

К. М. Кранга, мол. наук. співробітник

Н. Ю. Васильєва, к.б.н., ст. наук. співробітник

І. В. Страшнова, к. тех.н., ст. наук. співробітник

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра

мікробіології, вірусології та біотехнології,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, email: tatkamic@onu.edu.ua

РОЗПОДІЛ І МІНЛИВІСТЬ ЧИСЕЛЬНОСТІ ГЕТЕРОТРОФНИХ, КОЛІМОРФНИХ І МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ У ВОДІ І ГІДРОБІОНТАХ ЧОРНОГО МОРЯ

Вперше показано присутність молочнокислих бактерій у воді Чорного моря і серед асоційованої мікробіоти гідробіонтів. Показано, що максимум чисельності цієї групи у воді Чорного моря ($1,5 \pm 0,33 \times 10^4$ КУО/мл) реєстрували в липні, а максимум чисельності серед асоційованої мікробіоти ($1,66 \pm 0,61 \times 10^4$ КУО/мл) реєстрували в жовтні. Розподіл чисельності коліморфних бактерій і бактерій, що вирости на середовищі вісмут-сульфідний агар, при дослідженні морської води був зворотним, а при дослідженні асоційованої мікробіоти збігався. Максимум показника загального мікробного забруднення у воді реєстрували в жовтні ($1,1 \pm 0,7 \times 10^6$ КУО/мл), а серед асоційованої мікробіоти гідробіонтів у липні. Виявлено кореляційні взаємозв'язки між показником чисельності бактерій, що характеризують загальне мікробне забруднення, коліморфними бактеріями і молочнокислими мікроорганізмами. Показані сезонні зміни чисельності досліджених груп мікроорганізмів.

Ключові слова: показник чисельності; Чорне море; гідробіонти; молочнокислі бактерії.

Мікробіологічна якість морської води є проблемою охорони громадського здоров'я, яка має серйозні наслідки для розвитку туристичної галузі України. До класичних методів оцінки якості водних об'єктів належить визначення специфічних мікробних індикаторів, яких використовують як проксі (тобто величин, які легко вимірювати, що характеризують стан здоров'я екосистеми і ризики для населення) [3]. При подібному підході найчастіше дослідження були спрямовані на виявлення присутності бактерій групи кишкової палички (БГКП), яка об'єднує бактерії сімейства *Enterobacteriaceae*, роди *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* і *Klebsiella* [6, 10]. Серед мікробних індикаторів, що використовуються найбільш широко – *Escherichia coli* і *Enterococcus spp.* [10].

Однак останні дослідження показали, що такий підбір проксі за санітарно-мікробіологічними показниками є недосконалим, оскільки присутність зазначених мікроорганізмів не обов'язково викликає ситуацію що загрожує здоров'ю людини [7, 9]. Модифікацією наявного підходу може бути розширення

набору проксі-індикаторів. Так, наприклад, на даний час вивчається зв'язок між індексацією *Bacteroides* і шлунково-кишковими захворюваннями [14].

Серед можливих нових індексних мікроорганізмів слід розглядати і молочнокислі бактерії (LAB), які з одного боку вважаються сприятливими бактеріями для здоров'я навколишнього середовища через їх здатність протидіяти умовно-патогенним мікроорганізмам, але при цьому ідентифікуються як компоненти кишкової мікробіоти [11, 15], що може бути додатком індикатором антропогенного навантаження.

Основною характеристикою LAB є виробництво різних антимікробних речовин, серед яких спирти, перекис водню, молочна, оцтова, мурашина та інші органічні кислоти, лізоцим і бактеріоцини широкого спектра дії, здатні запобігати поширенню хвороботворних і гнильних бактерій в харчових продуктах [2, 5], а також патогенних мікроорганізмів в шлунково-кишковому тракті [12].

Робіт, присвячених дослідженню чисельності і виділенню молочнокислих бактерій зі звичних джерел (ферментовані овочі, кисломолочні бактерії, м'ясні продукти) досить багато, проте публікацій, присвячених вивченню молочнокислих бактерій морського походження недостатньо [8, 13, 15, 17].

Метою даного дослідження було порівняння показників чисельності загального мікробного числа, молочнокислих і умовно-патогенних бактерій у морській воді і гідробіонтах Чорного моря в залежності від сезону.

Матеріали і методи дослідження

Бактерії були ізолювані з морських губок *Haliclona* sp. (order Haplosclerida, Demospongiae) і мідій *Mytilus galloprovincialis*, зібраних за допомогою легководолазного обладнання на глибині 5–6 м в Одеській затоці Чорного моря (Малий Фонтан) на віддаленні від берега 300–400 м у 2018 р. доцентом кафедри гідробіології і загальної екології к.б.н. Ковтуном О. О. Зразки гідробіонтів транспортували в лабораторію в контейнерах об'ємом 10 л з морською водою впродовж приблизно 3 годин. У лабораторії усі отримані зразки тричі промивали морською водою, яку попередньо автоклаували, для відділення сміття і неасоційованих мікроорганізмів. Потім поверхню губок і мідій стерилізували швидким промиванням 70 % етанолом і негайно занурювали в стерильну морську воду.

