Даний інструмент не дозволяє порівнювати одночасно більше 10 геномів, тому довелося обмежитися лише найближчими до досліджуваних нами геномів, виявлених в базі GenBank шляхом повногеномного пошуку за допомогою алгоритму BLAST.

Теплова карта-дендрограма результатів orthoANI, представлена на рисунку 4.13, підтверджує видову ідентифікацію штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559. Згідно критерію orthoANI, два штами вважаються такими, що належать до одного виду, якщо значення даного індексу для пари їх геномів перевищує 95% [74]. Для пари *Bacillus subtilis* ATCC 6051 та *Bacillus subtilis* ONU 559 він дорівнює 98,63%, що значно перевищує значення cutoff-критерію. Показник orthoANI (середня нуклеотидна подібність) між штамми *B. velezensis* ONU 553 та *B. velezensis* FZB42 дорівнює 98,87%, що також перевищує поріг розмежування видів (95%). Для пари штамів *B. megaterium* ONU 554/ *B. pumilus* SB-H9 значення orthoANI становить 95,2%.

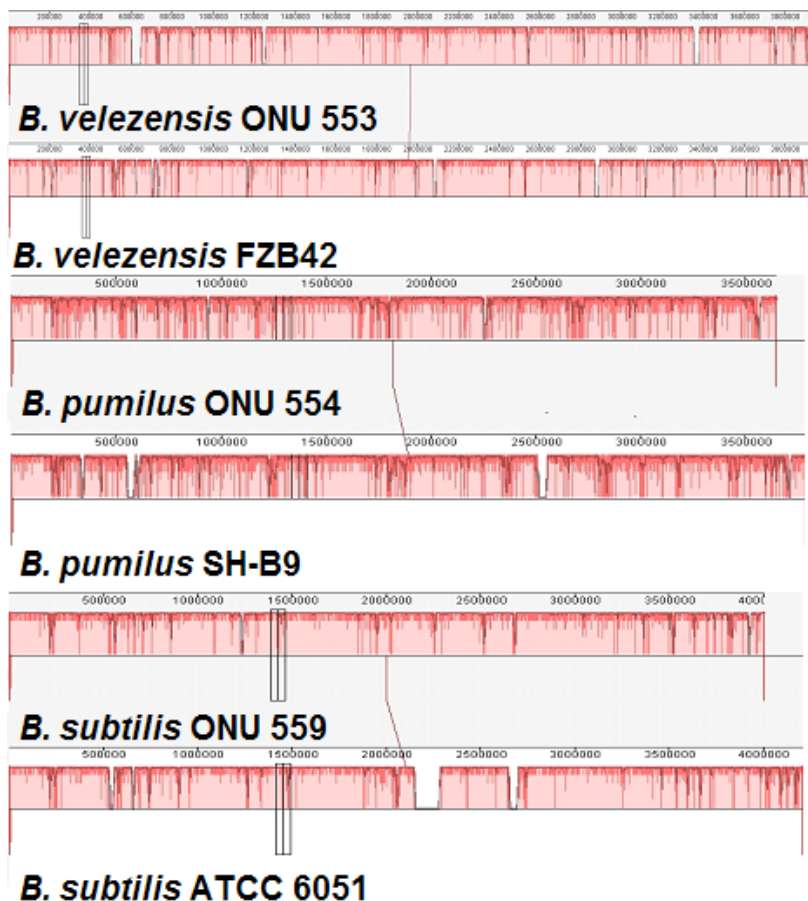


Рис. 4.12. Візуалізація геномів за допомогою Mauve
Примітка: В кожній парі згори розташовано геном бактерій досліджуваного штаму, знизу – референсного

Для всіх геномів було виконано анотування за допомогою сервера PATRIC. Його результати представлені на таблицях та генетичних картах (таблиці 4.14, 4.15; рисунки 4.14, 4.16, 4.19).

Характеристики секвенованих геномів добре укладаються в діапазон значень окремих ознак, властивих відповідним видам. Так, *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559 позбавлені плазмід, що відомо для приблизно 80% штамів цих видів [27, 54],

а штам *B. pumilus* ONU 554 має плазмиду, як це характерно для представників виду [48].

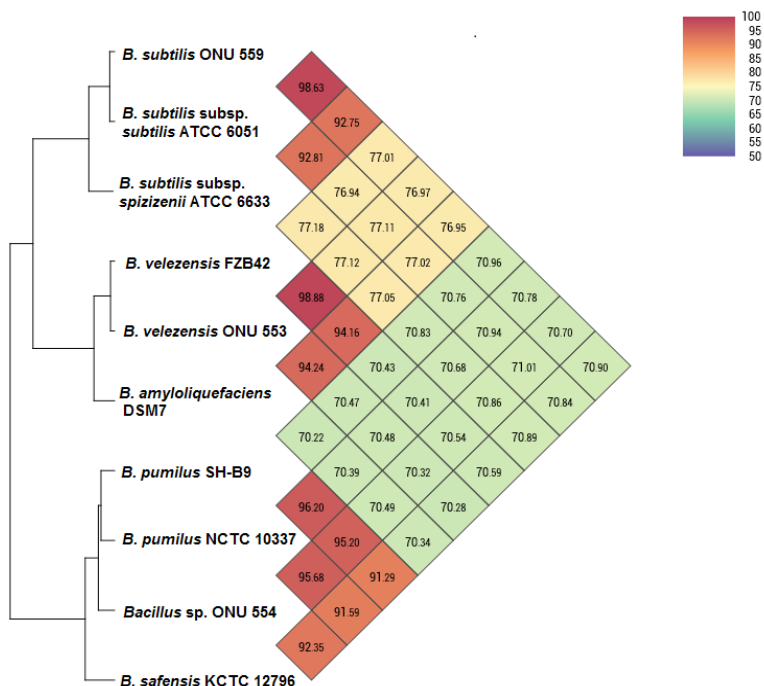


Рис. 4.13. Теплова карта показника *orthoANI*, обрахованого для сукупності геномів глибоководних споротвірних бактерій досліджених штамів та споріднених до них бактерій

Розміри геномів штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559 потрапляють у властивий цим видам діапазон 3,8-4,2 мегабаз, в обох випадках наближаючись до його верхньої межі (табл. 4.15) [25, 54, 114]. Те ж саме стосується і кількості ВРЗ у геномі (діапазон складає 3600-4000 для *B. velezensis* [54] та 3800-4500 для *B. subtilis* [75]). Провести таке саме порівняння для геному *B. pumilus* ONU 554 важко через відносний брак наявних даних. Можна відмітити схожість даного виду зі штамом *B. pumilus* GR8, який відомий в якості фітопатогену імбиру, по параметрах абсолютного розміру геному, кількості ВРЗ та порівняно з інши-

ми штамами даного виду великій кількості генів рРНК та тРНК (табл. 4.15) [6, 140].

Таблиця 4.14

Функціональні показники геномів

Показник	Кількість ВРЗ		
	<i>B. velezensis</i> ONU 553	<i>B. pumilus</i> ONU 554	<i>B. subtilis</i> ONU 559
Метаболізм	722	628	767
Процесинг білків	221	217	225
Відповідь на стрес, захист, вірулентність	145	131	148
Клітинні процеси	242	211	253
Біоенергетика	212	204	214
Метаболізм ДНК	80	80	87
Метаболізм РНК	52	51	52
Мембранний транспорт	71	76	76
Поверхневий апарат клітини	16	13	26
Регуляція та передача сигналу	10	10	11
Різне	10	8	11

Генералізовані дані протеомної анотації геномів роблять очевидним факт відносної близькості штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559, і певної відокремленості від них штаму *Bacillus pumilus* ONU 554. На жаль, порівняльний аналіз таких даних з іншими штамами даних видів неможливий через недостатню досконалість та стандартизацію методів автоматичного анотування геномів [23, 114]. Даний тренд простежується і на даних базових властивостей геномів. Зокрема, геному *Bacillus pumilus* ONU 554 властивий відносно невеликий розмір, близький до мінімального для бацил. Поєднання цих характеристик робить необхідним виконання додаткових фізіологічних досліджень для остаточної ідентифікації штаму. Можна припустити, що в цьому випадку мова йде про новий вид роду *Bacillus*, близький до

Базові показники геномів глибоководних споротвірних бактерій

Показник	<i>B. velezensis</i> ONU 553	<i>Bacillus pumilus</i> ONU 554	<i>B. subtilis</i> ONU 559
Розмір геному, п.н.	3 934563	3642544	4 004 302
Вміст ГЦ пар, %	46,69	41,93	43,90
Плазмід	0	1	0
Блок-кодуєчі ВРЗ	3953	3749	4084
Гени функціонально анованих білків	3252	3019	3493
Гени не ідентифікованих білків	701	730	591
Гени тРНК	86	81	87
Гени рРНК	27	24	30
Гени профагів	4	3	2
Повтори	39	57	18

Bacillus pumilus. Для підтвердження цього припущення у подальшому планується провести додаткові дослідження, а тут ми залишаємо його під назвою *Bacillus pumilus* ONU 554 [6].

У результаті проведених досліджень встановлено, що розмір геному бактерій штаму *B. subtilis* ONU 559 дорівнює 4 004 302 пар основ. За даними повногеномних порівнянь штам ідентифіковано як *B. subtilis*, що було відмічено вище.

4.6.2. Характеристика геному штаму *B. subtilis* ONU 559

Цікавою особливістю цього геному є досить значна відмінність у розмірах у порівнянні з геномом типового штаму *B. subtilis* ATCC 6051, який перевищує геном *B. subtilis* ONU 559 на 211 308 пар основ. Даний дефіцит зводиться до ряду відносно нечисленних, проте досить великих, хромосомних делецій, у порівнянні з геномом типового штаму, з наступними координатами (рис. 4.12): 529502-556310 (26,7 кб), 652287-664114 (11,8 кб), 2055867-2071085 (15, 2 кб), 2152085-2286407 (134,3 кб), 2653354-2701339

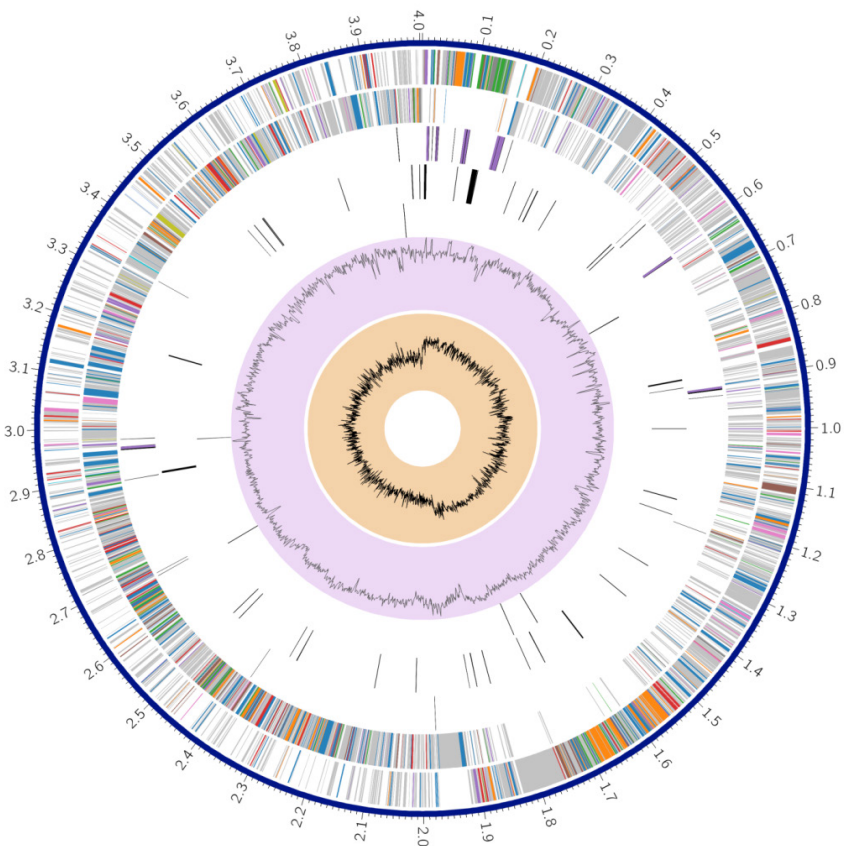


Рис. 4.14. Кільцева карта геному *B. subtilis* ONU 559

Примітка: Зовні всередину карти: контіг, відкриті рамки зчитування (ВРЗ) на лідируючому ланцюгу, ВРЗ на відстаючому ланцюгу, гени РНК, ВРЗ, що мають гомологію до відомих детермінант антибіотико-резистентності, ВРЗ, що мають гомологію до відомих факторів патогенності, відсоток ГЦ-пар, ГЦ-асиметрія між ланцюгами. Колір лінії відповідає належності відкритої рамки зчитування (ВРЗ) до певної функціональної підсистеми: синій – метаболізм, зелений – процесинг білків, фіолетовий – відповідь на стрес, захист, вірулентність, помаранчевий – клітинні процеси, червоний – біоенергетика, коричневий – метаболізм ДНК, рожевий – мембранний транспорт, сірий – метаболізм РНК, жовтий – поверхневий апарат клітини, голубий – регуляція та передача сигналу, світло-голубий – різне.

(47,9 кб) пар основ. Фрагменти розміром у 134,5 та 47,9 кб відповідають профагам. Але *B. subtilis* ONU 559 має ряд надлишкових фрагментів у геномі у порівнянні з геномом *B. subtilis* ATCC 6051, за координатами: 2521030-2527806 (6,7 кб) та 3717625-3727185 (9,5 кб). Природа цих інсерцій потребує подальшого вивчення. Виявлений системою PHASTER профаг з координатами 1287507-1320920 пар основ ідентичний такому в геномі типового штаму (рис. 4.15). Вміст ГЦ-пар 44,84% у ньому близький до відповідного показника для геному штаму-господаря [15].

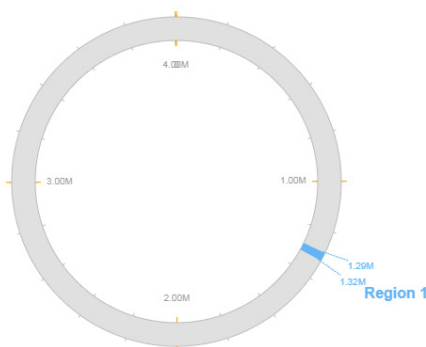


Рис. 4.15. Кільцева карта геному *B. subtilis* ONU 559 з локалізацією профагового елементу, виявленого PHASTER

Набір ідентифікованих за допомогою antiSMASH та Bagel4 генетичних кластерів є досить характерним для цього виду (табл. 4.16). До помітних особливостей можна віднести відсутність детермінанти синтезу характерного для бацил аміноглікозидного антибіотика неотрегалозодіаміну (кластер з п'яти генів).

