

На правах рукописи

Дьякова Светлана Александровна

**ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ
ВОДЫ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРИГЛУБОЙ ЗОНЫ ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ
СЕВЕРНОГО КАСПИЯ**

Специальность - 1.5.16. Гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Севастополь – 2024

Работа выполнена в Волжско-Каспийском филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» («Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства») в лаборатории ихтиопатологии и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Астраханский государственный технический университет» в научно-исследовательской лаборатории микробиологического мониторинга кафедры «Прикладная биология и микробиология».

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Прикладная биология и микробиология» ФГБОУ ВО АГТУ Сопрунова Ольга Борисовна

Официальные оппоненты:

Кондратьева Любовь Михайловна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории гидрологии и гидрогеологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института водных и экологических проблем Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Хабаровск;

Зайцева Светлана Викторовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей и экспериментальной биологии Сибирского Отделения Российской академии наук, г. Улан-Удэ.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Мурманский морской биологический институт РАН», г. Мурманск

Защита состоится 27 сентября 2024 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.221.01 (Д900.009.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» по адресу: 299011, Россия, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2; телефон: +7(8692)54-06-49; e-mail: dissovet@ibss-ras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» по адресу: 299011, Россия, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2, и на сайте по адресу: <https://www.ibss-ras.ru/science/dissertation-council-24-1-221-01/announcement/2633/>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Поспелова Наталья Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Каспийское море – самый крупный солоноватоводный водоем в мире, не имеющий связи с Мировым океаном (Катунин, 2014). Северный Каспий – наиболее мелководная часть Каспийского моря (Панин, 2005; Катунин, 2014), обладающая высоким хозяйственным значением (Монахова, 2015). На его акватории создаются идеальные условия для нагула молоди и взрослых особей полупроходных и проходных видов рыб (Мирзоян, 2018), на шельфе ведется активная добыча углеводородного сырья, которая наряду с развитым судоходством, вносит значительный вклад в антропогенное воздействие на данную акваторию (Гаврилов, 2011; Войнова, 2018). Направления хозяйственного использования акватории Северного Каспия определяют необходимость ежегодного мониторинга гидробиологических показателей морской среды, в системе которого особое место занимают такие микробиологические показатели, как определение общей численности бактерий (ОЧБ), численности культивируемых сапротрофных, олиготрофных и углеводородокисляющих бактерий (УОБ), их видового состава и физиолого-биохимических свойств. Изменение вышеуказанных параметров микробиоты позволяют определить направленность происходящих процессов в морской экосистеме и своевременно провести корректирующие мероприятия по устранению или минимизации антропогенного воздействия на среду. Активная добыча нефти на акватории Северного Каспия сопряжена с риском аварийных разливов, что определяет актуальность поиска новых автохтонных штаммов-нефтедеструкторов, эффективных и безопасных для использования в биоремедиации акватории.

Изучением бактериальных сообществ воды и грунта северной части Каспийского моря, в том числе определением общей численности и биомассы микроорганизмов в воде и донных отложениях, установлением численности гетеротрофов и нефтедеструкторов, занимались ряд исследователей на протяжении XX–XXI веков (Буткевич, 1938; Осницкая, 1953; Осницкая, 1959; Жукова, 1955; Крисс, 1956; Новожилова, 1958; Цыбань, 1977; Сокольский, 1987; Салманов, 1999; Умербаева, 2003; Куликова, 2005; Лисицкая, 2008; Соколова, 2012; Обухова, 2014; Ларцева, 2015). Однако комплексное изучение культивируемых гетеротрофных микробных сообществ, учитывающих численность различных групп бактериопланктона и бактериобентоса в

долгосрочном сезонном аспекте, а также изучение биоразнообразия их видового состава и отдельных физиолого-биохимических свойств, не проводилось.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в выявлении особенностей функционирования бактериальных сообществ воды и донных отложений приглубой зоны западной части Северного Каспия в условиях активного развития хозяйственной деятельности, а также скрининг новых штаммов-нефтедеструкторов, эффективных и безопасных для использования в биоремедиационных целях..