Для виділення асоційованих мікроорганізмів з губок, зразки кожної губки витягували з води, поміщали в стерильну чашку Петрі і стерильними ножицями поділяли на рівні фрагменти. Один з фрагментів зважували і припускали, що інші приблизно рівні зваженому. Надалі, отримані фрагменти губки (приблизно 1 г) гомогенізували в 5 мл стерильного сольового розчину (3 % NaCl в дистильованій воді). Гомогенат серійно розводили в 10 разів, починаючи з 100 мкл гомогенату в 900 мкл стерильної води до отримання остаточного розведення 10^{-4} від початкової концентрації.

При виділенні асоційованих мікроорганізмів з мідій розділяли зовнішню і

внутрішню поверхню. Із зовнішньої поверхні проводили змив, а для висіву з внутрішньої поверхні мідії розкривали і витягували вміст, який гомогенізували аналогічним засобом. Гомогенат серійно розводили в 10 разів, починаючи з 100 мкл гомогенату в 900 мкл стерильної води до отримання остаточного розведення 10^{-4} від початкової концентрації.

З проб морської води готували серійні розведення до отримання остаточного розведення 10^{-4} від початкової концентрації. Висів проводили на поверхню поживних середовищ MRS, Endo Agar, Bismuth Sulphite Agar і МПА. Усі дослідження проводили у трьох повторностях. Чашки культивували в термостаті за температури $28,0 \pm 0,2$ °C і $3,70 \pm 0,2$ °C впродовж 12 і 24 годин.

Статистичне опрацювання даних проводили за допомогою програм Calc та R 3.4.0.

Результати дослідження та їх обговорення

Мікробіологічний контроль морської води та гідробіонтів передбачає визначення загального мікробного обсіменіння (загальне мікробне число – ЗМЧ), а також виявлення та кількісний облік санітарно-показових мікроорганізмів. Точний облік мікроорганізмів, що мешкають у водному середовищі або є асоційованою мікробіотою гідробіонтів, провести неможливо, оскільки не можна створити умови для розмноження і росту усіх наявних мікроорганізмів з використанням класичних методів мікробіології. Тому визначали співвідношення основних груп мікроорганізмів, які відносять до БГКП та показник загальної чисельності мікроорганізмів. Додатково визначали чисельність молочнокислих бактерій, які мешкають у товщі води та є асоційованими з гідробіонтами, щоб визначити різноманіття мікробів у досліджених об'єктах та їх взаємодію.

Зацікавленість у дослідженні асоційованою мікробіоти з мідіями та губками, пояснюється тим, що ті організми є фільтраторами різного рівня організації і їх можна розглядати як сукупний «архів мікроорганізмів», які були присутні в навколишньому середовищі.

Терміни дослідження були пов'язані з періодом максимального антропогенного навантаження (червень), різким зниженням температури (вересень) та максимумом доступної відмерлої органічної речовини (жовтень).

На середовищі МПА, яке використовували для дослідження загальної чисельності мікроорганізмів, морфологічні ознаки колоній, що вирости, були ідентичні – напівпрозорі або білі колонії з плоскою поверхнею і рівним краєм. Основні ознаки колоній не змінювалися в залежності від сезону.

У червні 2018 роки кількість мікроорганізмів, яка вирости на повноцінному живильному середовищі МПА, коливалася від $(9,4 \pm 0,39) \times 10^3$ КУО/мл. Мінімальний показник був зафіксований для товщі морської води, а максимальні показники – при дослідженні мікроорганізмів, асоційованих з губками. Чисельність гетеротрофних бактерій, що мешкають на поверхні і всередині мідій знаходилася в одних межах – $(3,0 \pm 0,13) \times 10^5$ КУО/мл і $(1,18 \pm 0,28) \times 10^5$ КУО/мл

(рис. 1). Морфологічні ознаки колоній, що вирости, були ідентичні – напівпрозорі або білі колонії з плоскою поверхнею і рівним краєм. Основні ознаки колоній не змінювалися в залежності від сезону.

У вересні чисельність мікроорганізмів, що вирости на середовищі МПА, була мінімальною для усіх досліджених зразків. Так, для морської води показник склав $(3,03 \pm 0,73) \times 10^0$ КУО/мл. На зовнішній стороні мідій показник, що досліджували, склав $(5,67 \pm 0,28) \times 10^0$ КУО/мл, а на внутрішній – $(6,42 \pm 0,37) \times 10^0$ КУО/мл (рис. 1). Усередині губок показник чисельності мікроорганізмів, що вирости на середовищі МПА, був дещо вищим – $7,33 \pm 0,51 \times 10^0$ КУО/мл (рис. 1).

При висіві морської води, відібраної в жовтні, загальне мікробне число досягало $(1,1 \pm 0,7) \times 10^6$ КУО/мл. Показники загального мікробного числа на поверхні і всередині мідій склали $(1,74 \pm 0,51) \times 10^3$ КУО/мл і $6,67 \pm 0,51 \times 10^4$ КУО/мл, відповідно (рис. 1). В губках роду *Haliclona* sp, реєстрували зниження досліджуваного мікробного показника – $(5,02 \pm 0,11) \times 10^1$ КУО/мл.