З використанням сервера PATRIC у геномі досліджуваного штаму виявлено 4 048 відкриті рамки зчитування, з них для 3 493 (86,2%) приписано біологічну функцію, а 591 залишилась не ідентифікованою (рис. 4.14). Визначено 111 генів, що відповідають за РНК, з них генів тРНК - 87, а генів рРНК - 30.

Пошук за допомогою інструменту IslandViewer та VirulenceFinder 2.0 не виявив детермінант патогенності в геномі штаму *B. subtilis* ONU 559, за допомогою ResFinder-3.2 - не

**Локалізація та характеристика кластерів, виявлених у
геномі *B. subtilis* ONU 559**

Тип кластеру	Локалізація, п.о.		Найбільш схожий відомий кластер	Подібність, %
	з	по		
Бактеріоцин	204348	228805	Субтиломіцин	100
Нерибосомна пептидсинтетаза	358680	421643	Сурфактин	82
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	1114627	1 135140	-	-
Гібридна нерибосомна пептидсинтетаза/ Транс-АТ полікетидсинтетаза	1 734724	1849475	Бацилен	100
Нерибосомна пептидсинтетаза	1905846	1 988168	Фенгіцин	100
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	2 048520	2070418	-	-
Полікетидсинтетаза III типу	2118153	2 159250	-	-
Нерибосомна пептидсинтетаза	3 046755	3096496	Бацилібактин	100
Бактеріоцин	3611368	3 632979	Субтілозин А	100
Інші	3 640075	3681493	Бацілізин	100

виявив детермінант резистентності до бета-лактамів, колістину, фосфоміцину, фузідової кислоти, глікопептидів, нітроїмідазолу, оксазолідинону, хлорамфеніколу, хінолонів, ріфампіцину, сульфаміламіду та тріметоприму. Виявлено детермінанти резистентності до аміноглікозидів, макролідів та тетрациклінів. Детермінанта резистентності до аміноглікозидів представлена геном aadK (аміноглікозид 6-аденілілтрансферази, номер доступу до референсу в базі GenBank M26879.1). Його локалізація в хромосомі 2510238-2511090 п.о.; ідентичність гену референсній послідовності складає 98,71%. Детермінанта резистентності до макролідів пред-

ставлена геном mph(K) (макролід фосфотрансферази K), з локалізацією 274663-275583 п.о. та ідентичністю референсу 98,05%. Детермінанта резистентності до тетрацикліну є геном tetBSR, з локалізацією 3977776-3979152 п.о. та ідентичністю до референсу 99,42%. Експериментально резистентність до антибіотиків класів аміноглікозидів (зокрема, стрептоміцину та нетілміцину), як і макролідів (на прикладі ерітроміцину та олеандоміцину) показана не була (табл. 4.9).

4.6.3. Характеристика геному *Bacillus pumilus* ONU 554

Геном *Bacillus pumilus* ONU 554 сягає 3642544 пар основ, що на 96,9 кб менше за геном типового штаму. Дана різниця пояснюється наявністю в геномі типового штаму *Bacillus pumilus* SH-B9 наступних інсерцій у порівнянні з геномом *Bacillus* sp. ONU 554 (рис. 4.12): 331019-345833 п.о. (14,8 кб), 548738-579024 п.о. (30,2 кб), 1223547-1231981 п.о. (8,4 кб), 2509952-2550934 п.о. (40,1 кб), 2835168-2838616 п.о. (3,4 кб). Певний надлишок відносно типу скомпенсовано невеликими інсерціями нез'ясованої природи: 854620-862290 п.о. (7,7 кб), 1681273-1686993 п.о. (5,7 кб), 3366808-3376515 п.о. (9,7 кб). Важливою особливістю геному *Bacillus pumilus* ONU 554 є наявність у його складі відносно великої плазміді (табл. 4.15), яка гомологічна плазміді штаму *Bacillus pumilus* SH-B9 [6].

Цікавим є набір біосинтетичних кластерів, наявних у геномі цього штаму (табл. 4.17). По-перше, жоден з виявлених кластерів не є повністю гомологічним до відомих з даних літератури. По-друге, системою Bagel4 ідентифіковано три генетичні детермінанти синтезу різних бактеріоцинів. Один з них – пуміларин – належить до відносно добре охарактеризованої групи циклізованих «голова до хвоста» пептидів, до якої належить інший відомий для бацил бактеріоцин – амілоцикліцин, характерний для бацил підгрупи *Bacillus amyloliquefaciens* [10, 130] та виявлений в іншого досліджуваного штаму – *B. velezensis* ONU 553. Інші два бактеріоцини – клостицин, який раніше був відомий для клостридій [69], та UviB значно менш вивчені [6, 16]. Останній бактеріоцин належить до групи так званих холін-подібних бактеріоцинів.

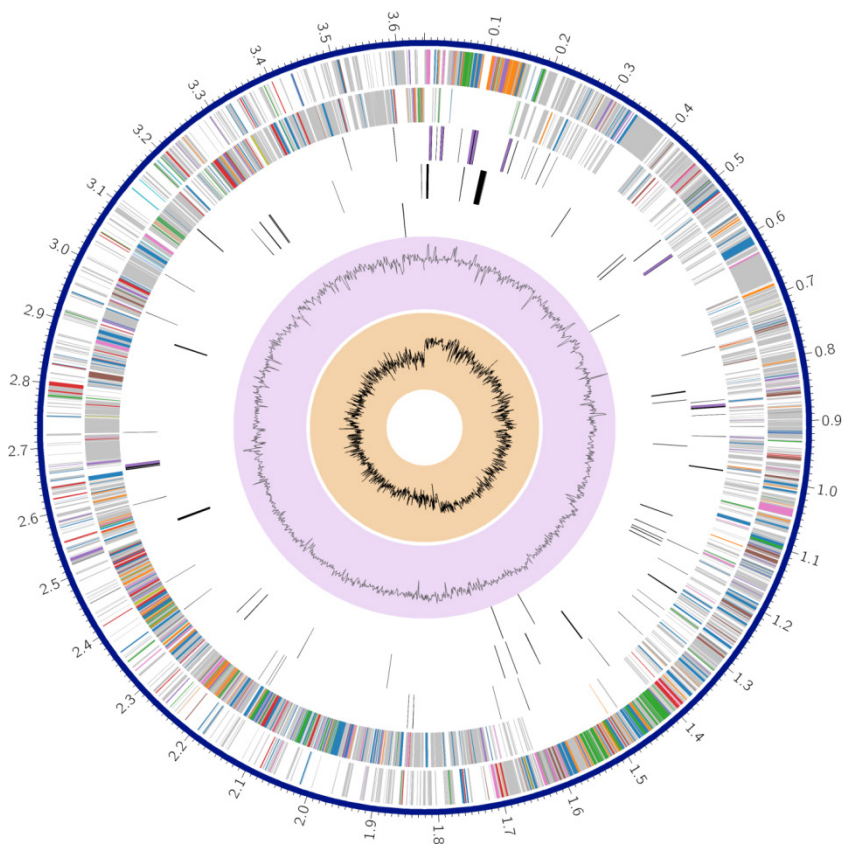


Рис. 4.16. Карта геному *B. pumilus* ONU 554

Примітка: Зовні всередину карти: контіг, відкриті рамки зчитування (ВРЗ) на лідируючому ланцюгу, ВРЗ на відстаючому ланцюгу, гени РНК, ВРЗ, що мають гомологію до відомих детермінант антибіотикорезистентності, ВРЗ, що мають гомологію до відомих факторів патогенності, відсоток ГЦ-пар, ГЦ-асиметрія між ланцюгами. Колір лінії відповідає належності відкритої рамки зчитування до певної функціональної підсистеми: синій – метаболізм, зелений – процесинг білків, фіолетовий – відповідь на стрес, захист, вірулентність, помаранчевий – клітинні процеси, червоний – біоенергетика, коричневий – метаболізм ДНК, рожевий – мембранний транспорт, сірий – метаболізм РНК, жовтий – поверхневий апарат клітини, голубий – регуляція та передача сигналу, світло-голубий – різне.

Таблиця 4.17

**Характеристики та локалізація кластерів, виявлених
у геномі *Bacillus pumilus* ONU 554**

Тип кластеру	Локалізація, п.о.		Найбільш схожий відомий кластер	Подібність, %
	з	по		
Нерибосомна пептидсинтетаза	334174	416332	Ліхенізін	85
Нерибосомна пептидсинтетаза, полікетидсинтетаза 1 типу.	618110	698411	Цвіттерміцин	18
Ферменти біосинтезу терпеноїдів та сидерофорів	1051156	1,079,477	Каротиноїд	50
Беталактон	1 752368	1 780023	Фенгіцин	50
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	1847856	1868573	-	-
Полікетидсинтетаза 3 типу.	1 906917	1 948017	-	-
Бактеріоцин	2257590	2267916	Пумілярин	-
Беталактон	2 394071	2 426376	-	-
Бактеріоцин	2713932	2734121	UviB	-
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	2963108	2984028	Субтілін	23
Інші	3307316	3348737	Бацилізін	85
Бактеріоцин	3293027	3313906	Клостіцин	-
Нерибосомна пептидсинтетаза	3 576143	3 625851	Бацилібактин	55

Холін-подібні бактеріоцини отримали свою назву завдяки подібності первинної структури та властивостей до специфічних фагових білків – холінів, які перфорують мембрану бактеріальної клітини на пізніх стадіях інфекції та сприяють її руйнуванню, в тому числі забезпечуючи вихід фагових лізоцимів назовні клітини.

Усі виявлені у геномі даного штаму профаги також властиві типовому штаму (рис. 4.17, 4.18; табл. 4.18). Цікаво, що один з профаг-подібних елементів, щоправда, досить сильно деградований, розташований на плазміді (табл. 4.15, рядок 3; табл. 4.18, рядок 3).

Таблиця 4.18

**Профагові елементи, виявлені у геномі
Bacillus pumilus ONU 554**

Профаг	Розмір (кб)	Кількість білок- кодуючих ВРЗ	Локалізація профагового елемента, п.о.		ГЦ пар, %
			з	по	
1	47,7	65	2671911	2719632	39,61
2	41,7	36	2707120	2748899	39,90
Профаг плазмід	6,5	13	64616	71128	37,92

З використанням сервера PATRIC у геномі досліджуваного штаму виявлено 3 749 відкриті рамки зчитування, з них для 3 019 (80,5%) приписано біологічну функцію, а 730 залишилась не ідентифікованими. Визначено також 105 генів РНК, з них генів тРНК - 81, а генів рРНК - 24.

Пошук за допомогою інструмента IslandViewer та VirulenceFinder 2.0 не виявив детермінант патогенності в геномах штамів *B. pumilus* ONU 554, за допомогою ResFinder-3.2 - не виявив детермінант резистентності до аміноглікозидів, бета-лактамів, колістину, фосфоміцину, фузідової кислоти, глікопептидів, макролідів, нітроімідазолу, оксазолідинону, хінолонів, ріфампі-

цину, сульфаніаміду, тетрацикліну та тріметоприму. Виявлено детермінанту резистентності до хлорамфеніколу – ген *cat-86* (хлорамфенікол-ацетилтрансферазу, номер доступу до референсу в базі Genbank K00544.1).

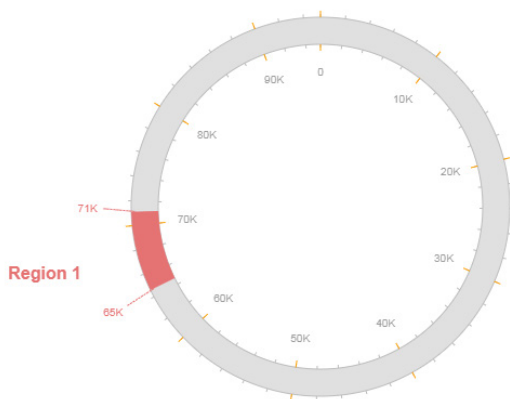


Рис. 4.17. Карта плазмиди *Bacillus pumilus* ONU 554 з локалізацією профагового елемента, виявленого PHASTER

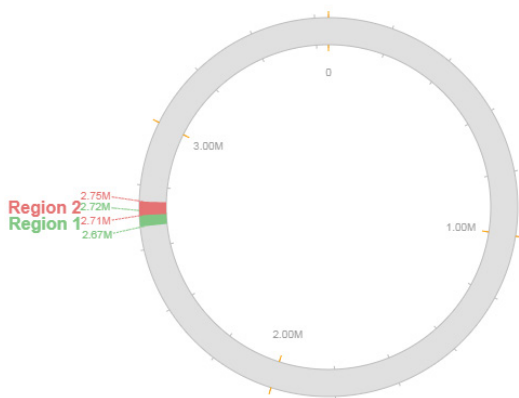


Рис. 4.18. Карта хромосоми *Bacillus pumilus* ONU 554 з локалізацією профагових елементів, виявлених PHASTER

Його локалізація в хромосомі 1163650-1164311 пар основ; ідентичність гену референтній послідовності складає 93,2%. Експериментально наявність резистентності до хлорамфеніколу в цього штаму показана не була (табл. 4.9) [6].

4.6.4. Характеристика геному *B. velezensis* ONU 553

Геном бактерій *B. velezensis* ONU553, як і у попередніх штамів, представлено кільцевою хромосомою, розмір якої дорівнює 3 934 563 пар нуклеотидів, що приблизно на 16 кб більше, ніж у штаму *B. velezensis* FZB42 (рис. 4.12). Порівняльний аналіз геномів даних штамів показав, що перша інсерція в районі 599372-645952 п.о. розміром 46 кб і містить деякі фаг-специфічні білки. Це та дані PHASTER (див. табл. 4.20, рядок 1) доказує, що даний фрагмент належить профагу. Друга інсерція, розміром 27 кб, з координатами 3351458-3378255 п.о., містить полікетидсинтезний кластер. Локалізація даного кластеру приблизно відповідає початку виявленого, але не ідентифікованого системою antiSMASH кластера (табл. 4.19). Вище відмічений надлишок генетичного матеріалу частково скомпенсовано великою кількістю малих інсерцій IS-елементів у геномі *Bacillus velezensis* FZB42 [114].