В соответствии с целью в работе были поставлены следующие задачи:

1. Определить динамику общей численности бактерий, количества сапротрофных, олиготрофных и углеводородокисляющих бактерий, а также их соотношение в поверхностном и придонном горизонтах воды в сезонном аспекте;

2. Определить динамику численности сапротрофных, олиготрофных и углеводородокисляющих бактерий, а также их соотношение в донных отложениях в сезонном аспекте;

3. Выявить взаимосвязь микробиологических показателей с гидролого-гидрохимическими параметрами морской среды;

4. Выявить особенности разнообразия культивируемого сапротрофного и углеводородокисляющего бактериопланктона и бактериобентоса, определить наличие у выделенных бактерий факторов патогенности и антибиотикорезистентности;

5. Провести скрининг углеводородокисляющих бактерий с целью получения штаммов-нефтедеструкторов, перспективных для применения в биоремедиационных процессах.

Научная новизна работы. Впервые получены комплексные данные о динамике численности различных физиологических групп гетеротрофных бактерий в поверхностном и придонном горизонтах воды и донных отложениях приглубой зоны западной части Северного Каспия в долгосрочном сезонном аспекте. Впервые получены данные о сезонной динамике биоразнообразия культивируемых сапротрофных бактерий и УОБ, выделенных из воды и грунта приглубой зоны западной части Северного Каспия, выявлена частота встречаемости у изолированных бактерий факторов патогенности и множественной антибиотикорезистентности. Выделен новый перспективный штамм-нефтедеструктор, идентифицированный на основании секвенирования 16s рРНК как *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9T, который

продемонстрировал наличие гидрофобных свойств и высокую степень деструкции нефти и отдельных ее фракций (алканов, полиароматических и алифатических углеводородов).

Теоретическая и практическая значимость. Результаты, полученные в ходе работы, могут быть использованы в качестве фоновых показателей при проведении комплексного экологического мониторинга акватории северной части Каспийского моря. На их основании дана оценка потенциального вклада бактерий в процессы естественного очищения вод, которую необходимо учитывать при разработке экологических критериев качества водной среды, в том числе нормативов предельно допустимого загрязнения и сброса нефтепродуктов. Основные результаты выполненных исследований и использованные в работе методы применяются при выполнении работ по государственному заданию в части «Осуществление государственного мониторинга водных биологических ресурсов во внутренних водах, территориальном море РФ, на континентальном шельфе РФ и в исключительной экономической зоне РФ, в Азовском и Каспийском морях».

Методология и методы исследования. В ходе исследований применены общепринятые стандартные методы определения общей численности бактерий, численности различных гетеротрофных групп бактерий, определения таксономического состава культивируемого бактериопланктона и бактериобентоса и их биоразнообразия, определения факторов патогенности и антибиотикорезистентности бактерий. Исследования полезных свойств нового штамма-нефтедеструктора включали применение как часто используемых методов (эмульгирующая активность, гидрофобная активность, гравиметрический способ определения убыли нефти), так и частные методы (флуометрия, ИК-спектрометрия, газовая хроматография) для определения деструкции отдельных классов нефтяных углеводородов. Собранный материал обработан статистически.

Положения, выносимые на защиту

1. Количественные характеристики бактериопланктона и бактериобентоса приглубой зоны западной части Северного Каспия определяются объемом стока волжских вод и содержанием биогенных элементов;

2. Снижение биоразнообразия сапротрофного и углеводородокисляющего бактериопланктона и бактериобентоса во временном аспекте в совокупности с их

физиолого-биохимическими свойствами указывает на стрессирование микробных сообществ приглубой зоны западной части Северного Каспия;

3. Новый аборигенный бактериальный штамм-нефтедеструктор *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9T является перспективным объектом для использования его в биоремедиационных целях.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечена достаточным количеством собранных проб для качественной и количественной оценки показателей бактериопланктона и бактериобентоса. Использованы стандартные методы статистической обработки данных с применением программ MS Excel. Все полученные результаты и выводы подкреплены данными, приведёнными в рисунках и таблицах. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, были апробированы на 19 научных мероприятиях, включая международные.

Личный вклад автора. Автор сформулировал и обосновал тему исследования, поставил цели и задачи работы, принимал участие в экспедиционных исследованиях, проводил отбор и обработку проб, выбор и отработку методов исследования. Автор проводил подготовку и написание статей, материалов конференций и докладов как лично, так и в соавторстве. Текст диссертационной работы написан самостоятельно лично соискателем.