У порівнянні з оцінкою загального рівня мікробного забруднення більш достовірні відомості про небезпечне для здоров'я людини забруднення навколишнього середовища дає кількісний облік індикаторних мікроорганізмів. При визначенні санітарно-показових мікроорганізмів прийнято оперувати не таксономічними категоріями, а груповими поняттями (бактерії групи кишкової палички (БГКП) або загальні коліформні бактерії (ОКБ)). Такий підхід диктується вимогами санітарної практики, яка потребує простих і швидких методів дослідження [4].

На поверхні середовища Ендо (Endo Agar) при дослідженні проб, відібраних в липні 2018 року, реєстрували слизові колонії рожевого, червоного або темно-червоного кольору з металевим блиском або без нього. Мінімальна чисельність мікроорганізмів, що вирости на середовищі Ендо (коліморфні бактерії), була зареєстрована при висіві проб морської води $(3,33 \pm 0,65) \times 10^0$ КОЕ/мл і з внутрішньої поверхні мідій $(2,65 \pm 0,26) \times 10^0$ КОЕ/мл (рис. 2). На зовнішній поверхні мідій чисельність коліморфних бактерій, що вирости на середовищі Ендо, досягала $(2,28 \pm 0,17) \times 10^4$ КУО/мл, а в губках – $(2,04 \pm 0,13) \times 10^4$ КОЕ/мл (рис. 2).

У вересні показники чисельності коліморфних бактерій практично не змінилися (рис. 2), а в жовтні ми реєстрували збільшення показника, що перевіряли. Максимальне значення бактерій, які вирости на середовищі Ендо $((7,86 \pm 0,68) \times 10^{11})$ КОЕ/мл ми отримали за висіву змиву з зовнішньої поверхні мідій (рис. 2). На внутрішній поверхні мідій показник чисельності коліморфних бактерій був трохи нижчим – $(1,4 \pm 0,19) \times 10^8$ КОЕ/мл. При дослідженні губок в жовтні зростання коліморфних бактерій не реєстрували (рис. 2).

На поверхні середовища вісмут-сульфідний агар (Bismuth Sulphite Agar) в основному виростили чорні колонії з антрацитовим блиском або темно-сірі колонії без блиску. Мінімальна чисельність мікроорганізмів, що вирости на

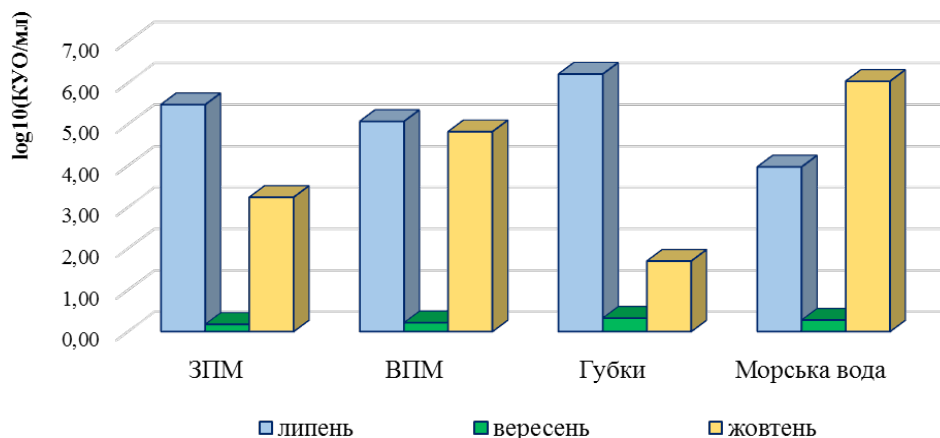


Рис. 1. Показник чисельності мікроорганізмів ($\log_{10}(\text{КУО/мл})$), що вирости на середовищі МПА
Примітка: ЗПМ – зовнішня поверхня мідій; ВПМ – внутрішня поверхня мідій

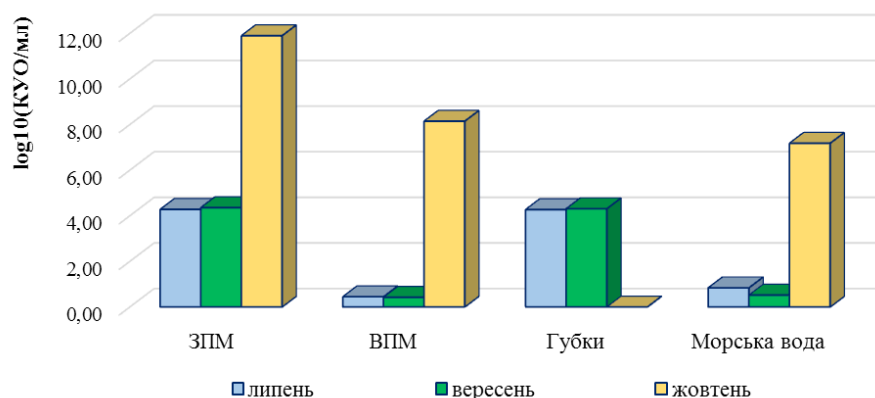


Рис. 2. Показник чисельності мікроорганізмів ($\log_{10}(\text{КУО/мл})$), що вирости на середовищі Endo Agar

Примітка: ЗПМ – зовнішня поверхня мідій; ВПМ – внутрішня поверхня мідій

цьому середовищі, в липні була зареєстрована при дослідженні води – $(1,87 \pm 0,13) \times 10^1$ КУО/мл. Із зовнішньої і внутрішньої сторін мідій було висіяно $(4,11 \pm 0,13) \times 10^1$ КУО/мл і $(2,21 \pm 0,42) \times 10^1$ КУО/мл мікроорганізмів, які попередньо можна віднести до сальмонел за здатністю росту на селективному середовищі «Bismuth Sulphite Agar».