З використанням сервера PATRIC у геномі досліджуваного штаму виявлено 3 953 відкриті рамки зчитування, з них для 3 252 (82%) приписано біологічну функцію, а 701 залишилась не ідентифікованою (рис. 4.19). Визначено також 113 генів, відповідальних за РНК, з них генів tРНК - 86, а генів рРНК - 27.

Пошук бактеріоцинів за допомогою системи Bagel4 виявив генетичні кластери, що відповідають за синтез двох сполук – LCI-подібного бактеріоцину та амілоцикліцину (табл. 4.19). Ці бактеріоцини належать до таких, що вже відомі для *B. velezensis*. Перший належить до відносно слабо охарактеризованої групи LCI-подібних бактеріоцинів. Прототиповий білок даної групи (LCI) відомий активністю по відношенню до *Xantomonas campestris* pv. *oryzae*, важливого патогену рослин рису [78]. Другий відноситься до групи циклізованих «голова до хвоста» бактеріоцинів та характерний саме для групи видів *B. amyloliquefaciens* [10, 111, 114].

Таблиця 4.19

**Характеристики кластерів, виявлених у геномі
B. velezensis ONU 553**

Тип кластера	Локалізація, п.о.		Найбільш схожий відомий кластер	Подібність, %
	з	по		
Бактеріоцин	299924	300217	LCI	-
Нерибосомна пептидсинтетаза	311 938	376 796	Сурфактин	91
Полікетидсинтетаза	956 092	997 336	Бутірозин	7
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	1084807	1 101975	-	-
Транс-АТ полікетидсинтетаза	1 406685	1 494504	Макролактин	100
Гібриднанерибосомна пептидсинтетаза/ Транс-АТ полікетидсинтетаза	1717970	1,827173	Бацилен	100
Нерибосомна пептидсинтетаза	1 884833	2 021950	Фенгіцин	100
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	2044982	2066865	-	-
Полікетидсинтетаза III типу	2 117302	2,158,402	-	-
Транс-АТ полікетидсинтетаза	2274263	2380436	Дифіцидин	100
Бактеріоцин	3052374	3049942	Амілоцикліцин	-
Нерибосомна пептидсинтетаза	3003787	3054939	Бацилібактин	100
Нерибосомна пептидсинтетаза	3 337057	3 397053	-	-
Інші	3599120	3640538	Бацилізін	100

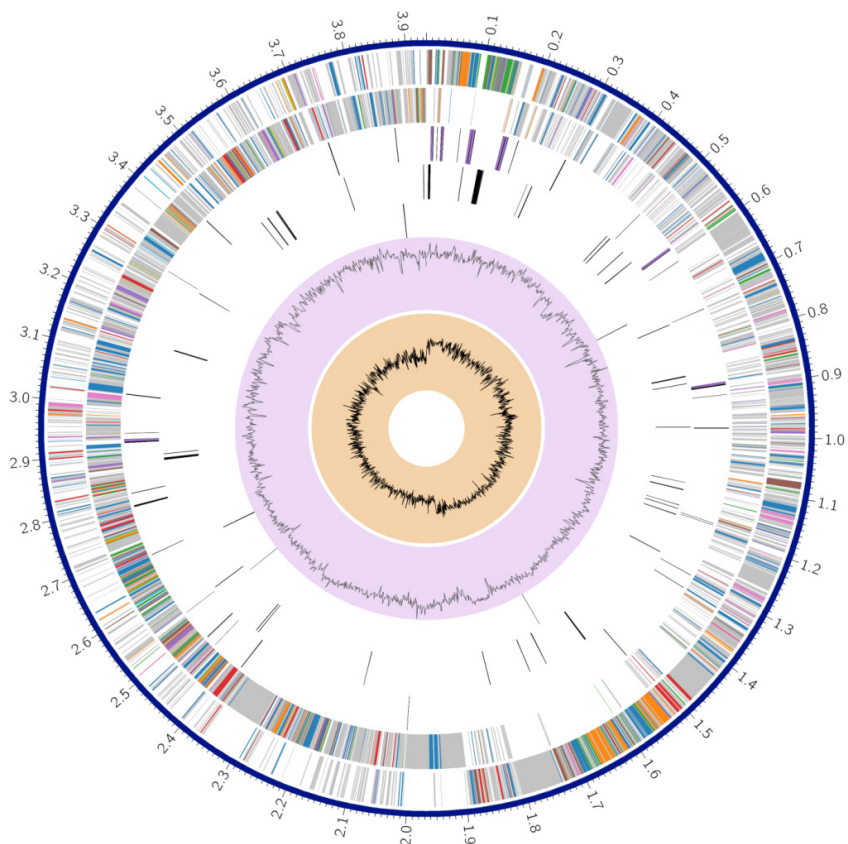


Рис. 4.19. Кільцева карта геному *B. velezensis* ONU 553

Примітка: Ззовні всередину карти: контіг, відкриті рамки зчитування (ВРЗ) на лідируючому ланцюгу, ВРЗ на відстаючому ланцюгу, гени РНК, ВРЗ, що мають гомологію до відомих детермінант антибіотикорезистентності, ВРЗ, що мають гомологію до відомих факторів патогенності, відсоток ГЦ-пар, ГЦ-асиметрія між ланцюгами. Колір лінії відповідає належності відкритої рамки зчитування до певної функціональної підсистеми: синій – метаболізм, зелений – процесинг білків, фіолетовий – відповідь на стрес, захист, вірулентність, помаранчевий – клітинні процеси, червоний – біоенергетика, коричневий – метаболізм ДНК, рожевий – мембранний транспорт, сірий – метаболізм РНК, жовтий – поверхневий апарат клітини, голубий – регуляція та передача сигналу, світло-голубий – різне.

Пошук біологічно активних вторинних метаболітів за допомогою системи antiSMASH виявив 12 кластерів, з яких лише 4 виявилися без відомих гомологів.

З достовірно ідентифікованих кластерів (що відповідає значенню індексу схожості 100%) виявлено функціональні кластери полікетидів – макролактину та дифіцидину, і бацилену, який звичайно також класифікується як полікетид, але синтезується гібридною полікетид-поліпептидсинтетазою [114, 144] (табл. 4.19).

Дані сполуки демонструють бактерицидну активність по відношенню до патогенів людини групи ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) та бактеріальних фітопатогенів; макролактини також демонструють здатність пригнічувати проліферацію клітин меланоми миші та реплікацію вірусу простого герпесу та імунodefіциту людини у лімфобластах [144]. Через свою низьку стабільність вони досі не дійшли до стадії клінічних випробувань, хоча можуть бути перспективними сполуками-лідерами для драг-дизайну [145]. На жаль, на даному етапі досліджень технічно не можливо з'ясувати, які саме варіанти макролактину та дифіцидину синтезує *B. velezensis* ONU 553. Ця проблема може бути вирішена шляхом біохімічних досліджень чи з використання більш просунутих біонформатичних засобів ніж сучасні.

Також виявлено кластери нерибосомного антибіотика фенгіцину, дипептиду бацилізину та сидерофору бацилібактину. З дещо меншою достовірністю ідентифіковано кластер сурфактину (91% подібності) та з дуже низькою – специфічного для бацил аміноглікозидного антибіотика бутірозину (7% подібності).

Пошук за допомогою інструмента IslandViewer та VirulenceFinder 2.0 не виявив детермінант патогенності. Проведений аналіз за допомогою ResFinder-3.2 не виявив детермінант резистентності до оксазолідинону, фосфоміцину, нітроїмідазолу, сульфаніламідів, аміноглікозидів, макролідів, глікопептидів, колістину, фузідової кислоти, феніколу, хінолонів, ріфампіцину, тріметоприму, бета-лактамінів та тетрацикліну. Ці дані підтверджують безпеку потенційного використання даного штаму у біотехнології. Втім, варто мати на увазі, що даний штам мав найбільшу ре-

зистентність до тетрацикліну (табл. 4.9). Така ситуація є, प्रति-
лежною тій, що спостерігається для двох інших штамів.

З чотирьох не ідентифікованих біосинтетичних кластерів
два належать до терпен синтезуючих ферментних комплексів,
один відповідає не ідентифікованій нерибосомній пептидсинте-
тазі, а інший – не ідентифікованій полікетидсинтетазі третього
типу.

Таблиця 4.20

**Профагові елементи, виявлені у геномі
B. velezensis ONU 553**

Розмір (кб)	Кількість білок- кодуючих ВРЗ	Локалізація профагового елементу		ГЦ пар, %
		з	по	
54,1	73	597321	651509	43,18
9,9	15	1168469	1178415	45,75
31,7	43	1229431	1261224	46,97
24,8	10	1841385	1866281	41,21

Пошук профагових елементів за допомогою сервера
FASTER виявив чотири профаги. Їх локалізація, розмір та інші
параметри яких вказані у таблиці 18. Цікаво, що всі виявлені про-
фаги локалізовані в тому самому репліхорі (рис. 4.20).

Проведене секвенування та аналіз структури геному
досліджуваного штаму підтвердили попередню ідентифіка-
цію його за спектром жирних кислот з точністю до підгрупи
B. amyloliquefaciens. Геном дослідженого штаму демонструє на-
явність п'яти найбільш характерних для даного виду біосинте-
тичних кластерів – таких, що відповідають за синтез антимікроб-
них сполук фенгіцину, сурфактину, бациліну, бацилізину та сиде-
рофору бацилібактину. Наявність даних кластерів характерна для
переважної більшості відомих штамів *B. velezensis* [114].

Також наявні детермінанти біосинтезу макролактину та ди-
фіцидину, лише трохи менш поширені (відсутні в одному штамі з
105) [115]. З семи відомих для даного виду бактеріоцинів - субті-



Рис. 4.20. Кільцева карта геному *B. velezensis* ONU 553 з локалізацією профагових елементів, виявлених PHASTER

лін, мерсацидин, бациломіцин, плантазоліцин, лоциломіцин, аміноцикліцин та LCI - виявлено лише два останніх, які відомі переважно для виду *B. amyloliquefaciens* та ряду видів групи *Bacillus subtilis*, відповідно [115]. Бактеріюцин LCI взагалі є таким, що входить до корового геному *B. velezensis* [29, 114].

Отримані дані в цілому узгоджуються з наявною у літературі інформацією про особливості геномів представників виду *B. velezensis* [29], а 14 виявлених біосинтетичних кластерів підтверджують уявлення про цей вид як найбільш біосинтетично активний серед усіх інших представників підгрупи *B. amyloliquefaciens* [49]. Відомо, що у ряду штамів даного виду гени так званих вторинних метаболітів складають в середньому до 8% геному, що майже вдвічі перевищує аналогічний показник для *B. subtilis* [77]. Бактерії цього виду часто асоційовані з

рослинами та за своєю екофізіологією виділяються у категорію ризобактерій, що сприяють росту рослин (plant growth promoting rhizobacteria). До факторів такої біологічної активності належать антимікробні сполуки, що синтезуються бактеріями цього виду та часто мають активність по відношенню до бактеріальних та грибових фітопатогенів [50, 83].

Не ідентифіковані, але виявлені antiSMASH генетичні класери потребують подальшого вивчення методами молекулярної біології та біохімії, оскільки можуть відповідати за синтез раніше невідомих біологічно активних сполук.

Штами *B. velezensis* ONU 553, *B. subtilis* ONU 559 та *B. pumilus* ONU 554 задепоновано у Колекції морських та практично корисних мікроорганізмів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, а штам *B. velezensis* ONU 553 задепоновано в Депозитарії мікроорганізмів IMB НАНУ. Секвеновані геноми зберігаються у базі GenBank під номерами, відповідно, CP043416, CP060417 та CP060799. Плазмиду pONU554 задепоновано у GenBank під номером CP060800.

4.7. Характеристика екзометаболітів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554, *B. subtilis* ONU 559

З використанням рідинної хромато-мас-спектрометрії у бактерій штамів *Bacillus velezensis* ONU 553 виявлено та ідентифіковано 90 метаболітів, *Bacillus pumilus* ONU 554 – 33 та *Bacillus subtilis* ONU 559 - 43. Знайдені в екзометаболімі сполуки можна поділити на дві групи: такі, що вже відомі для представників роду *Bacillus*, та нові, як для даного роду, так і для прокаріот взагалі. Сполуки другої групи підлягають подальшому вивченню та ідентифікації. Аналіз метаболітів було виконано в співставленні з генетичними даними [95, 127].

Серед вторинних метаболітів досліджуваних штамів виявлено варіанти найбільш вивченого класу нерибосомних пептидів – сурфактинів (табл. 4.21, 4.22, 4.23). Метаболіти цього класу відомі у представників *B. velezensis*, *B. pumilus* та *B. subtilis* [50, 66, 145], що підтверджується також нашими результатами. Сурфактини – ацильовані циклічні нерибосомні гептапептиди з сильною поверхневою активністю, а також гемолітичними та антимікроб-

ними (бактеріостатичними та фунгіцидними) властивостями [30]. Для них властивий структурний патерн GluLeuLeu^d (Val/Ala/Iso) AspLeu^dLeu, у якого кільце замикається через β -гідрокси жирну кислоту з довжиною ланцюжка в діапазоні 11-14 атомів. Для підгрупи ліхенізинів характерна заміна глутамінової кислоти на глутамін; крім того, у них значно частіше ніж у класичних сурфактинів зустрічаються заміни лейцину в положеннях 2 та 7 на ізолейцин. Відомо, що поверхнева активність ліхенізину вища, ніж у сурфактину [30]. Взагалі слід відзначити, що біологічна активність численних варіантів сурфактину на сьогодні вивчена слабо.

Структура генетичного кластеру сурфактинів, напроти відома дуже добре. До нього входять три гени субодиниць нерибосомної поліпептидсинтетази (*srfAA*, *sfrAB*, *srfAC*), та низка відносно малих допоміжних відкритих рамок зчитування (BP3), зокрема обов'язкова для полікетидсинтетаз і нерибосомних пептидсинтетаз фосфопантетенілтрансфераза [30, 95].

У досліджених в роботі бактерій виявлено такі сполуки, як антеізо-С16-сурфактин, сурфактин В2 1-Ме естер і т.д. Всі ці сполуки відомі для представників групи *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* та інш.) [30, 66]. Простежується певна видоспецифічність – так, описані у свій час як «пумілацидини» варіанти сурфактинів з кінцевим валіном (пумілацидини В, D, F та G) та ізолейцином (пумілацидини А, С та Е) виявлені у бактерій штаму *B. pumilus* ONU 554 (табл. 20). Аналіз геному даного штаму з використанням PRISM 3 виявив наявність генетичного кластеру, що кодує білки НРПС, модульний склад якого відповідає послідовності компонентів пумілацидинів А, С та Е. Таким чином, можна казати про ідентифікацію кластеру пумілацидину, яка виконана вперше (рис. 4.21) [95].