Публикации по теме исследования. Основные положения и выводы диссертации Дьяковой Светланы Александровны изложены в 27 печатных работах, из них: статей в рецензируемых научных журналах – 8, в том числе реферируемых в Web of Science и Scopus – 2, статьи в сборниках материалов конференций – 17, тезисы докладов конференций – 2. Требованиям ВАК по специальности 1.5.16 «Гидробиология» удовлетворяют 4 работы в рецензируемых научных изданиях. В статьях, опубликованных в соавторстве, вклад соискателя состоит в получении оригинальных данных, обсуждении и написании текста статей и тезисов. Права соавторов публикаций не нарушены.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Общий объем 135 страниц, 34 рисунка, 7 таблиц, 7 приложений. Список литературы содержит 248 источников, в том числе - 72 иностранных.

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю, д.б.н., профессору Ольге Борисовне Сопруновой за помощь и поддержку на протяжении всех этапов работы, сотрудникам лаборатории ихтиопатологии и лаборатории водных проблем и токсикологии Волжско-Каспийского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («КаспНИРХ») за помощь в проведении исследований и предоставленные данные по гидрохимии, сотрудникам кафедры «Прикладная биология и микробиология» ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет» за ценные советы и помощь в интерпретации исследований, Наталье Владимировне Карыгиной за помощь в освоении методов флуометрии, ИК-спектрометрии, газовой хроматографии.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность работы, сформулированы ее цель и задачи, представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследований.

В **первой главе** «Обзор литературы» приводится обзор гидролого-гидрохимических особенностей обитания бактериопланктона и бактериобентоса Северного Каспия. Описана история изучения микробиоты Северного Каспия с 40-х годов XX века по настоящее время, рассмотрены основные особенности распределения общей численности и биомассы бактериопланктона и бактериобентоса, а также гетеротрофных, углеводородокисляющих микроорганизмов в Каспийском море. Дано описание углеводородокисляющих бактерий как перспективных объектов биоремедиации морской среды. Проведен анализ существующих разработок, описаны преимущества и недостатки применения различных видов бактерий для биоремедиации нефтяного загрязнения морской акватории.

Во **второй главе** «Объекты и методы исследований» охарактеризованы районы отбора проб, общий объём и методы анализа собранного материала. Исследования проводили в весенний, летний и осенний периоды 2013-2018 гг. в приглубой зоне западной части Северного Каспия во время экспедиций, проводимых Волжско-Каспийским филиалом ФГБНУ «ВНИРО» («КаспНИРХ»).

Объектом исследований являлись вода поверхностного и придонного горизонтов, донные отложения, накопительные культуры на полужидкой среде Клодницкого для сапротрофов и на жидкой среде Теппера с добавлением нефти в качестве единственного источника углерода для УОБ, а также бактериальная углеводородокисляющая культура,

выделенная из воды северной части Каспийского моря, перспективная для дальнейшего использования ее для биоремедиации морской среды от нефтяного загрязнения.

Для определения общей численности бактерий в морской воде использовали метод мембранной фильтрации с последующим окрашиванием карболовым раствором эритрозина (ГОСТ 17.1.2.04-77, 2000; Дагурова, 2019). Для определения численности сапротрофных, олиготрофных и углеводородокисляющих бактерий использовали метод предельных разведений с последующим проращиванием их на плотных питательных средах: питательном агаре для сапротрофов, среде Теппера с добавлением нефти для углеводородокисляющих микроорганизмов, питательном агаре, разбавленном в 10 раз для олиготрофов (Бузолева, 2012; Теканова, 2015; Колотова, 2017; Makhdoumi, 2018). Для определения ассимиляционного потенциала воды Северного Каспия использовали величину бактериальной деградации нефтепродуктов, которую рассчитывали по численности углеводородокисляющих микроорганизмов морской воды (ZoBell, 1973; Рубцова, 2003). Для выделения сапротрофных и углеводородокисляющих бактерий из воды и грунта Северного Каспия проводили постановку накопительных культур на полужидкой среде Клодницкого и жидкой среде Теппера с добавлением нефти в качестве единственного источника углерода (Теппер, 2004; Обухова, 2015). Выделенные культуры тестировали на проявление факторов патогенности, определяли протеолитическую, гемолитическую, лецитиназную и ДНК-азную активности (Сидоренко, 2014; Лабинская, 2021). Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам проводили диско-диффузным методом (Сидоренко, 2014). Для оценки разнообразия бактериальных биологических сообществ применяли индекс Шеннона (Шитиков, 2003; Chernov, 2015).