У вересні показник чисельності цих мікроорганізмів значно збільшився при дослідженні губок $((2,21 \pm 0,51) \times 10^4$ КУО/мл) і зовнішньої поверхні мідій $((1,67 \pm 0,45) \times 10^4$ КУО/мл), а при дослідженні води, навпаки знизився – $(1,66 \pm 0,68) \times 10^0$ КУО/мл (рис. 3).

Дослідження, проведені в жовтні, показали, що максимальна концентрація мікроорганізмів, яку можна попередньо віднести до сальмонел за здатністю росту на селективному середовищі «Bismuth Sulphite Agar», була характерна для мідій: зовнішня поверхня $(1,53 \pm 0,68) \times 10^4$ КУО/мл, внутрішня поверхня $(7,47 \pm 0,19) \times 10^3$ КУО/мл (рис. 3). Після висіву гомогенату з губок, росту мікроорганізмів на поверхні цього середовища не реєстрували, а в морській воді чисельність відповідала показнику $(1,67 \pm 0,15) \times 10^0$ КУО/мл.

Загальну чисельність молочнокислих бактерій, без розділення на палички і коки, реєстрували на середовищі MRS. В даному випадку, ми підраховували чисельність дрібних білих колоній, округлої форми з рівним краєм і блискучою поверхнею. Так, у липні 2018 року чисельність мікроорганізмів, що вирости на середовищі MRS, коливалася від $(4,02 \pm 0,21) \times 10^3$ КУО/мл (внутрішня поверхня мідій) до $(1,5 \pm 0,33) \times 10^4$ КУО/мл (морська вода). Серед асоційованої мікробіоти губок чисельність молочнокислих бактерій склала $(7,75 \pm 0,14) \times 10^3$ КУО/мл (рис. 4).

У вересні загальна чисельність молочнокислих бактерій також досить низька. Максимальні показники реєстрували за висіву морської води – $(3,91 \pm 0,13) \times 10^0$ КУО/мл і асоційованої мікробіоти губок $(3,68 \pm 0,21) \times 10^0$ КУО/мл (рис. 4). Трохи менші показники чисельності реєстрували при дослідженні зовнішньої та внутрішньої поверхні мідій – $(2,18 \pm 0,33) \times 10^0$ КУО/мл і $(2,43 \pm 0,21) \times 10^0$ КУО/мл (рис. 4).

У жовтні розподіл показника чисельності змінився. Максимум показника, що досліджували, реєстрували за висіву з зовнішньої поверхні мідій $((1,66 \pm 0,61) \times 10^4$ КУО/мл) та гомогенату внутрішньої поверхні $((1,33 \pm 0,19) \times 10^4$ КУО/мл). У морській воді чисельність молочнокислих бактерій склала $(1,42 \pm 0,61) \times 10^3$ КУО/мл, а після висіву гомогенату з губок, росту мікроорганізмів на поверхні цього середовища не реєстрували (рис. 4).

Лінійний кореляційний аналіз середніх значень чисельності досліджених груп мікроорганізмів показав наявність зв'язків з високим рівнем значущості. Позитивний кореляційний зв'язок ($r=0,84$ при $p=0,05$) відзначали між показниками загальної чисельності (показник чисельності мікроорганізмів, які вирости на середовищі МПА) і показником чисельності молочнокислих бактерій (рис. 5). Між середніми значеннями чисельності бактерій, що вирости на середовищі вісмут-сульфідний агар (Bismuth Sulphite Agar) та молочнокислими бактеріями показник кореляції відповідав негативному кореляційному зв'язку ($r=-0,9$ при $p=0,05$). Так само між показником загальної чисельності (МПА) і чисельністю мікроорганізмів, що вирости на вісмут-сульфідному агарі, визначали негативну кореляційну залежність ($r=-0,81$ при $p=0,05$) (рис. 5).