Штами *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU559 є найбільш подібними за спектрами метаболітів. Зокрема, їх об'єднує наявність сполук класу фенгіцинів: пліпастатинів, фенгіцинів в узькому розумінні та аграстатинів (табл. 4.21, 4.23). Фенгіцини є декапептидами, на відміну від сурфактинів. Важливо відмітити, що поверхнево-активні та бактерицидні властивості фенгіцин-подібних речовин виражені слабше, ніж у сурфактинів. Відмінності

Екзометаболіти *Bacillus velezensis* ONU 553

М ¹	Назва ²	Обрахована маса ³	Біологічне джерело ⁴	Використання / важливість ⁴
1	2	3	4	5
1490,827914	Пліпастатин В1.	1490,827238	<i>Bacillus cereus</i>	Інгібітор фосфоліпази
1476,815714	Пліпастатин А2.	1476,811588	<i>Bacillus cereus</i>	Інгібітор фосфоліпази
1504,848514	Пліпастатин В2.	1504,842888	<i>Bacillus cereus</i>	Інгібітор фосфоліпази
1448,783354	Агастатин А	1448,780288	<i>Bacillus subtilis</i>	Антифунгальний агент, активний проти багатьох фітопатогенів
1476,817244	Не відома	1476,811588	<i>Bacillus cereus</i>	Інгібітор фосфоліпази
1462,803854	Пліпастатин А1. Фенгіцин IX	1462,795938	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Інгібітор фосфоліпази
1476,814834	Невідома	1476,811588	<i>Bacillus cereus</i>	Інгібітор фосфоліпази
993,637664	4-L- Аланінсурфактин В2	993,636188	<i>Bacillus subtilis</i>	Невідомі
1021,668224	ai-C14-сурфактин	1021,667488	<i>Bacillus licheniformis</i>	Невідомі
1007,653654	Гагестатин С	1007,65183	<i>Bacillus subtilis</i>	Демонструє високу антифунгальну активність та цитотоксичність
1039,682324	Гагестатин А	1039,678053	<i>Bacillus subtilis</i>	Демонструє високу антифунгальну активність та цитотоксичність
1053,698034	Гагестатин В	1053,693703	<i>Bacillus subtilis</i>	Демонструє високу антифунгальну активність та цитотоксичність

Продовження таблиці

1	2	3	4	5
993,637754	4-L-Аланінсурфактин B1	993,636188	<i>Bacillus subtilis</i>	Сурфактант
1035,687124	Сурфактин 1	1035,683138	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Сурфактант, фібринолітик, протизапальний агент, антикоагулянт
1021,669474	Сурфактин	1021,667488	<i>Bacillus licheniformis</i>	Сурфактант, фібринолітик, протизапальний агент, антикоагулянт
1049,701824	ai-C16-сурфактин	1049,698788	<i>Bacillus licheniformis</i>	Циклічний, Ліпопептид
1035,682834	Сурфактин B2 l-Me естер	1035,683138	<i>Bacillus pumilus</i>	Сурфактант, фібринолітик, протизапальний агент, антикоагулянт
1049,700514	Сурфактин C2 l-Me естер	1049,698788	<i>Bacillus pumilus</i>	Сурфактант, фібринолітик, протизапальний агент, антикоагулянт
1063,717504	Ліподепептиди	1063,714438	<i>Bacillus pumilus</i>	Комплекс Ліподепептидних антибіотиків близьких до сурфактину та бацирцину

Примітка: 1 – Молекулярна маса сполуки, ідентифікована в даному дослідженні; 2 – назва ідентифікованої сполуки; 3 – Молекулярна маса ідентифікованої сполуки згідно бази даних LC-MS приладу; 4 – джерело та характеристики ідентифікованих сполук згідно бази даних приладу LC-MS (Dictionary of Natural Products, CRC Press).

Екзометаболіти *Bacillus pumilus* ONU 554

М ¹	Назва ²	Обрахована маса ³	Біологічне джерело ⁴	Використання / Важливість ⁴
1035,685954	Сурфактин С	1035,683138	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus natto</i>	Демонструє цитолітичну та поверхневу активність, є сильним інгібітором тромбоутворення.
1049,701784	Сурфактин С2 1-Ме естер	1049,698788	<i>Bacillus pumilus</i>	Фібрінолітик, протизапальний агент, антикоагулянт.
1063,716334	Пумілацидин D	1063,714438	<i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus pumilus</i>	Інгібітор фосфоліпази A2, протівірусний агент.
1077,733354	Пумілацидин С	1077,730088	<i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus pumilus</i>	Інгібітор фосфоліпази A2, протівірусний агент.
423,201684	Антибіотик AI 77A	423,200552	<i>Bacillus pumilus</i>	Активний проти бактерій та пухлинних клітин, захищає від стрес-індукованих виразок, демонструє протизапальні та протихолестеричні властивості, близький до амікумацінів.
300,205144	Ліпоамід А	300,204908	<i>Bacillus pumilus</i>	Невідомі
1021,671364	Сурфактин 7-L- Валінеурфактин C1 Ліпобацилін	1021,667488	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilus</i>	Невідомі
1035,688144	Сурфактин B2 1-Ме ефір	035,683138	<i>Bacillus pumilus</i>	Сурфактант, фібринолітик, протизапальний агент, антикоагулянт

Примітка: 1 – Молекулярна маса сполуки, ідентифікована в даному дослідженні; 2 – назва ідентифікованої сполуки; 3 – Молекулярна маса ідентифікованої сполуки згідно бази даних LC-MS приладу; 4 – джерело та характеристики ідентифікованих сполук згідно бази даних приладу LC-MS (Dictionary of Natural Products, CRC Press).

Екзометаболіти *Bacillus subtilis* ONU 559

М ¹	Назва ²	Обрахована маса ³	Біологічне джерело ⁴	Використання / Важливість ⁴
1488,853264	SNA 60-367-23.	1488,847973	<i>Bacillus</i> sp.	Комплекс ліпопептидів
1474,837954	SNA 60-367-17.	1474,832323	<i>Bacillus</i> sp.	Комплекс ліпопептидів
529,290334	Гліцилпролін- фенілаланіл- пролінзалеїцин	529,290035	<i>Bacillus subtilis</i>	Інгібітор діпептидів карбоксипептидази
1476,816594	Піпаастатин A2	1476,811588	<i>Bacillus cereus</i>	Інгібітор Фосфоліпази
1462,802674	Піпаастатин A1 Фенгцін IX	1462,795938	<i>Bacillus cereus</i>	Інгібітор Фосфоліпази
1490,832564	Піпаастатин B1	1490,827238	<i>Bacillus cereus</i>	Інгібітор Фосфоліпази
1504,847384	Піпаастатин B2	1504,842888	<i>Bacillus cereus</i>	Інгібітор Фосфоліпази
1448,783754	Аграсатин A	1448,780288	<i>Bacillus subtilis</i>	Антифунгальний агент, активний проти багатьох фітопатогенів
1007,650294	Невідома	1007,651838	<i>Bacillus subtilis</i>	Демонструє високу Антифунгальну активність та цитотоксичність
1021,660214	Бамілоцин A	1021,649728	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Поліпептид, близький до сурфактину
1035,676354	Сурфактин 1	1035,683138	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Сурфактант, фібринолітик, протизапальний агент, антикоагулянт
1049,703814	ai-C16-Сурфактин	1049,698788	<i>Bacillus licheniformis</i>	Циклічний Ліпопептид

Примітка: 1 – Молекулярна маса сполуки, ідентифікована в даному дослідженні; 2 – назва ідентифікованої сполуки; 3 – Молекулярна маса ідентифікованої сполуки згідно бази даних LC-MS приладу; 4 – джерело та характеристики ідентифікованих сполук згідно бази даних приладу LC-MS (Dictionary of Natural Products, CRC Press).

фенгіцинів у вузькому розумінні від пліпастатинів полягають у хіральній конформації двох залишків тирозину (4 та 10) у циклі. Аграстатини від пліпастатинів, у свою чергу, відрізняються наявністю у структурі залишку β -гідрокси-, а не аміножирної, кислоти [95, 97].

У штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559 виявлено (табл. 4.21, 4.23) відомі для *Bacillus cereus* та *Bacillus subtilis* пліпастатини A1, A2, B1, B2 [94], які є інгібіторами фосфоліпаз. Детектований системою фенгіцин IX є похідним пліпастатину A1 та відрізняється від останнього відсутністю зв'язаного йону K^+ [60]. Також у цих штамів було виявлено аграстатин A (джерело *Bacillus subtilis* [97]) - антифунгальний агент, активний проти багатьох фітопатогенів. Ліподепсипептиди SNA 60-367-17 і SNA 60-367-23 виявлено лише у штаму *B. subtilis* ONU 559. Вони є погано охарактеризованими ліпопептидами, що відомі для *Bacillus* sp., та відрізняються між собою лише типом жирної кислоти. Для них відома здатність до інгібування ароматаз [18].

Геномні дослідження підтверджують наявність біосинтетичних кластерів, подібних до кластеру сурфактину та фенгіцину, в усіх досліджених штамів.

Цікавим є питання про здатність до детермінації синтезу різних сполук одним і тим самим генетичним кластером. Найвірогідніше вирішення даної проблеми полягає у відомому явищі domain skipping (що можна перекласти як «пропущення доменів»), яке призводить до утворення молекул, «оброблених» різними наборами доменів на одній синтетазі [95, 134].

У бактерій *Bacillus velezensis* ONU 553 виявлено також три типи гагеостатинів - A, B, C (табл. 4.21). Дані сполуки мають однаковий пептидний скелет та відрізняються жирнокислотними залишками на N-кінці, набір яких у нерибосомних пептидів звичайно визначається специфічністю тіоестеразного домену. Сама наявність гагеостатинів у дослідженого штаму є проблематичною для пояснення, оскільки генетичного кластера з полікетидсинтетазних доменів, який міг би їх синтезувати в геномі даного виду не виявлено. Гагеостатини раніше були виявлені лише в одного штаму *Bacillus subtilis* 109GGC020, ізольованого з Південно-китайського моря [125]. Це лінійні ліпопептиди, механізм біосинте-

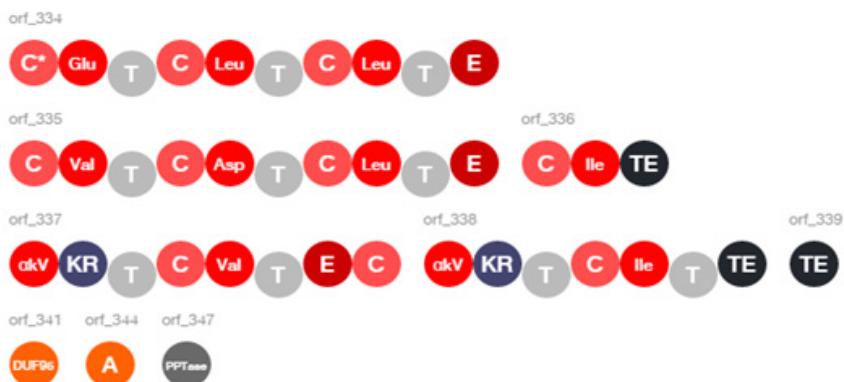


Рис. 4.21. Доменна структура продуктів кластера пумілацидину з геному *Bacillus pumilus* ONU 554, виявлена PRISM 3

Примітка: С – конденсаційні домени; Т – тіолуючі домени, ТЕ – ті-остеразні домени, KR - кеторедуктазний домен. Комбінаціями літер позначено амінокислоти, за активацію яких відповідає відповідний аденілюючий домен

зу яких ще не встановлено, але з самого початку виглядає ймовірним припущення про те, що це класичний нерибосомний пептид, проте генетичний кластер, який міг би відповідати за їх біосинтез, не виявлено. Підкреслимо той факт, що дані сполуки було попередньо виявлено у штаму морського походження близького виду. У штаму *Bacillus subtilis* 109GGC020 було також описано ще два типи антимікробних пептидів – гагеобактини та гагеоте-трини, але вони виявлені не були.

Виходячи з значної структурної подібності, можна зробити обережне припущення щодо синтезу гагеостатинів на синтетазі сурфактину з пропущенням етапів епімеризації для відповідних залишків лейцину та фінальним приєднанням жирної кислоти без циклізації продукту.

Нами проведено порівняльний аналіз доменного складу сурфактин-подібного кластеру штаму *B. velezensis* ONU 553 (рис. 4.22) та показано, що розмір та розташування доменів у даного кластеру та еталонного кластеру біосинтезу сурфактину не від-різняються [95].



Рис. 4.22. Порівняння кластера з геному *Bacillus velezensis* ONU 553 (внизу) з експериментально верифікованим кластером сурфактину (вгорі) [67]

Примітка: Різними кольорами позначено домени відповідного типу: світло-коричневий – конденсаційні домени; блакитним та червоним – N та C кінцеві домени аденіліюючого комплексу; зеленим – домен тіюлювання, темно-рожевий – тіоестеразний домен

Ще однією загадковою знахідкою став пентапептид GPFPI (інгібітор дипептидил карбоксипептидаз, відомий для *Bacillus subtilis*) (табл. 4.23). Ця відносно маловивчена сполука, була відкрита у 1992 році [91]. Вона може являти собою як побічний продукт метаболізму, наприклад, бути залишком сигнального пептиду, чи являти собою феромон. Прямий пошук даного олігопептиду у геномі виявив, що такий пентапептид є частиною гіпотетичного пептиду YvkN, довжина якого складає 76 амінокислотних залишків. Даний пептид входить до кластеру з трьома не ідентифікованими мембранними пептидами та одним не ідентифікованим не мембранним (табл. 4.24). Можна припустити, що серед даних пептидів є такі, що забезпечують процесинг пропептиду з утворенням декретованого пентапептиду та його транспорт. Пошук за допомогою SignalIP 5.0 не детектує у нього жодних секреторних сигналів [95].