Первичный скрининг новых микроорганизмов-нефтедеструкторов производили путем множественных пересевов на твердые среды с нефтью штриховым методом с оценкой интенсивности роста. Идентификацию бактериального изолята проводили с помощью анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК в Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиале Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»).

Для выявления способности выделенных бактерий к синтезу биосурфактантов определяли индекс эмульгации (Cooper, 1987). Для определения гидрофобности поверхности клеток применяли метод, разработанный М. Розенбергом в модификации Е.В. Серебряковой (Серебрякова, 2002). Деструкцию нефти бактериальным штаммом определяли гравиметрическим методом (Другов, 2000), методами ИК-спектрометрии (ПНД Ф 14.1:2:4.273-2012, 2012), флуориметрии (ПНД Ф 14.1:2:4.128-98, 2012) и газовой хроматографии (ГОСТ 31953-2012, 2019).

Статистическая обработка собранного материала включала в себя стандартные методы вариационной статистики и корреляционный анализ с использованием программных пакетов MS Excel.

В третьей главе «Численность бактериопланктона и бактериобентоса в приглубой зоне западной части Северного Каспия» представлена динамика общей численности бактерий (ОЧБ), численности культивируемых сапротрофных, олиготрофных, углеводородокисляющих бактерий (УОБ), а также их соотношения, в воде и донных отложениях Северного Каспия.

В приглубой зоне западной части Северного Каспия средние сезонные показатели ОЧБ обладали цикличностью, значения ОЧБ ежегодно уменьшались от весны к осени (рисунок 1).

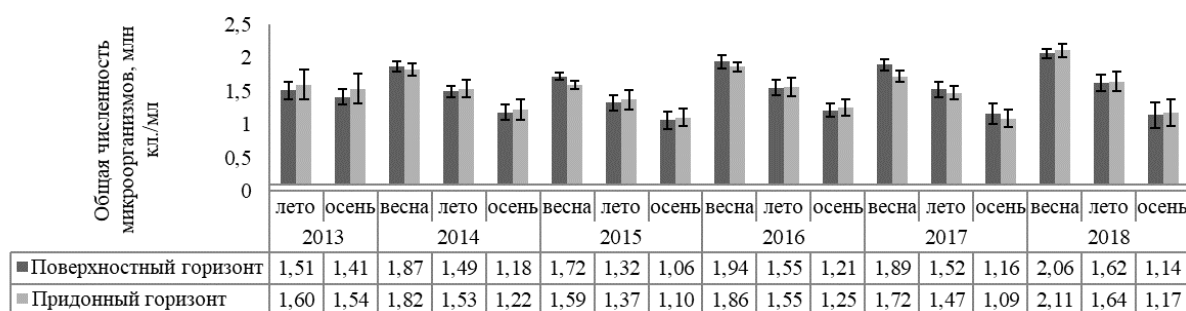
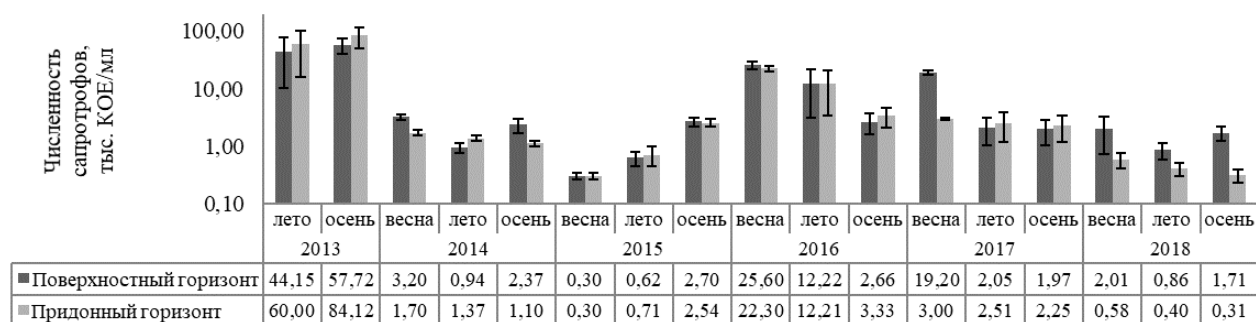