Взагалі показники чисельності досліджених груп мікроорганізмів характеризувалися сезонною неоднорідністю. Так, максимум показника загального мікробного числа серед асоційованої з гідробіотними мікробіоти реєстрували в липні. У воді Чорного моря свого максимуму показник чисельності цієї групи

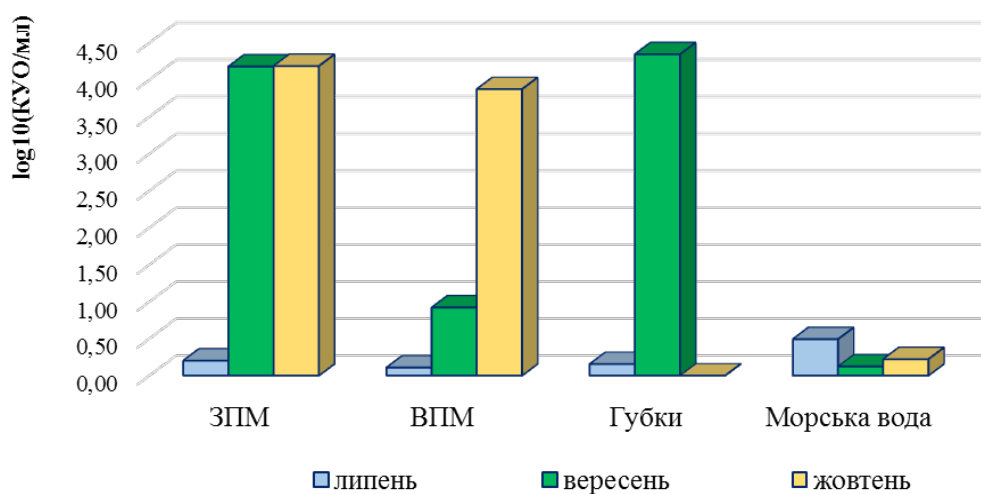


Рис. 3. Показник чисельності мікроорганізмів ($\log_{10}(KUO/ml)$), що вирости на середовищі Bismuth Sulphite Agar

Примітка: ЗПМ – зовнішня поверхня мідій; ВПМ – внутрішня поверхня мідій

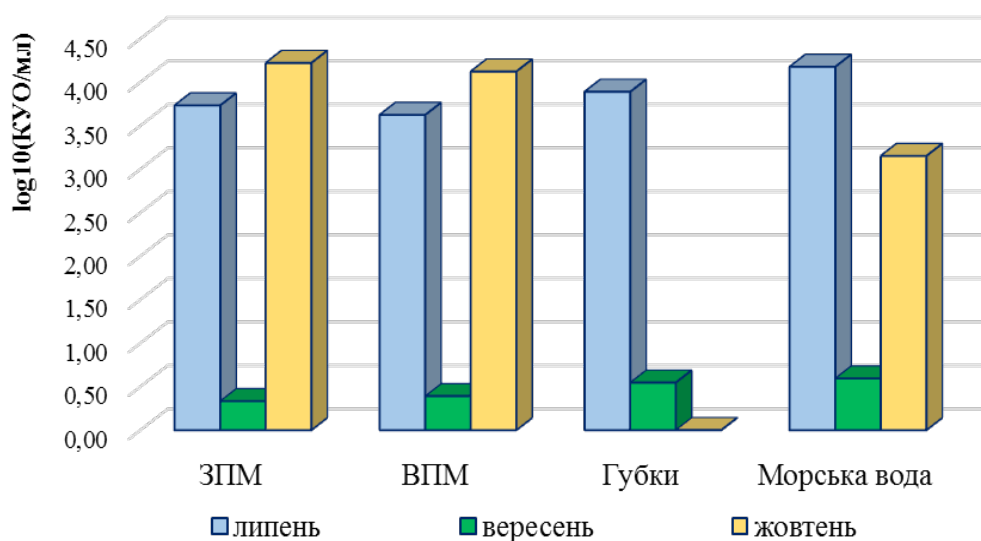


Рис. 4. Показник чисельності мікроорганізмів ($\log_{10}(KUO/ml)$), що вирости на середовищі MRS

Примітка: ЗПМ – зовнішня поверхня мідій; ВПМ – внутрішня поверхня мідій

мікроорганізмів досягав у жовтні, що ймовірно можна пояснити накопиченням відмерлої органічної речовини в після вегетаційний період. Крім того, дослідження проводили (на глибині 5–6 м), де чисельність бактерій значно більша ніж в епілімніоні.

Максимальні значення бактерій, що вирости на середовищі вісмут-сульфідний агар в морській воді в липні, швидше за все пов'язані з антропогенним фактором. Для показника чисельності коліморфних бактерій в морській воді, відзначений пік чисельності в жовтні, що збігається з дослідженнями інших дослідників [1]. Серед асоційованої з гідробіонтами мікробіоти, так само відзначені піки чисельності цих груп мікроорганізмів у жовтні, що можна пояснити тим, що вони є їх власною симбіотною кишковою мікрофлорою, так як знаходяться в зворотній залежності від коливань бактерій в середовищі існування моллюсків [1].