Таблиця 4.24

Геномний контекст гену пептиду YvkN, що гіпотетично містить секретований пептид GPFPI

Початок, п.о.	Кінець, п.о.	Ланцюжок	Ідентифікація ВРЗ
3387246	3383377	-	Гіпотетичний білок
3387805	3387446	-	Гіпотетичний мембранний білок YvID
3388004	3387807	-	Гіпотетичний мембранний білок YvIC
3389106	3388009	-	Гіпотетичний білок YvIB
3389457	3389131	-	Гіпотетичний мембранний білок YvIA
3389675	3389905	+	YvkN
3390943	3390104	-	Білок джгутіка FlaA

Значно більш своєрідним у біохімічному плані є штам *Bacillus pumilus* ONU 554 (табл. 4.22). Про наявність у складі його екзометаболізму пумілацидинів С і Д вже було згадано. Геномний майнінг дозволив ідентифікувати генний кластер, який кодує НРПС даного ліпопептиду (рис. 4.21).

Значно менше вивчена сполука - ліпоамід А, яка також була виявлена у *Bacillus pumilus* ONU 554. Раніше вона вже була виявлена у морського штаму *Bacillus pumilus* SP21 [19]. Їй властива відносно слабка (МІК 100м/мл) антимікробна активність по відношенню до *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Ліпоаміди є дуже простими сполуками і фактично являють собою кон'югат аспарагіну з антеізо жирними кислотами з довжинами ланцюга в діапазоні 11-13. Вони мають низьку антимікробну активність (МІК вище 100 мкг/г) [19]. Важливо не плутати дані сполуки з амідами ліпоєвої кислоти. Можливості сучасних методів геноміки на цей час не дозволяють локалізувати в геномі детермінанти біосинтезу ліпоаміда А.

Черговою цікавою та специфічною у бактерій виду *Bacillus pumilus* є сполука AI-77, активна проти грам-позитивних та грам-негативних бактерій, цитотоксична, має антихолестеричні та протизапальні властивості. Сполука AI 77А належить до амікумацинів – антибіотиків, які дуже характерні саме для бацил. Відомо лише три подібні сполуки для актинобактерій і майже трьох десятків бацил, що не характерно для жодного іншого класу антибіотиків [128].

Речовини даної групи складаються з консервативного дигідроізокумаринового ядра та сполученої з ним амідним зв'язком типоспецифічної частини. Сполука AI 77 має антибактеріальну активність по відношенню до збудника виразки шлунку *Helicobacter pylori*. Механізм його дії полягає у зв'язуванні молекули одночасно з мРНК та 16S рРНК малої субодиниці рибосоми, що спричиняє припинення синтезу білка. Біосинтетичні кластери для амікумацин-подібних антибіотиків вивчено дуже слабо. Шляхом порівняння за допомогою програмного забезпечення Easyfig було показано певну гомологію кластера гібридної (НРПС/ПКС) синтетази з геному *Bacillus pumilus* ONU 554 та кластером добре вивченого антибіотика даної групи – ксенокумацину (рис. 4.23) [95].

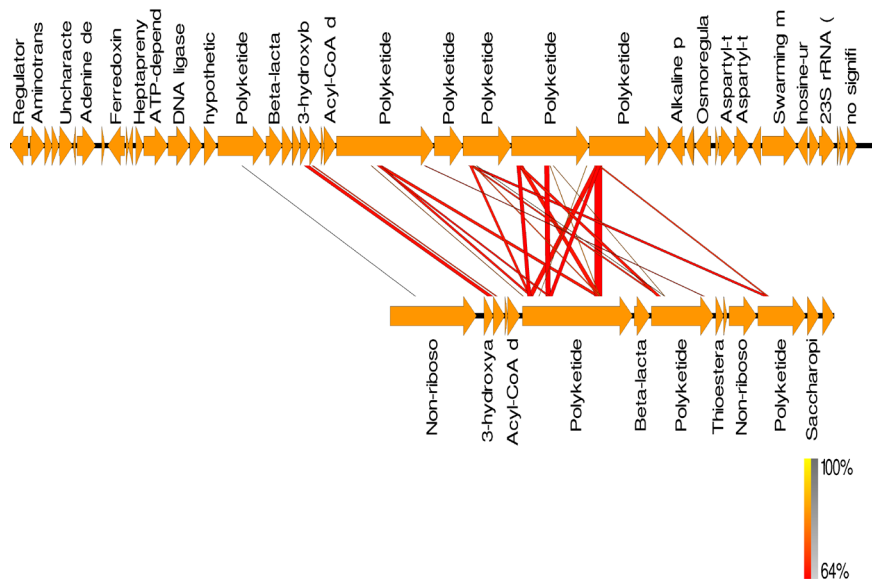


Рис. 4.23. Порівняння кластера AI-77 з геному *Bacillus pumilus* ONU 554 (вгорі) та ксенокумацину з геному *Xenomonas* sp. (внизу) [67]. Червоним позначено ділянки з гомологією >90%

Аналіз інших метаболітів, що залишилися не ідентифікованими (для *Bacillus velezensis* ONU 553 - 58, для *Bacillus pumilus* ONU 554 – 22, *Bacillus subtilis* ONU 559 – 28), являє собою складну задачу. Як було встановлено за допомогою аналізатора transATor, структура продуктів трансАТ-полікетидсинтеаз, що були виявлені в досліджених геномах та ідентифіковані antiSMASH як макролактин, дифіцидин та бацилін, не відповідає відомій структурі для даних сполук [66]. Тому реальні продукти цих генетичних комплексів потребують подальшої ідентифікації [95].

Обговорення

Мікробіота морських водойм є перспективним джерелом продуцентів нових антимікробних метаболітів. Дане судження базується на двох засадах. По-перше, дані біотопи характеризуються специфічними гідрологічними та фізико-хімічними умовами, що сприяє формуванню власного генного пулу у прокаріотної мікробіоти; по-друге, морські водойми через обмежену гідроциркуляцію і несприятливі для тварин-пертурбаторів ґрунту умови мають відносно механічно стабільні пласти осадів [9]. Остання обставина робить можливим перетворення донних відкладень таких водойм на своєрідні «банки діаспор», де можуть зберігатися кріптобіотичні форми мікроорганізмів з суходолу, шельфу та пелагіалі. Найбільш цікавими для класичного мікробіологічного дослідження є ендоспори бактерій, через їх високу здатність до переживання несприятливих умов та високий біосинтетичний потенціал. Через відносну технічну простоту виділення об'єктом даного дослідження було обрано аеробних бацил. Додатковим аргументом на користь виділення саме бацил є їх відносна однорідність за характеристиками резистентності ендоспор [39, 85, 93].

Для ізоляції аеробних споротвірних бактерій було використано проби глибоководних донних відкладень Чорного моря, відібраних з глибини до 2080 метрів в ході експедицій М84/2 Бременського університету на науково-дослідному судні МЕТЕОР: станції 233, 242, 258, 269 [22], які були передані Б.Г. Александровим з Інституту морської біології НАНУ на кафедру мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ для мікробіологічних досліджень; та зібрані науковим співробітником БННЦ ОНУ Г.В. Лісютіним на науково-дослідному судні «MARE NIGRUM» (Румунія) - станція 116. Дані глибини характеризуються високим гідростатичним тиском, відносно низькими температурами (8-9 °C) та анаеробіозом на фоні з насиченістю води сірководнем (при концентрацій 0,5-1,5 мкмоль/л [22]). Аборигенна мікробіота донних відкладень досі лишається маловивченою та, гіпотетично, складається з двох великих кластерів – синтрофних асоціацій анаеробних метанокиснюючих архей з сульфатредуквальними бактеріями (карбонат, що утворюється в результаті цього надзвичайно малоенергоєфективного процесу, утворює рифоподібні

структури в місцях виділення метану з донних відкладень) [24, 71], та спільноти мікроорганізмів, що відповідають за деградацію органічних часток, седиментованих з оксигенованих шарів води [122]. Концентрація клітин анаеробів зі зрозумілих причин як мінімум на два порядки перевищує значення для аеробів та сягає значень 10^8 , а для анаеробних метаноокиснюючих мікроорганізмів навіть більших значень [71, 105].

Всупереч відомим фактам присутності на цих глибинах лише облигатних анаеробів нами було зроблено припущення про можливу наявність в осадах ендоспор бактерій, які осідали на дно з морської товщі в агрегатах разом з "морським снігом", формуючи морські відкладення. Шляхом радіоізотопного аналізу було показано, що швидкість накопичення донних осадів у Чорному морі оцінюється в діапазоні від 0,1 мм у глибинних ділянках до 0,5 мм за рік близ берегів [38, 118]. Уже в перших посівах нами було виявлено присутність в морських глибоководних осадах значної кількості споротвірних бактерій, які добре росли в аеробних умовах.

Тому перший етап роботи було присвячено визначенню чисельності мезофільних аеробних споротвірних бактерій в донних відкладеннях Чорного моря. Для різних регіонів земної кулі відомі різні дані по чисельності таких мікроорганізмів в донних відкладеннях. Звичайний консенсус полягає в тому, що донні відкладення (відносно) ізольованих водойм містять більше ендоспор аеробів, ніж відкритих водойм, що пояснюють більшою значущістю річкового привнесення [101]. Проблемою для інтерпретації в такому ключі отриманих даних є специфіка донних відкладень Чорного моря. Через свою анаеробність та низьку температуру вони, з високою вірогідністю, позбавлені активної аеробної мезофільної мікробіоти, тому характеристики фонду ендоспор повинні бути близькими до таких, що очікуються від аналогічних резервуарних біотопів – зокрема, підводним солоним озерам, добре вивченим в роботі Sass et al. (2008).

Встановлено, що в осадах Чорного моря загальна чисельність гетеротрофних бактерій приймала значення в діапазоні 10^4 - 10^7 КУО/г, а споротвірних бактерій, що вирости з ендоспор, - 10^2 - 10^6 КУО/г, тобто приблизно на порядок менше. Ці дані по-

гано узгоджуються з відомим результатом про значну долю споротвірних форм серед мікробіоти напівзамкнених та замкнених водойм. Так, в роботі, де вперше було отримано такий результат, частка спороутворювачів сягала 70%. Проте простежується відповідність з вищезгаданим результатом Sass et al (2008), де при загальній чисельності помірно-галофільних бацил порядку 10^5 КУО/г тотальна чисельність локальної мікробіоти мала порядок 10^7 КУО/г. Динаміка загальної чисельності гетеротрофних та споротвірних бактерій в залежності від горизонту відрізняється. Так, для перших виявлено тренд до збільшення КУО/г з глибиною горизонту. Вміст ендоспор повільно знижується зі збільшенням глибини з 5×10^5 КУО/г до приблизно 1×10^5 КУО/г.

У процесі визначення чисельності виділено та очищено 130 ізолятів аеробних споротвірних бактерій з донних відкладень Чорного моря. Для масової оцінки біорізноманітності аеробних бацил донних відкладень було використано аналіз спектрів жирних кислот. Даний метод добре відпрацьований на представниках даної групи; головною практичною проблемою інтерпретації його результатів є значна недооцінка реального біорізноманіття аеробних споротвірних бактерій у навколишньому середовищі, що призводить до браку в базах даних ЖК-спектрів для численних, але невідомих видів. Це призвело до того, що близько 11% отриманих штамів не було ідентифіковано. Результати ідентифікації виявилися дещо неочікуваними. Так, виявлено, що близько 50% отриманих ізолятів належить до трьох видів, що вже відомі як мешканці ґрунту – *Bacillus megaterium*, *Brevibacillus reuszeri* та *Bacillus subtilis*. Лише один з цих видів відомий раніше як домінантний вид аеробних бацил у морських відкладеннях, а інші два (*B. cereus* та *B. pumilus*) також були виявлені, але в даному випадку вони складають лише 4,6% від загального розміру колекції та представлені, відповідно, 1 та 5 штамми [13].

Виділені ізоляти ідентифіковано методом хемотаксономії шляхом порівняння спектрів жирних кислот та віднесено до видів *Bacillus megaterium*, *Brevibacillus reuszeri*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus viscosus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus luciferensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus halmapalus*, *Bacillus* sp. GC group 22, *Paenibacillus larvae*, *Brevibacillus*

choshinensis. Ідентифікація штамів, визначених автоматично як *Bacillus* sp. GC group 22, є відкритим питанням, оскільки Вільсон з співавторами пропонують визначати їх як *Bacillus firmus* [135].

В цілому, біорізноманітність донних відкладень виявилася близькою до такого в ґрунтах. Також виявлено представників кількох рідкісних видів, зокрема три представники *B. luciferensis*, типовий штам якого було ізолювано з ґрунту на Південних Сендвічевих островах (Субантарктика) [80]. При порівнянні між собою розподілів по видах з окремих станцій виявився факт великої схожості їх між собою (табл. 4.6). В усіх випадках *Bacillus megaterium* GC subgroup A входить до трійки самих численних штамів. Це враження знаходить підтвердження при порівнянні між собою індексів різноманіття Сімпсона, які розраховані за допомогою вищезгаданого інструменту, для станцій 233, 242, 258 та 269. Вони дорівнюють, відповідно, 0,1; 0,1; 0,08 та 0,2, тобто практично рівні.

У подальшому отримані ізоляти були охарактеризовані за антагоністичною активністю по відношенню до збудників опортуністичних інфекцій людини і тварин *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* B-4001, *Bacillus subtilis* ATCC 10774, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* B-329, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Лише 32% протестованих штамів продемонстрували здатність до пригнічення росту збудників опортуністичних інфекцій людини та тварин. Найбільш активними виявилися штами, що було віднесено до видів відомих своєю здатністю до синтезу численних антимікробних метаболітів. Так, значна активність відмічалася для *B. subtilis* з показником 60% та *B. licheniformis* - 58%, *B. amyloliquefaciens* - 57%, відповідно. Цікаво, що дуже близьке значення продемонстрували штами виду *B. agaradhaerens* (66%), для якого не зареєстровано здатності до синтезу антибіотиків чи бактеріоцинів. З нечисленних видів високу активність виявили *P. larvae*, *P. macerans* та *B. atrophaeus* з відповідним показником 86%. Найбільш низька активність відмічалася для штамів видів *B. megaterium* (26%), *B. pumilus* (19%), *B. cereus* (17%) та *Br. reuszeri* (6%) [61]. За даними літератури мало інформації про

антимікробну активність та її фактори для даних видів, окрім *B. pumilus* відомого своїми антибіотиками групи амікумацінів проти *H. pylori* [112]. Для *B. cereus* відомі маловивчені та неklasифіковані низькомолекулярні бактеріоцини, а для *B. megaterium* сполуки групи бактеріолізину [145].