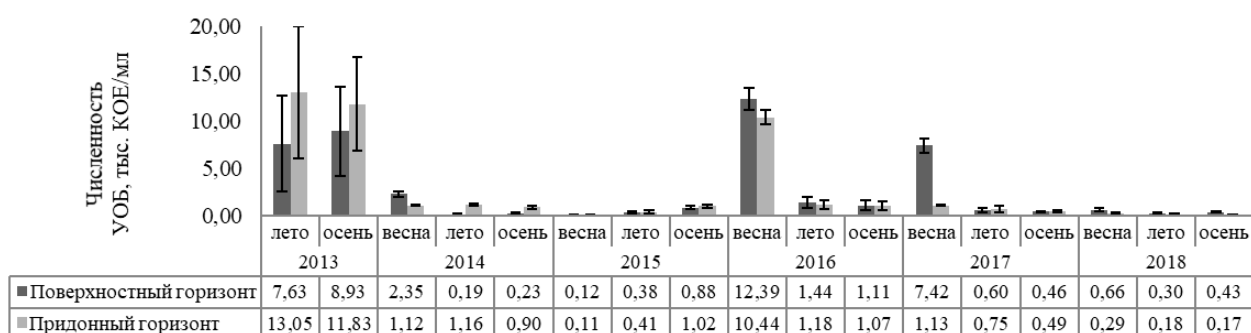
Рисунок 1 – Общая численность бактерий в поверхностном и придонном горизонтах воды приглубой зоны западной части Северного Каспия

На развитие ОЧБ в большей степени оказывали влияние годовая сток Волги ($r=+0,77$) и содержание в воде минерального азота ($r=+0,60$). Влияние концентрации минерального фосфора и кремния на ОЧБ незначительно ($r=+0,25$ и $r=+0,24$, соответственно).

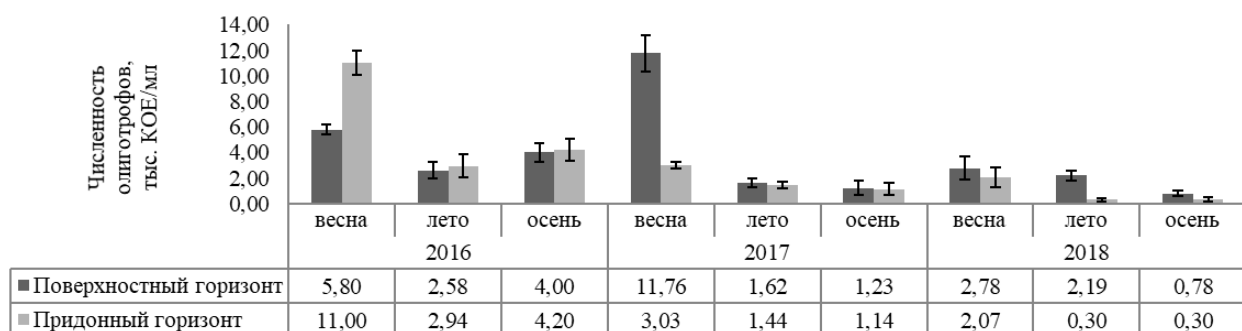
В составе культивируемого гетеротрофного бактериального сообщества воды самой многочисленной группой являлись сапротрофы (рисунок 2а).



а



б



в

Рисунок 2 – Численность сапротрофных (а), углеводородокисляющих (б) и олиготрофных (в) бактерий в поверхностном и придонном горизонтах воды приглубой зоны западной части Северного Каспия