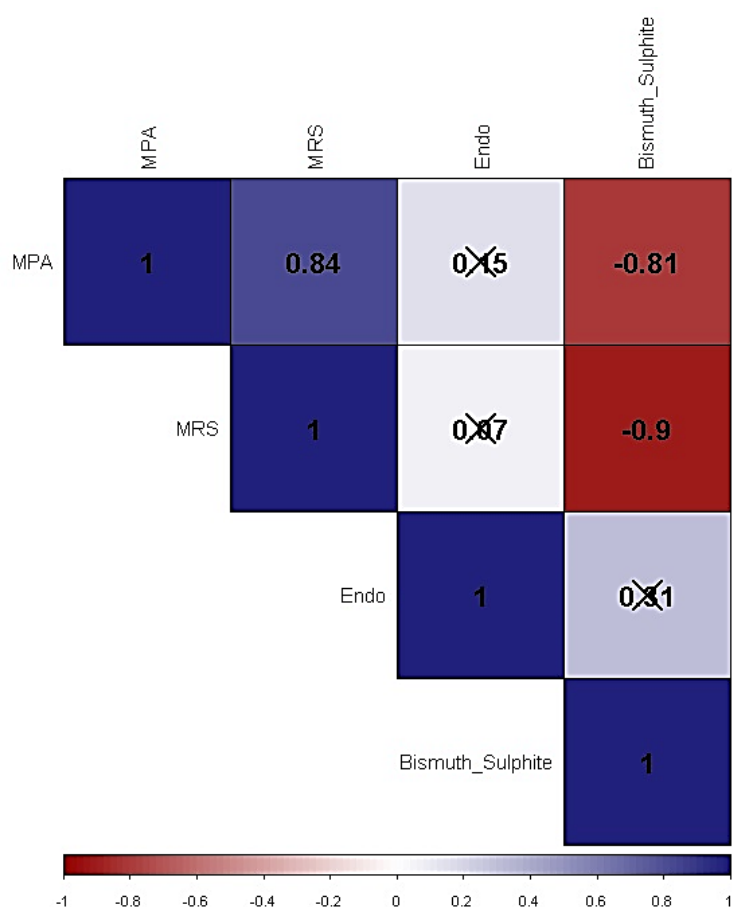


Рис. 5. Показники кореляційного аналізу між середніми значеннями чисельності досліджених груп мікроорганізмів ($p=0,05$)

Примітка: закреслені значення коефіцієнту кореляції не відповідають заданому рівню значущості

Максимум показника цих груп мікроорганізмів в Чорноморських губках *Haliclona* sp у вересні пов'язаний з тим, що до цього часу формується стійка мікробна асоціація між губками і мікроорганізмами, на яку не впливає різке зниження температури та зниження доступної органічної речовини в товщі води, а практично повна відсутність життєздатних бактерій в губках у жовтні пов'язане з їх коротким періодом життя, що перешкоджає подальшому розвитку асоційованої з ними мікробіоти.

Незважаючи на те, що морські LAB відіграють значну роль в перетворенні органічної речовини, виживання цієї групи сильно залежить від коливань температури і солоності [18]. Швидше за все сукупністю саме цих трьох чинників можна пояснити коливання чисельності молочнокислих бактерій за досліджений період.

Висновки

1. Пік чисельності показника загального мікробного числа в морській воді реєструється в жовтні, а серед асоційованої з гідробіонтами мікробіоти в липні 2018 року.

2. Пік чисельності молочнокислих бактерій, бактерій, що вирости на середовищі Ендо і вісмут-сульфідний агар, реєструється серед асоційованої з мідіями мікробіоти в жовтні 2018 року.

3. У вересні відзначається загальне зниження чисельності всіх груп мікроорганізмів, крім асоційованих з губками.

4. Показана позитивна кореляція між показниками загального мікробного числа та чисельністю молочнокислих бактерій; негативна кореляція показана між чисельністю молочнокислих бактерій, загальним мікробним числом і чисельністю бактерій, що вирости на вісмут-сульфідному агарі.

Стаття надійшла до редакції 01.10.2019

Список використаної літератури

1. Тропивская А. Г. Распределение и изменчивость фосфатмобилизующих бактерий и соединений фосфора на взморье Дуная / А. Г. Тропивская, Ю. И. Богатова, И. К. Курдиш // Вісник ОНУ. Біологія. – 2014. – Т. 19, вип. 2(35). – С. 77–90.
2. Alakomi H. L. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane / H. L. Alakomi, E. Skyttä, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, I. M. Helander // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66. – P. 2001–2005. doi:10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000
3. Boon Fei Tan. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities/ Boon Fei Tan, Charmaine Ng, Jean Pierre Nshimiyimana // Frontiers in Microbiology. – 2015. – Vol. 6. – Article 102. doi: 10.3389/fmicb.2015.01027
4. Boualam M. Relationships between coliform culturability and organic matter in low nutritive / M. Boualam, L. Mathieu, S. Fass, J. Cavard, D. Gatel // Water Research. – 2002. – Vol. 36. – P. 412-420. doi:10.1016/s0043-1354(01)00460-2
5. De Vuyst L. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications / L. De Vuyst, F. Leroy // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 13. – P. 194–199. doi:10.1159/00010475