Найбільш активними досліджуваними штамами були по відношенню до *Candida albicans* ATCC 10231, *Proteus vulgaris* ATCC 6896 та *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Найменш чутливими виявилися тест-штами *Pseudomonas aeruginosa* B-329, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. Сам факт чутливості тест-штамів, що належать до групи ESKAPE, до продуктів метаболізму ізолятів є багатообіцяючим, її низька ступінь вираженості може свідчити лише про низькі темпи синтезу активного фактору. Показано високий ступінь антагонізму досліджуваних штамів до грам-позитивних бактерій *S. aureus* та *B. cereus* (частка активних бактерій по відношенню до них сягає 89% та 85%, відповідно, серед усіх активних штамів). На цьому фоні показовою деталлю є суттєва різниця між середньою антагоністичною активністю досліджених штамів по відношенню до індикаторних штамів *B. cereus* та *B. subtilis*. Дані риси антагоністичної активності можуть вказувати на роль в її формуванні саме бактеріоцинів, а не антибіотиків, на що вказує висока селективність до споріднених до продуцента штамів, характерна для бактеріоцинів [113].

За показниками антимікробної активності було відібрано штами *B. velezensis* ONU 553 (висока активність по відношенню до ентеробактерій), *B. megaterium* ONU 554 (активний по відношенню до грам-позитивних бактерій, включаючи *S. aureus*) та *B. subtilis* ONU 559 (активний по відношенню до *C. albicans*), для подальших досліджень їх біологічних властивостей та аналізу спектрів екзометаболітів та геномів шляхом їх секвенування. Результати вивчення показників вуглеводного складу, спектрів утилізації цукрів, чутливості до антибіотиків та морфології відібраних бактерій *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 є цілком типовими для цих видів.

У спектрах жирних кислот виявлено специфічні жирні кислоти – для *B. velezensis* ONU 553 це 17:0, , 13:0 anteiso, 14:0

anteiso, 11:0 2OH, для *B. pumilus* ONU 554 такою жирною кислотою є 15:0 iso 3OH, для *B. subtilis* ONU 559 - 18:0, 17:0 iso 3OH, 17:0 2OH, 19:0 iso, 19:0 anteiso, відповідно [11]. Показники індексів термофільності HAI та a15/i15 штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 характерні для мезофільних бактерій [73]. Температурні діапазони росту для даних штамів не визначалися, проте всі вони демонстрували задовільний ріст за інкубації при 30 °C.

Дані тотального вмісту протеїногенних амінокислот дали свою цікаву інформацію. Для їх аналізу було використано методику Моуга по порівнянню послідовностей амінокислот за спаданням вмісту. Технічно метод було реалізовано шляхом порівняння даних послідовностей за допомогою рангової статистики Кендела, реалізованої на мові Пайтон. Виявилося, що послідовності для штамів *B. pumilus* ONU 554 та *B. velezensis* ONU 553 статистично достовірно близькі до штамів піщаного узбережжя. Відповідно, це в сукупності з вищезазначеними результатами аналізу жирнокислотного складу даних штамів може свідчити про алохтонність досліджуваних штамів для донного ґрунту анаеробної зони Чорного моря [11]. На жаль, використання цього методу є досить рідкісним прийомом і неможливо представити літературні приклади його використання для бацил.

Дані про вуглеводний склад є не такими однозначними і віцілому характеризують дані мікроорганізми як представників роду *Bacillus*. Зокрема, у них виявлено цукор хіновозу, що характерний для ендоспор *B. subtilis* та вегетативних форм деяких штамів цього виду [138]. Цікавою знахідкою є виявлення арабінози, що серед прокаріот відома лише для ряду актинобактерій як компонент арабіногалактану [11, 42, 51].

Методи видової ідентифікації мікроорганізмів, зокрема прокаріот останніми роками зсуваються від використання окремих високонсервативних послідовностей на зразок 16S рДНК чи конкатенатів таких генів, до порівняння між собою повних геномів. Ця задача являє собою складну проблему для обчислювальної біології, зокрема через брак ефективних алгоритмів та обчислювальних потужностей. Різноманітні індекси міжгеномної подібності ще далекі від досконалості, тому оптимальним є їх

комбіноване використання. Для нашої роботи було використано три таких індекси: OrthoANI (реалізований через спеціальне програмне забезпечення), dDDH (за формулою d_4) та вмісту GC-пар (останні методи реалізовано на базі пайплайну TYGS). Інтерпретація останнього в якості індексу повногеномної подібності може виглядати дивною, але даний індекс відповідає основним критеріям, хоча зі зрозумілих причин погано відображає первинну структуру ДНК. З використанням цих методів найбільш антагоністично активні штами було визначено як *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559.

Загальна характеристика секвенованих геномів цих бактерій добре укладається в діапазон значень окремих ознак, властивих відповідним видам [6, 54, 74, 99, 114]. Розміри геномів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 мають, відповідно, 3934563, 3642544, 4004302 п.о., вміст ГЦ-пар - 46,69; 41,93; 43,90%, відповідно, кількість відкритих рамок зчитування знаходиться в діапазоні 3749-4084. У геномах *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 виявлено, відповідно, чотири, три та два профагові елементи (в *B. pumilus* ONU 554 один з них локалізований на плазміді). Бактерії штаму *B. pumilus* ONU 554 мають одну плазмиду, що також є досить характерним для штамів цього виду [6, 48]. Геном штаму *B. subtilis* ONU 559 приблизно на 200 кб менший за геном типового, дві з делецій відповідають профагам типового штаму. Також наявні 10 біосинтетичних кластерів, з яких 3 неідентифіковані та гіпотетичні детермінанти резистентності до макролідних та аміноглікозидних антибіотиків, але тест Байера-Кірбі її наявності не підтвердив.

Геном штаму *B. pumilus* ONU 554 майже на 100 кб менший за геном відповідного типового штаму в той час як геном *B. velezensis* ONU 553 більший за геном типового штаму на 16 кб. Вміст біосинтетичних кластерів для цих геномів дорівнює 13 та 14, відповідно, з яких неідентифікованими є 3 та 4. В геномі штаму *B. pumilus* ONU 554 виявлено детермінанту резистентності до хлорамфеніколу, реалізація якої була спростована експериментально. Натомість, штам *B. velezensis* ONU 553, в геномі якого не було виявлено жодних детермінант антибіотикорезистентно-

сті, виявився відносно стійким до тетрацикліну. Обидва штами поєднує наявність генетичного кластеру, що кодує різні варіанти замкненого «голова до хвоста» бактеріюцину (амілоцикліцину для *B. velezensis* ONU 553 та пумілярину *B. pumilus* ONU 554) [114, 130].

Для видів *B. subtilis*, *B. pumilus* та *B. velezensis* відомий широкий спектр вторинних метаболітів, до якого входять антибактеріальні, антифунгальні сполуки, а також сидерофори. З біохімічної точки зору ці сполуки класифікуються як різноманітні ліпопептиди, полікетиди, гібридні та некласифіковані сполуки. Методом рідинної хромато-мас-спектрометрії у бактерій штаму *Bacillus velezensis* ONU 553 нами виявлено та ідентифіковано 90, *Bacillus pumilus* ONU 554 – 33, *Bacillus subtilis* ONU 559 – 43 метаболіти. Серед ліпопептидів вивчених штамів виявлено сполуки малої частини класів, які відомі для бацил. Ці сполуки представлено двома класами – сурфактини (зокрема антеізо-С16-сурфактин, сурфактин В2 1-Ме естер) та фенгіцини, щоправда, кожен з них представлений великою різноманітністю представників (що скоріше пояснюється біохімічними причинами, ніж генетичними) [30, 66, 94]. Всі три штами синтезують сполуки класу сурфактинів, причому спектри демонструють видоспецифічність. Зокрема виявлені варіанти сурфактинів вже відомі саме для цих видів. Цікавою знахідкою є виявлення рідкісного варіанту сурфактинів – гагеотетринів, які фактично є незамкненими в кільце аналогами сурфактинів, для *B. velezensis*; раніше вони були відомі лише для одного з штамів *B. subtilis*, до речі, морського походження [125]. Цікаво, що макролактинові кислоти – метаболіти, що також є результатом синтезу з пропущенням етапу циклізації – також відомі для морських бактерій [117]. Також виявлено антибіотик з групи амікумацинів AI-77 у штаму *B. pumilus* ONU 554. Цікавою знахідкою є виявлення пентапептиду з протеазоінгібуючою активністю GPFPI та ідентифікація його біосинтетичного кластеру. Цей пептид вже відомий для представників виду [91]. Багато сполук лишилися не ідентифікованими, їх ідентифікація потребує окремого дослідження [95].

В підсумку можна стверджувати, що донні відкладення Чорного моря підтверджують свою характеристику як «насінне-

вого банку» для бактерій, що населяли старі в геологічному плані біотопи поверхні та прибережних районів, і місця перебування яких вже, ймовірно, знищені змінами рельєфу, клімату чи людською діяльністю. Вивчення генофонду законсервованих в товщі відкладень ендоспор може додати до скринінгових досліджень нового виміру – часового, даючи можливість вивчати і використовувати не лише зразки сучасного генетичного матеріалу, але й такого з минулих епох. Аеробні спороутвірні бактерії показали свою біологічну активність. Подальше вивчення їх біорізноманітності, генетичного та біосинтетичного потенціалу потенційно несе велику користь для біотехнології та фундаментальної мікробіології і навіть інших природничих наук, зокрема геології, оскільки може пролити світло на закономірності зміни біотопів на берегах Чорного моря та морських басейнів, що передували йому в часі. Виявлені та вивчені антагоністично активні штами показали свою перспективність як продуцентів вже відомих та нових сполук, а також потенціал як матеріалу для розробки пробіотичних препаратів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Васильєва Н. Ю., Крилова К. Д., Кристофферсен Й. Б., Дубровіна О. А., Іваниця В. О. Мікробна різноманітність прибережних вод Одеської затоки Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2018. – № 4. – Р. 63–75.
2. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.
3. Дзюблюк Н. А., Варбанець Л. Д., Булигіна Т. В. Вплив ліпополісахаридів *Pantoea agglomerans* на активність протеаз *Bacillus* // Мікробіологічний журнал. – 2018. – Т. 80, № 1. – Р. 27–35.
4. Дзюблюк Н. А., Чернишенко В. О., Броварська О. С., Варбанець Л. Д. Порівняльна характеристика протеаз *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 і *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465 // Мікробіологічний журнал. – 2018. – Т. 80, № 5. – Р. 36–47.
5. Іваниця В. О., Боброва О. Є., Остапчук А. М., Кристофферсен Й. Б., Коротаєва Н. В., Лісютін Г. В. та ін. Біологічна різ-

- номанітність бактерій ґрунту та поверхневих вод Чорного моря // Наук. Зап. Терноп. Нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. – 2015. – Р. 270–273.
6. Іваниця В. О., Штеніков М. Д., Остапчук А. М., Васильєва Н. Ю., Калиновський Й. Сіквенс геному *Bacillus pumilus* ONU 554, ізольованого з глибоководних донних відкладень Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – Т. 50, № 3. – С. 46–57.
 7. Иваница В. А., Бухтияров А. Е. Таксономический состав гетеротрофных бактерий Одесского побережья, устойчивых к тяжелым металлам // Морський екологічний журнал. – 2004. – Т. 3, № 3. – Р. 49–54.
 8. Іваниця В. О., Штеніков М. Д., Остапчук А. М. Факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії глибоководних відкладень Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – Т. 40, № 4. – С. 94–103.
 9. Лебедь А. А. Микробиологическая характеристика донных осадков западного шельфа Черного моря // Экология моря. – 1987. – № 26. – Р. 48–50.
 10. Штеніков М. Д., Іваниця В. О. Бактеріюцини факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – Т. 33, № 2. – Р. 6–32.
 11. Штеніков М. Д., Остапчук А. М., Іваниця В. О. Склад жирних кислот, амінокислот та моносахаридів бактерій роду *Bacillus*, виділених з донних відкладень Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – Т. 48, № 1. – Р. 20–31.
 12. Abdi H. Kendall rank correlation / Ed. Salkind N. J. // Encyclopedia of Measurement and Statistics.– Thousand Oaks (CA): Sage, 2007. – Р. 508–510.
 13. Ammini P., Kiran K., Jiya J., Neetha J., Santha N. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India // Braz J Microbiol. – 2009. – V. 40, № 2. – Р. 269–275.
 14. Armenteros A. J. J., Tsirigos K. D., Sønderby C. K., Petersen T. N., Winther O., Brunak S. et al. Signal P 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks // Nat Biotechnol. – 2019. – V. 37, № 4. – Р. 420–423.

15. Arndt D., Grant J. R., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44, № 1. – P. 16–21.
16. Aunpad R., Panbangred W. Evidence for two putative holin-like peptides encoding genes of *Bacillus pumilus* strain WAPB4 // *Current microbiology.* – 2012. – V. 64, № 4. – P. 343–348.
17. Auch A. F., von Jan M., Klenk H. P., Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison // *Standards in genomic sciences.* – 2010. – V. 2, № 1. – P. 117–134.
18. Balunas M. Natural products as aromatase inhibitors: Identification and structure-activity aspects. – University of Illinois at Chicago: ProQuest Dissertations Publishing, 2007. – 24 p.
19. Berrue F., Ibrahim A., Boland P., Kerr R. G. Newly isolated marine *Bacillus pumilus* (SP21): A source of novel lipoamides and other antimicrobial agents // *Pure Appl. Chem.* – 2009. – V. 81, № 6. – P. 1027–1031.
20. Bertelli C., Laird M. R., Williams K. R., Lau B. Y., Hoad G., Winsor G. L., Brinkman F. S. L. IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets // *Nucleic Acids Research.* – 2017. – V. 45. – P. 30–35. doi: 10.1093/nar/gkx343
21. Blin K., Shaw S., Steinke K., Villebro R., Ziemert N., Lee S. Y. et al. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47, № 1. – P. 81–87.
22. Bohrmann G., Ohling G. R/V Meteor Cruise Report M84/2 / Eds. G. Bohrmann, G. Ohling – Bremen, 2011. – 184 p.
23. Borriss R., Danchin A., Harwood C. R., Médigue C., Rocha E. P. C, Sekowska A., Vallenet D. *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement // *Microbial biotechnology.* – 2018. – V. 11, № 1. – P. 3–17.
24. Briggs B. R., Pohlman J. W., Torres M., Riedel M., Brodie E. L., Colwell F. S. Macroscopic Biofilms in Fracture-Dominated Sediment That Anaerobically Oxidize Methane // *Applied And Environmental Microbiology.* – 2011. – V. 77, № 19. – P. 6780–6787.