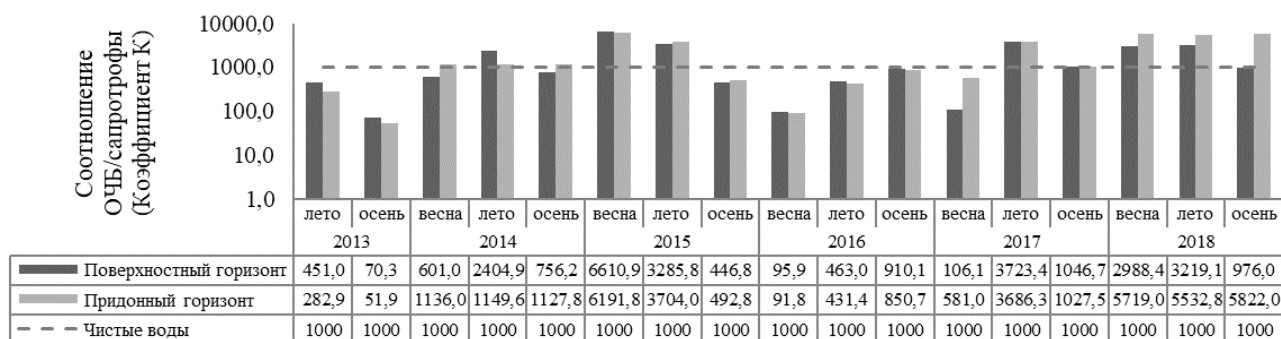
Численность сапротрофных бактерий зависела от годового стока р. Волги только в весенний период во время половодья ($r=+0,65$), в то время как в летне-осенний период большую степень влияния на сапротрофов оказывало содержание минеральных форм азота ($r=+0,83$). Концентрация УОБ в воде Северного Каспия тесно коррелировала с сапротрофами ($r=0,99$), при этом уступала им в численности на протяжении всего

периода исследований (рисунок 2б). Максимальная численность УОБ в поверхностном и придонном горизонтах воды зарегистрирована весной 2016 г., летом и осенью 2013 г. (рисунок 1б). Количество УОБ коррелировало с содержанием в воде минерального азота и кремния ($r = + 0,81$).

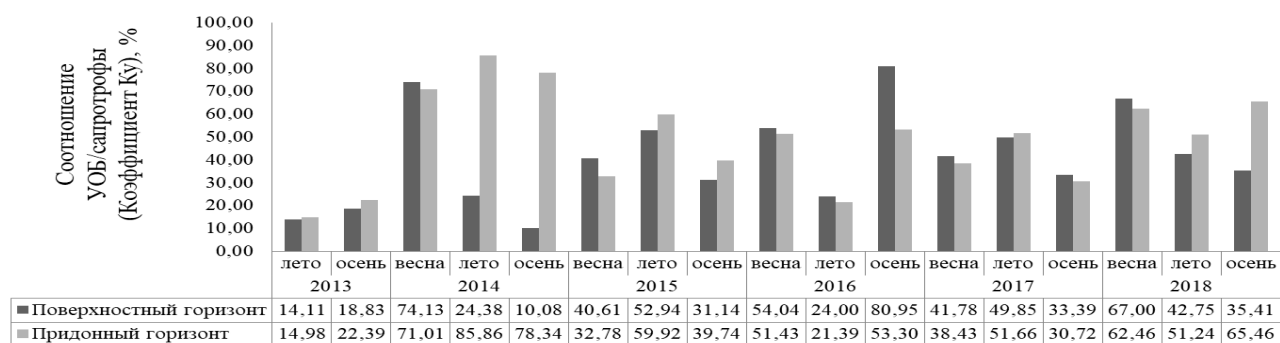
Определение ассимиляционного потенциала воды исследуемой акватории Северного Каспия показало, что бактериальная деградация нефтепродуктов углеводородокисляющими бактериями варьировала от 0,005 до 0,466 г УВ/м³ в сутки в поверхностном горизонте и от 0,004 до 0,491 г УВ/м³ в сутки в придонном горизонте. Максимальная бактериальная деградация нефтепродуктов происходила преимущественно в весенний период.

Численность культивируемых олиготрофных бактерий изучали в период с 2016 по 2018 гг. Концентрация олиготрофов (рисунок 2в) в воде приглубой зоны западной части Северного Каспия в основном уступало сапротрофам, средне сезонные значения коэффициента трофности К_т, отражающие соотношение сапротрофы/олиготрофы, в большинстве случаев превышали 1, что указывало на повышенную трофность акватории.