6. Dorevitch S. Water quality as a predictor of gastrointestinal illness following incidental contact water recreation / S. Dorevitch, S. Deflorio-Barker, R.M. Jones, L. Liu // *Water Res.* – 2015. – Vol. 83. – P. 94–103. doi.org/10.1016/j.watres.2015.06.028.
7. Figueras M. J. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality/ M. J. Figueras, J. J. Borrego // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2010. –Vol. 7. – P. 4179–4202. doi: 10.3390/ijerph7124179
8. Franzmann P. D. Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in ice lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. / P. D. Franzmann, P. Hopfi, N. Wiess, B. J. Tindall // *Arch Microbiol.* – 1991. – Vol. 156(4). – P. 255–262.
9. Haile R. W. The health effects of swimming in ocean water contaminated by storm drain runoff / R. W. Haile, J. S. Witte, M. Gold, R. Cressey, C. McGee, R. C. Millikan // *Epidemiology.* – 1999. – Vol. 10. – P. 355–363. doi: 10.1097/00001648-199907000-00004
10. Karbasdehi V. N. Indicator bacteria community in seawater and coastal sediment: the Persian Gulf as a case / V. N. Karbasdehi, S. Dobaradaran, I. Nabipour, A. Ostovar, H. Arfaeina, A. Vazirizadeh, R. Mirahmadi, M. Keshtkar, F. F. Ghasemi, F. Khalifei // *J. Environ. Health Sci. Eng.* – 2017. – Vol.15. – P. 1–15. https://doi.org/10.1186/s40201-017-0266-2.
11. Kathiresan K. Prospects of lactic acid bacteria of marine origin / K. Kathiresan, G. Thiruneelakandan // *Indian Journal of Biotechnology* – 2008. – Vol 7. – P. 170–177
12. Li P. Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection / P. Li, D. H. Lewis, D. M. Gatlin // *Fish Shellfish Immunol.* – 2004. – Vol. 16. – P. 561–569. doi:10.1016/j.fsi.2003.09.005
13. Morio Ishikawa. *Halolactibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov. and *Halolactibacillus miurensis* sp. nov., halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria constituting a phylogenetic lineage in *Bacillus* rRNA group 1/ Morio Ishikawa, Kazuyuki Nakajima, Yuko Itamiya, Sayumi Furukawa, Yasushi, Kazuhide Yamasato // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2005. – Vol. 55(Pt 6). – P. 2427–2439. doi: 10.1099/ijs.0.63713-0
14. Napier M. D. Exposure to human-associated fecal indicators and self-reported illness among swimmers at recreational beaches: a cohort study / M. D. Napier, R Haugland, Ch. Poole, A. P. Dufour // *Environmental Health.* –2017. – Vol.16. – Article 103. doi: 10.1186 / s12940-017-0308-3.
15. Ringo E. Lactic acid bacteria in fish: a review / E. Ringo, F. J. Gatesoupe // *Aquaculture.* – 1998. – Vol. 160. – P. 177–203. doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00299-8
16. Ringo E. Lactic Acid Bacteria in Finfish – An Update/ E. Ringo, S. H. Hoseinifar, K. Ghosh, H. Van Doan // *Frontiers in Microbiology.* – 2018. –Vol. 9. – Article 1818. doi: 10.3389/fmicb.2018.01818.
17. Toffin L. *Marinilactibacillus piezotolerans* sp.nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deep sub-seafloor sediment of the Nankai Trough / L. Toffin, K. Zink, C. Kato, P. Pignet, A. Bidault, N. Bienvenu, J. L. Birrien, D. Prieur // *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2005. – Vol. 55(1). – P. 345–351. doi: 10.1099/ijs.0.63236-0.
18. Va'zquez J.A. Survival of Lactic Acid Bacteria in Seawater: A Factorial Study / J. A. Va'zquez, M.L. Cabo, M.P. Gonza'lez, M.A. Murado// *Current Microbiology.* – 2003. – Vol. 47. – P. 508–513 doi: 10.1007/s00284-003-4099-0

K. M. Kranga, N. Yu. Vasylieva, I. V. Strashnova

Odesa National Mechniykov University, Department of Microbiology, Virology
and Biotechnology,
2, Dvorianska str., Odesa 65082, Ukraine, takmic@onu.edu.ua

DISTRIBUTION AND VARIABILITY OF THE HETEROTROPHIC, COLIMORPHIC AND LACTIC ACID BACTERIA NUMBER IN WATER AND AQUATIC ORGANISMS OF THE BLACK SEA

Abstract

Currently, there is an active revision of established positions in classical microbiology, both in the area of sanitary-microbiological indicators of water quality and the search for groups of microorganisms that were previously thought to be not to be present in seawater and the microbiota associated with its inhabitants. The results of the study of the numbers of the main groups of microorganisms that make up proxy indices for sanitary-microbiological indicators and the numbers of lactic acid bacteria were shown in this article.

The aim of this study was to compare the total microbial number, lactic acid bacteria and colimorphic bacteria in sea water in microbiota associated with its inhabitants depending on the season.

Materials and methods. To study the abundance index of various groups of microorganisms, classical microbiological methods were used. To calculate the presence of a relationship between signs, we used the «corrplot» package in program R 3.4.0.

Research results. The presence of lactic acid bacteria in the water of the Black Sea and among the associated microbiota of aquatic organisms has been shown for the first time. It was shown that the maximum abundance of this group in water ($1.5 \pm 0.33 \times 10^4$ CFU/ml) was recorded in July, and the maximum abundance among the associated microbiota ($1.66 \pm 0.61 \times 10^4$ CFU/ml) was recorded in October. The distribution of the number of colimorphic bacteria and bacteria that grew on bismuth-sulfide agar in the study of seawater was the opposite, and in the study of the associated microbiota was the same. The maximum of the total microbial contamination in water was recorded in October ($1.1 \pm 0.7 \times 10^6$ CFU/ml) in the associated microbiota of aquatic organisms in July. Correlation relationships between the number of bacteria characterizing the total microbial contamination, colimorphic bacteria and lactic acid microorganisms was revealed. Seasonal changes in the number of the studied groups of microorganisms were shown.