25. Brito P. H., Chevreux B., Serra C. R., Schyns G., Henriques A. O., Pereira-Leal J. B. Genetic competence drives genome diversity in *Bacillus subtilis* // Genome biology and evolution. – 2018. – V. 10, № 1. – P. 108–124.
26. Bull A. T., Stach J. E. M. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery // Trends in microbiology. – 2007. – V. 15, № 11. – P. 491–499.
27. Burton A., Kearns D. The large pBS32/pLS32 plasmid of ancestral *Bacillus subtilis* // Journal of Bacteriology. – 2020 – V. 202, № 18. – P. 1–11. doi: 10.1128/JB.00290-20
28. Chopra L., Singh G., Choudhary V., Sahoo D. K. Sonorensin: an Antimicrobial Peptide, Belonging to the Heterocycloanthracin Subfamily of Bacteriocins, from a New Marine Isolate, *Bacillus sonorensis* MT93 // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – V. 80, № 10. – P. 2981–2990.
29. Chun B. H., Kim K. H., Jeong S. E., Jeon C. O. Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group – *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis* – revealed by pan-genome analysis // Food Microbiol. – 2019. – V. 77. – P. 146–157.
30. Cochrane S. A., Vederas J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates // Med Res Rev. – 2016. – V. 36, № 1. – P. 4–31.
31. Collins F. W., O'Connor P. M., O'Sullivan O., Rea M. C., Hill C., Ross R. P. Formicin – a novel broad-spectrum two-component lantibiotic produced by *Bacillus paralicheniformis* APC 1576 // Microbiology. – 2016. – V. 162, № 9. – P. 1662–1671.
32. Corinaldesi C. New perspectives in benthic deep-sea microbial ecology // Frontiers in Marine Science. – 2015. – V. 2. – P. 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmars.2015.00017>
33. Costa da M. S., Albuquerque L., Nobre F. M., Wait R. The Identification of Fatty Acids in Bacteria // Methods in Microbiology. – 2011. – V. 38, № 1. – P. 183–196.
34. Darling A. E., Mau B., Perna N. T. Progressive Mauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement // PloS one. – 2010. – V. 5, № 6. – P. 1. –17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>

35. De Menezes C. B. A., Afonso R. S., de Souza W. R., Parma M. M., de Melo I. S., Fugita F. L. S. *Williamsia aurantiacus* sp. nov. a novel actinobacterium producer of antimicrobial compounds isolated from the marine sponge // Archives of microbiology. – 2019. – V. 201, № 5. – C. 691–698.
36. De S., Kaur G., Roy A., Dogra G., Kaushik R., Yadav P., Singh R., Datta T. K., Goswami S. L. A Simple Method for the Efficient Isolation of Genomic DNA from Lactobacilli Isolated from Traditional Indian Fermented Milk (dahi) // Indian J Microbiol. – 2010. – V. 50, № 4. – P. 412–418. doi: 10.1007/s12088-011-0079-4
37. De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Second Edition. – Springer; Heidelberg; London; New York, 2009. – V. 3. The Firmicutes. – 1450 p.
38. Degens E. T., Stoffers P., Golubic S., Dickman M. D. Varve Chronology: Estimated Rates Of Sedimentation In The Black Sea Deep Basin. – 1978. – P. 499–508. doi: 10.2973/DSDP.PROC.42-2.114.1978
39. Dhakal D., Pokhrel A. R., Shrestha B., Sohng J. K. Marine Rare Actinobacteria: Isolation, Characterization, and Strategies for Harnessing Bioactive Compounds // Frontiers in Microbiology. – 2017. – V. 8, № 1106. – P. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2017.01106
40. Diomandé S. E., Chamot S., Antolinos V., Vasai F., Guinebretière M. H., Bornard I. et al. The CasKR Two-Component System Is Required for the Growth of Mesophilic and Psychrotolerant *Bacillus cereus* // Applied And Environmental Microbiology. – 2014. – V. 80, № 8. – P. 2493–2503.
41. Diomandé S. E., Nguyen-The C., Guinebretière M. H., Brousolle V., Brillard J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation // Frontiers in Microbiology. – 2015. – V. 6. – P. 1–20.
42. Doyle R. J. Glycomicrobiology / Ed. R. J. Doyle. – Kluwer Academic Publishers; New York; Boston; Dordrecht; London; Moscow, 2002. – 557 p.

43. Du H., Jiao N., Hu Y., Zeng Y. Diversity and distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments // FEMS Microbiology Ecology. – 2006. – V. 57. – P. 92–105.
44. Dunlap C. A., Kim S.-J., Kwon S.-W., Rooney A. P. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2016. – V. 66, № 3. – P. 1212–1217. doi: 10.1099/ijsem.0.000858
45. Ettoumi B., Bouhajja E., Borin S., Daffonchio D., Boudabous A., Cherif A. Gammaproteobacteria occurrence and microdiversity in Tyrrhenian Sea sediments as revealed by cultivation-dependent and -independent approaches // Systematic and Applied Microbiology. – 2010. – V. 33, № 4. – P. 222–231.
46. Ettoumi B., Guesmi A., Brusetti L., Borin S., Najjari A., Boudabous A., Cherif A. Microdiversity of Deep-Sea Bacillales Isolated from Tyrrhenian Sea Sediments as Revealed by ARISA, 16S rRNA Gene Sequencing and BOX-PCR Fingerprinting // Microbes and Environments. – 2013. – V. 28, № 3. – P. 361–369.
47. Ettoumi B., Raddadi N., Borin S., Daffonchio D., Boudabous A., Cherif A. Diversity and phylogeny of culturable spore-forming Bacilli isolated from marine sediments // Journal of Basic Microbiology. – 2009. – V. 49. – P. 13–23.
48. Evdokimova O. V., Chindareva M. A., Valentovich L. N. Characteristic of plasmids of *Bacillus pumilus* isolated in Belarus // Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series. – 2019. – V. 64, № 3. – P. 292–301.
49. Fan B., Blom J., Klenk H.-P., Borriss R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis* and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex // Frontiers in Microbiology. – 2017. – V. 8. – P. 1–15.
50. Fan B., Wang C., Song X., Ding X., Wu L., Wu H. et al. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for

- Plant Growth Promotion and Biocontrol // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 162, № 9. – P. 1–7.
51. Fox A., Stewart G. C., Waller L. N., Fox K. F., Harley W. M., Price R. L. Carbohydrates and glycoproteins of *Bacillus anthracis* and related bacilli: targets for biodetection // *Journal of Microbiological Methods*. – 2003. – V. 54, № 2. – P. 143–152.
 52. Gärtner A. Isolation and characterization of bacteria from the deep sea and their potential to produce bioactive natural products: dis. ... des Doktor grades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen. – Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2011. – 151 p.
 53. Gholizadeh S. S., Baserisalehi M., Bahador N. Study on Bioactive Compounds Produced by Soil Origin *Brevibacillus* spp. // *Nature Environment and Pollution Technology*. – 2013. – V. 12, № 2. – P. 209–214.
 54. Grady E. N., MacDonald J., Ho M. T., Weselowski B., McDowell T., Solomon O. et al. Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6 // *BMC microbiology*. – 2019. – V. 19, № 1. – P. 1–14.
 55. Guerrant G. O., Moss C. W. Determination of monosaccharides as aldononitrile, O-methyloxime, alditol, and cyclitol acetate derivatives by gas-chromatography // *Analytical Chemistry*. – 1984. – V. 56, № 4. – P. 633–638.
 56. Halim M. A., Rahman A. Y., Sim K. S., Yam H. C., Rahim A. A., Ghazali A. H., Najimudin N. Genome sequence of a Gram-positive diazotroph, *Paenibacillus durus* type strain ATCC 35681 // *Genome announcements*. – 2016. – V. 4, № 1. – P. 1–2. doi: 10.1128/genomeA.00005-16
 57. Heyrman J., Vos P. D. *Marinibacillus* // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. – 2015. – P. 1–5. doi: 10.1002/9781118960608.gbm00560
 58. Heyrman J., Vos P. D. *Oceanobacillus* // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. – 2015. – P. 1–9. doi: 10.1002/9781118960608.gbm00539
 59. Helfrich E. J. N., Ueoka R., Dolev A., Rust M., Meoded R. A., Bhushan A. et al. Automated structure prediction of trans-ac-

- yltransferase polyketide synthase products // *Nature Chemical Biology*. – 2019. – V. 15, № 8. – P. 813–821.
60. Honma M., Tanaka K., Konno K., Tsuge K., Okuno T., Hashimoto M. Termination of the structural confusion between plipastatin A1 and fengycin IX // *Bioorg Med Chem*. – 2012. – V. 20, № 12. – C. 3793–3798.
 61. Ivanytsia V. O., Shtenikov M. D., Ostapchuk A. M. Facultatively anaerobic sporeforming bacteria of deep-sea sediments of the Black sea // *Microbiology & Biotechnology*. – 2017. – V. 40, № 4. – P. 94–103. [in Ukrainian]. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.4\(40\).119560](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.4(40).119560)
 62. Jámboř A., Molnár-Perl I. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride // *Journal of Chromatography A*. – 2009. – V. 1216, № 34 – P. 6218–6223. doi: 10.1016/j.chroma.2009.06.083
 63. Joensen K. G., Scheutz F., Lund O., Hasman H., Kaas R. S., Nielsen E. M. et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli* // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – V. 52, № 5. – P. 1501–1510.
 64. Kalkatawi M., Alam I., Bajic V. B. BEACON: automated tool for Bacterial Genome Annotation Comparison // *BMC Genomics*. – 2015. – V. 16, № 1. – P. 1–8.
 65. Karikalan S., Mohankumar A. Production, isolation and partially purification of alkaline protease from marine macro algae surface associated *Bacillus* spp. // *Int J Biol Res*. – 2016. – V. 1, № 1. – P. 63–66.
 66. Kaspar F., Neubauer P., Gimpel M. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review // *J Nat Prod*. – 2019. – V. 82, № 7. – P. 2038–2053.
 67. Kautsar S. A., Blin K., Shaw S., Navarro-Muñoz J. C., Terlouw B. R., van der Hooft J. J. J. MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function // *Nucleic Acids Res*. – 2020. – V. 48, № 1. – P. 454–458.

68. Kawai M., Uchiyama I., Takami H., Inagaki F. Low frequency of endospore-specific genes in subseafloor sedimentary metagenomes // *Environmental Microbiology Reports*. – 2015. – V. 7, № 2. – P. 341–350.
69. Kemperman R., Kuipers A., Karsens H., Nauta A., Kuipers O., Kok J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574 // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. – V. 69, № 3. – P. 1589–1597.
70. Ki J. S., Zhang W., Qian P. Y. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification // *Journal of Microbiological Methods*. – 2009. – V. 77, № 1 – C. 48–57.
71. Knittel K., Boetius A. Anaerobic methane oxidizers // *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* / Ed. K. N. Timmis – Springer, 2010. – P. 2023–2032.
72. Kriss A. E. Microbiology and the chief problems in the Black Sea // *Deep Sea Research* (1953). – 1958. – V. 5, № 2–4. – P. 193–200.
73. Lachnit T., Fischer M., Künzel S., Baines J. F., Harder T. Compounds associated with algal surfaces mediate epiphytic colonization of the marine macroalga *Fucus vesiculosus* // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2013. – V. 84, № 2. – P. 411–420.
74. Lee I., Kim Y. O., Park S. C., Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2016. – V. 66, № 2. – P. 1100–1103. doi: 10.1099/ijsem.0.000760
75. Li S. W., Liu M. Y., Yang R. Q. Comparative genome characterization of a petroleum-degrading *Bacillus subtilis* strain DM2 // *International Journal of Genomics*. – 2019. – V. 2019. – P. 1–17. <https://doi.org/10.1155/2019/7410823>
76. Lima A. O., Cabral A., Andreote F. D., Cavalett A., Pessatti M. L., Dini-Andreote F., da Silva M. A. Draft Genome Sequence of *Bacillus stratosphericus* LAMA 585, Isolated from the Atlantic Deep Sea // *Genome Announcements*. – 2013. – V. 1, № 3. – P. 1–2.

77. Lin C., Tsai C. H., Chen P. Y., Wu C. Y., Chang Y. L., Yang Y. L. et al. Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 // PLoS One. – 2018. – V. 13, № 4. – P. 1–17.
78. Liu J.-Y., Pan N.-S., Chen Z.-L. Characterization of an anti-rice bacterial blight polypeptide LCI // Rice Genetics Newsletter. – 1990. – V. 7. – P. 151–154.
79. Liu X., Xu F., Shao C., She Z., Lin Y., Chan W. L. Bioactive metabolites from marine microorganisms // Studies in Natural Products Chemistry. – 2008. – V. 35. – P. 197–310.
80. Logan N. A., De Vos P. *Bacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. W. B. Whitman. – John Wiley & Sons, Inc, 2015. – P. 1–164. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
81. Logan N. A., De Vos P. Endospore-forming Soil Bacteria. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. – 364 p.
82. Lomstein B. A., Langerhuus A. T., D'Hondt S., Jørgensen B. B., Spivack A. J. Endospore abundance, microbial growth and necromass turnover in deep sub-seafloor sediment // Nature. – 2012. – V. 484, № 7392. – P. 101–104.
83. Ma Z., Hu J. Complete genome sequence of a marine-sediment-derived bacterial strain *Bacillus velezensis* SH-B74, a cyclic lipopeptides producer and a biopesticide // Biotech. – 2019. – V. 162, № 9. – P. 1–7.
84. Mahmoudi N., Robeson M. S., II, H. F. C., Fortney J. L., Techtman S. M., Joyner D. C et al. Microbial community composition and diversity in Caspian Sea sediments // FEMS Microbiology Ecology. – 2014. – V. 91, № 1. – P. 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiu013>
85. Mandic-Mulec I., Stefanic P., van Elsas J. D. Ecology of Bacillaceae // Microbiology Spectrum. – 2015. – V. 3, № 1. – P. 1–24.
86. Meier-Kolthoff J. P., Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy // Nat Commun. – 2019. – V. 10, № 1. – P. 1–10.
87. Miranda C. A. C., Martins O. B., Clementino M. M. Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequenc-

- ing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis // Antonie van Leeuwenhoek. – 2008. – V. 93. – P. 297–304.
88. Moreno-Letelier A. Divergence and Phylogeny of Firmicutes from the Cuatro Ciénegas Basin, Mexico: A Window to an Ancient Ocean // Astrobiology. – 2012. – V. 12, № 7. – P. 674–684.
 89. Moura A., Savageau M. A., Alves R. Relative Amino Acid Composition Signatures of Organisms and Environments // PLoS One. – 2013. – V. 8, № 10. – P. 1–9.
 90. Murray J. W., İzdar E. The 1988 Black Sea oceanographic expedition: overview and new discoveries // Oceanography. – 1989. – V. 2, № 1. – P. 15–21.
 91. Nagamori Y., Kusaka K., Nishimura T., Okada S. Isolation and Characterization of a Bacterial Dipeptidyl Carboxypeptidase Inhibitor from *Bacillus subtilis* 3-16-20 // Journal of Fermentation and Bioengineering. – 1992. – V. 73, № 4. – P. 277–279.
 92. Navarro-Muñoz J. C., Selem-Mojica N., Mullaney M. W., Kautsar S. A., Tryon J. H., Parkinson E. I. et al. A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity // Nat Chem Biol. – 2020. – V. 16, № 1. – P. 60–68.
 93. Nicholson W. L. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments // Microbiology And Molecular Biology Reviews – 2000. – V. 64, №3. – P. 548–572.
 94. Nishikiori T., Naganawa H., Muraoka Y., Aoyagi T., Umezawa H. Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-ff67. III. Structural elucidation of plipastatins // J Antibiot. – 1986. – V. 39, № 6. – P. 755–761.
 95. Ostapchuk A. M., Shtenikov M. D., Ivanytsia V. O. Exometabolites of endospore-forming bacteria of *Bacillus* genus identified by genomic-metabolomic profiling // Ukr Biochem J. – 2020. – V. 92, № 6. – C. 154–164.
 96. Overbeek R., Olson R., Pusch G. D., Olsen G. J., Davis J. J., Disz T. et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST) // Nucleic acids research. – 2014. – V. 42, № 1. – P. 206–214.

97. Patel H., Tscheka C., Edwards K., Karlsson G., Heerklotz H. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713 // *Biochim Biophys Acta*. – 2011. – V. 1808, № 8. – P. 2000–2008.
98. Paulus C., Rebets Y., Tokovenko B., Nadmid S., Terekhova L. P., Myronovskiy M. et al. New natural products identified by combined genomics-metabolomics profiling of marine *Streptomyces* sp. MP131-18 // *Sci Rep*. – 2017. – V. 7. – P. 1–11.
99. Phelan R. W., Clarke C., Morrissey J. P., Dobson A. D., O'Gara F., Barbosa T. M. Tetracycline resistance-encoding plasmid from *Bacillus* sp. strain 24, isolated from the marine sponge *Haliclona simulans* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – V. 77, № 1. – P. 327–329. doi: 10.1128/AEM.01239-10
100. Potekhina N. V., Streshinskaya G. M., Tul'skaya E. M., Kozlova Y. I., Senchenkova S. N., Shashkov A. S. Phosphate Containing Cell Wall Polymers of Bacilli // *Biochemistry*. – 2011. – V. 76, № 7. – P. 745–754.
101. Rafidinarivo H. F., Fujimoto S., Watanabe K., Kitazato K., Kobayashi N. Topographic effects of coastal seas on the composition of the culturable bacterial communities in marine sediments // *Hydrobiologia*. – 2007. – V. 583. – P. 205–212.
102. Raina V., Nayak T., Ray L., Kumari K., Suar M. A. Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. Chapter 9 // *Microbial Diversity in the Genomic Era*. – Academic Press, 2019. – P. 137–152.
103. Rainey F., Oren A. *Methods in Microbiology*. Volume 38 // *Taxonomy of Prokaryotes*. – Elsevier Ltd, 2011. – 474 p.
104. Rosenberg E. *The Prokaryotes* / Ed. E. Rosenberg // *Firmicutes and Tenericutes*. – 4 ed. – Springer, 2014. – 573 p.
105. Rylkova O. A., Gulina S. B., Pimenov N. V. Determination of the Total Microbial Abundance in Black Sea Bottom Sediments Using Flow Cytometry // *Microbiology*. – 2019. – V. 88, № 6. – P. 700–708.
106. Saggese A., Culurciello R., Casillo A., Corsaro M. M., Ricca E., Baccigalupi L. A. Marine Isolate of *Bacillus pumilus* Secretes a Pumilacidin Active against *Staphylococcus aureus* // *Mar Drugs*. – 2018. – V. 16, № 6. – P. 1–13.

107. Sass A. M., McKew B. A., Sass H., Fichtel J., Timmis K. N., McGenity T. J. Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments // *Saline Systems*. – 2008. – V. 4, № 8. – P. 1–11. doi: 10.1186/1746-1448-4-8
108. Sasser M. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids, Technical Note 101. Newark, DE:MIDI. – 1990.
109. Schäffer C., Messner P. The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together // *Microbiology*. – 2005. – V. 245. – P. 643–651.
110. Schinke C., Martins T., Queiroz S. C. N., Melo I. S., Reyes F. G. R. Antibacterial Compounds from Marine Bacteria, 2010-2015 // *J Nat Prod*. – 2017. – Vol. 80. – № 4. – P. 1215–1228.
111. Schottroff F., Pyatkovskyy T., Reineke K., Setlow P., Sasstry S. K., Jaeger H. Mechanisms of enhanced bacterial endospore inactivation during sterilization by ohmic heating // *Bioelectrochemistry*. – 2019. – V. 130. – P. 107338. doi: 10.1016/j.bioelechem.2019.107338
112. Shimojima Y., Hayashi H., Ooka T., Shibukawa M., Iitaka Y. Studies on AI-77s, microbial products with gastroprotective activity. Structures and the chemical nature of AI-77s // *Tetrahedron*. – 1984. – V. 40, № 13. – P. 2519–2527.
113. Shtenikov M. D., Ostapchuk A. M., Ivanytsia V. O. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black Sea sediments // *Microbiology & Biotechnology*. – 2018. – V. 43, № 3. – P. 82–89.
114. Shtenikov M. D., Ostapchuk A. M., Vasylieva N. Y., Luzhetskyy A. M., Rueckert C., Kalinowski J., Ivanytsia V. O. Characteristics of Genome of *Bacillus velezensis* ONU 553 Strain Isolated from the Bottom Sediments of the Black Sea // *Mikrobiol. Z.* – 2020. – V. 82, № 3. – P. 14–21.
115. Silva F. J., Ferreira L. C., Campos V. P., Cruz-Magalhães V., Barros A. F., Andrade J. P. et al. Complete Genome Sequence of the Biocontrol Agent *Bacillus velezensis* UFLA258 and Its Comparison with Related Species: Diversity within the Commons // *Genome Biol Evol*. – 2019. – V. 11, № 10. – P. 2818–2823.

116. Skinnider M. A., Merwin N. J., Johnston C. W., Magarvey N. A. PRISM 3: expanded prediction of natural product chemical structures from microbial genomes // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45, № 1. – P. 49–54.
117. Smith A. B., Ott G. R. Total syntheses of (–)-macrolactin A, (+)-macrolactin E, and (–)-macrolactinic acid: an exercise in Stille cross-coupling chemistry // *Journal of the American Chemical Society.* – 1998. – V. 120, № 16. – P. 3935–3948.
118. Smith L. D. S., Cato E. *Clostridium durum* sp. nov., the predominant organism in a sediment core from the Black Sea // *Canadian Journal of Microbiology.* – 1974. – V. 20, № 10. – P. 1393–1397.
119. de Sousa A. L., Maués D., Lobato A., Franco E. F., Pinheiro K., Araújo F. et al. PhageWeb–Web interface for rapid identification and characterization of prophages in bacterial genomes // *Frontiers in genetics.* – 2018. – V. 9. – P. 1–7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00644>
120. Starikova E. V., Tikhonova P. O., Prianichnikov N. A., Rands C. M., Zdobnov E. M., Ilina E. N., Govorun V. M. Phigaro: high-throughput prophage sequence annotation // *Bioinformatics.* – 2020. – V. 36, № 12. – P. 3882–3884.
121. Sullivan M. J., Petty N. K., Beatson S. A. Easyfig: a genome comparison visualizer // *Bioinformatics.* – 2011. – V. 27, № 7. – P. 1009–1010.
122. Suominen S., Dombrowski N., Sinninghe Damsté J. S., Villanueva L. A diverse uncultivated microbial community is responsible for organic matter degradation in the Black Sea sulphidic zone // *Environmental Microbiology.* – 2021. – V. 23, № 6. – P. 2709–2728. doi:10.1111/1462-2920.1490
123. Süß J., Engelen B., Cypionka H., Sass H. Quantitative analysis of bacterial communities from Mediterranean sapropels based on cultivation-dependent methods // *FEMS Microbiology Ecology.* – 2004. – V. 51. – P. 109–121.
124. Tao L., Peng W. Bacterial diversity in sediments of core MD05-2902 from the Xisha Trough, the South China Sea // *Acta Oceanologica Sinica.* – 2014. – V. 33, № 10. – P. 85–93.

125. Tareq F. S., Lee M. A., Lee H. S., Lee Y. J., Lee J. S., Hasan C. M. Gageotetrins A–C, Noncytotoxic Antimicrobial Linear Lipopeptides from a Marine Bacterium *Bacillus subtilis* // *Organic Letters*. – 2014. – V. 16, № 3. – P. 928–931.
126. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E. P., Zaslavsky L. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44, № 14. – P. 6614–6624.
127. Tiam K. S., Gugger M., Demay J., Le Manach S., Duval C., Bernard C., Marie B. Insights into the Diversity of Secondary Metabolites of *Planktothrix* Using a Biphasic Approach Combining Global Genomics and Metabolomics // *Toxins*. – 2019. – V. 11, № 9. – P. 1–18.
128. Tyurin A. P., Efimenko T. A., Prokhorenko I. A., Rogozhin E. A., Malanicheva I. A., Zenkova V. A. Amicoumacins and Related Compounds: Chemistry and Biology // *Studies in Natural Products Chemistry*. V. 55. – Elsevier, 2018. – P. 385–441.
129. Van Heel A. J., de Jong A., Song C., Viel J. H., Kok J., Kuipers O. P. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46, № 1. – P. 278–281.
130. Van Heel A. J., Montalban-Lopez M., Oliveau Q., Kuipers O. P. Genome-guided identification of novel head-to-tail cyclized antimicrobial peptides, exemplified by the discovery of pumilarin // *Microbial genomics*. – 2017. – V. 3, – № 10. – P. 1–9. doi: 10.1099/mgen.0.000134
131. Ventosa A. *Marinococcus* // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. – 2015. – P. 1–6. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00538>
132. Virtanen P., Gommers R., Oliphant T. E., Haberland M., Reddy T., Cournapeau D. et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python // *Nature methods*. – 2020. – V. 17. – P. 261–272.
133. Wattam A. R., Brettin T., Davis J. J., Gerdes S., Kenyon R., Machi D. et al. Assembly, Annotation, and Comparative Genomics in PATRIC, the All Bacterial Bioinformatics Resource Center //

- Comparative Genomics. Methods Mol Biol. – New York: Humana Press; 2018. – P. 79–101.
134. Wenzel S. C., Meiser P., Binz T. M., Mahmud T., Müller R. Nonribosomal peptide biosynthesis: point mutations and module skipping lead to chemical diversity. –Angew Chem Int Ed Engl. – 2006. – V. 45, № 14. – P. 2296–2301.
 135. Wilson C. A., Brigmon R. L., Yeager C., Smith G. W., Polson S. W. Genotypic and Phenotypic Characterization of Aerosolized Bacteria Collected From African Dust Events // Journal of the South Carolina Academy of Science. – 2014. – V. 12, № 1. – P. 8–13.
 136. Wörmer L., Hoshino T., Bowles M. W., Viehweger B., Adhikari R. R., Xiao N. et al. Microbial dormancy in the marine subsurface: Global endospore abundance and response to burial // Science Advances. – 2019. – V. 5. – P. 1–8.
 137. Wunderlin T., Junier T., Roussel-Delif L., Jeanneret N., Junier P. Endospore-enriched sequencing approach reveals unprecedented diversity of Firmicutes in sediments // Environmental Microbiology Reports. – 2014. – V. 6, № 6. – P. 631–639.
 138. Wunschel D., Fox K. F., Black G. E., Fox A. Discrimination among the *Bacillus cereus* group, in comparison to *B. subtilis*, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNA spacer region PCR // Syst. Appl. Microbiol. – 1995. – V. 17, № 4. – P. 625–635.
 139. Yoon S. H., Ha S. M., Lim J. M., Kwon S. J., Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity // Antonie van Leeuwenhoek. – 2017. – V. 110, № 10. – P. 1281–1286.
 140. Yuan Y., Gao M. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy // Scientific reports. – 2015. – V. 5, № 1. – P. 1–9.
 141. Zaitsev Y. P., Alexandrov B. G. Black Sea Biological Diversity. – New York, 1998. – 362 p.
 142. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O. et al. Identification of acquired antimicrobial

- resistance genes // J Antimicrob Chemother. – 2012. – V. 67, № 11. – P. 2640–2644.
143. Zhang D. J., Liu R. F., Li Y. G., Tao L. M., Tian L. Two new antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus marinus* B-9987 // Chem Pharm Bull. – 2010. – V. 58, № 12. – P. 1630–1634.
144. Zhao P., Xue Y., Gao W., Li J., Zu X., Fu D. et al. Bacillaceae-derived peptide antibiotics since 2000 // Peptides – 2018. – V. 101. – P. 10–16. doi: 10.1016/j.peptides.2017.12.018
145. Zhao X., Kuipers O. P. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species // BMC Genomics. – 2016. – V. 17, № 1. – P. 1–18.

Наукове видання

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЧОРНОГО МОРЯ

Монографія

Іваниця В.О., Гудзенко Т. В., Страшнова І.В.,
Васильєва Н.Ю., Штеніков М.Д., Коротаєва Н.В.,
Лісютін Г.В., Горшкова О. Г., Волювач О.В.,
Потапенко К.С., Боброва О.Є., Іваниця Т.В.,
Філіпова Т.О., Чабан М.М.

Верстка – С. Остапенко
Обкладинка – М. Чабан

Підп. до друку 28.11.2021. Формат 60х84/16
Ум.-друк. Арк.. 16,39. Тираж 100 пр.
Зам. № 2405.

Видавець та виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідectво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2021.
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: +38(048) 723 28 39
druk@onu.edu.ua