Conclusions. Various principles of the distribution of heterotrophic, colimorphic and lactic acid microorganisms depending on the season and place of excretion have been identified.

Keywords: abundance indicator; Black sea; aquatic organisms; lactic acid bacteria.

References

1. Tropivska I. G., Bogatova I. Yu., Kurdish I. K. (2014) «Distribution and variability of phosphate-mobilizing bacteria and phosphorous compounds in the Danube coastal waters» [«Распределение и изменчивость фосфатмобилизующих бактерий и соединений фосфора на взмorie Dunaya»], Visnyk of ONU. Biology, 19 (2), pp 77-90
2. Alakomi H. L., Skyttä E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I. M. (2000) «Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane», Appl. Environ. Microbiol, 66, pp 2001–2005. doi:10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000
3. Boon Fei Tan, Charmaine Ng, Jean Pierre Nshimiyimana (2015) «Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities», Frontiers in Microbiology, 6, 102. doi: 10.3389/fmicb.2015.01027
4. Boualam M., Mathieu L., Fass S., Cavard J., Gatel D. (2002) «Relationships between coliform culturability and organic matter in low nutritive», Water Research, 36, pp 412-420. doi:10.1016/s0043-1354(01)00460-2
5. Vuyst L. De, Leroy F. (2007) «Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications», J. Mol. Microbiol. Biotechnol, 13, pp 194–199. doi:10.1159/00010475
6. Dorevitch S., Deflorio-Barker S., Jones R.M., Liu L. (2015) «Water quality as a predictor of gastrointestinal illness following incidental contact water recreation», Water Res, 83, pp 94–103. doi. org/10.1016/j.watres.2015.06.028.
7. Figueras M. J., Borrego J. J. (2010) «New perspectives in monitoring drinking water microbial quality», Int. J. Environ. Res. Public Health, 7, pp 4179–4202. doi: 10.3390/ijerph7124179
8. Franzmann P. D., Hopfi P., Wiess N., Tindall B. J. (1991) «Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in ice lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov.», Arch Microbiol, 156(4), pp 255-262.
9. Haile R. W., Witte J. S., Gold M., Cressey R., McGee C., Millikan R.C. (1999) «The health effects of swimming in ocean water contaminated by storm drain runoff», Epidemiology, Vol. 10, pp 355–363. doi: 10.1097/00001648-199907000-00004
10. Karbasdehi V.N., Dobaradaran S., Nabipour I., Ostovar A., Arfaeinia H., Vazirizadeh A., Mirahmadi R., Keshtkar M., Ghasemi F.F., Khalifei F. (2017) «Indicator bacteria community in seawater and coastal sediment: the Persian Gulf as a case», J. Environ. Health Sci. Eng, 15, pp 1–15. https://doi.org/10.1186/s40201-017-0266-2.
11. Kathiresan K., Thiruneelakandan G.(2008) «Prospects of lactic acid bacteria of marine origin», Indian Journal of Biotechnology, 7, pp 170-177.
12. Li P., Lewis D. H., Gatlin D. M. (2004) «Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection», 16, pp 561–569. doi:10.1016/j.fsi.2003.09.005
13. Morio Ishikawa, Kazuyuki Nakajima, Yuko Itamiya, Sayumi Furukawa, Yasushi, Kazuhide Yamasato (2005) «*Halolactibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov. and *Halolactibacillus miurensis* sp. nov., halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria constituting a phylogenetic lineage in *Bacillus* rRNA group 1», Int J Syst Evol Microbiol, 55(Pt 6), pp 2427-2439. doi: 10.1099/ijs.0.63713-0.
14. Napier M. D., Haugland R., Poole Ch., Dufour A.P.(2017) «Exposure to human-associated fecal indicators and self-reported illness among swimmers at recreational beaches: a cohort study», Environmental Health, 16, 103. doi: 10.1186 / s12940-017-0308-3.
15. Ringo E., Gatesoupe F. J. (1998) «Lactic acid bacteria in fish: a review», Aquaculture, 160, pp 177-203. doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00299-8.
16. Ringo E., Hoseinifar S. H., Ghosh K., Van Doan H. (2018) «Lactic Acid Bacteria in Finfish—An Update», Frontiers in Microbiology, 9, pp Article 1818. doi: 10.3389/fmicb.2018.01818.
17. Toffin L., Zink K., Kato C., Pignet P., Bidault A., Biennu N., Birrien J.L., Prieur D. (2005) «*Marinilactibacillus piezotolerans* sp.nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deep

- sub-seafloor sediment of the Nankai Trough», *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), pp 345-351. doi: 10.1099/ijs.0.63236-0
18. Va'zquez J.A., Cabo M.L., Gonza'lez M.P., Murado M.A. (2003) «Survival of Lactic Acid Bacteria in Seawater: A Factorial Study», *Current Microbiology*, 47, pp 508–513 doi: 10.1007/s00284-003-4099-0.