Кроме абсолютных величин численности различных групп бактериопланктона, изучали соотношение ОЧБ и сапротрофов (коэффициент К) и УОБ и сапротрофов (коэффициент К_у). Эвтрофирование приглубой зоны западной части Северного Каспия отмечено в 2013 и 2016 г., весной и осенью 2014 г и 2017 г., осенью 2015 г. и 2018 г., когда регистрировали повышение доли сапротрофных бактерий в ОЧБ (коэффициент К < 1000) (рисунок 3а). В остальные периоды соотношение ОЧБ и сапротрофов соответствовало олиготрофному водоему (рисунок 3).



а



б

Рисунок 3 – Соотношение ОЧБ/сапротрофы (а) и УОБ/сапротрофы (б) в поверхностном и придонном горизонтах воды приглубой зоны западной части Северного Каспия

Соотношение УОБ и сапротрофов (Ку) изменялось от 10,08 до 80,95 % (рисунок 3б). Преимущественно высокие показатели коэффициента Ку в районе исследований указывали на высокую адаптивность гетеротрофного бактериопланктона к нефтяным углеводородам и способность вовлекать данные соединения в круговорот углерода, понижая таким образом токсичность поллютанта и обеспечивая самоочищение акватории Северного Каспия.

В донных отложениях самой многочисленной группой в культивируемом гетеротрофном бактериальном сообществе являлись сапротрофы. Максимум численности сапротрофных бактерий отмечен весной 2016 г., летом и осенью 2013 г. (рисунок 4).

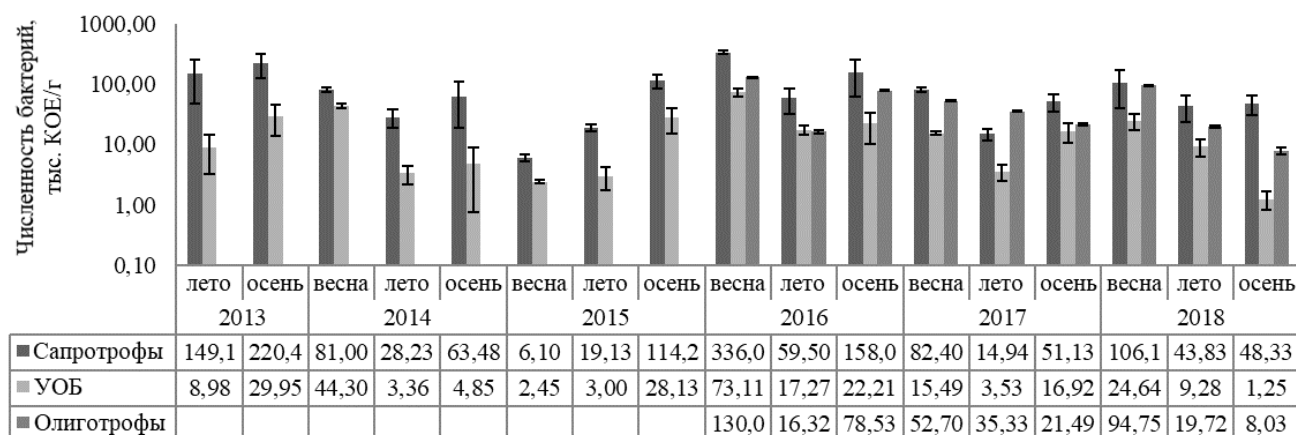


Рисунок 4 – Численность различных групп бактериобентоса в донных отложениях приглубой зоны западной части Северного Каспия

В период исследований отмечали цикличное изменение численности сапротрофного бактериобентоса, количество сапротрофов достигало максимума в весенние периоды, к лету концентрация бактерий сокращалась, а к осени несколько возрастала. Концентрация УОБ в донных отложениях исследуемой акватории уступала сапротрофам на протяжении всего периода исследований. Максимальная численность УОБ в донных отложениях зарегистрирована весной и летом 2016 г. и осенью 2013 г. (рисунок 4). В отличие от сапротрофов, углеводородокисляющий бактериобентос не имел четкой сезонной направленности, что сказывалось на соотношении данных групп бактерий, которое изменялось от 6,71 до 57,92 %. Соотношение УОБ и сапротрофов в донных отложениях уступало аналогичному показателю для воды, что свидетельствовало о большей уязвимости донного экотопа к нефтяному загрязнению по сравнению с водой (рисунок 5).

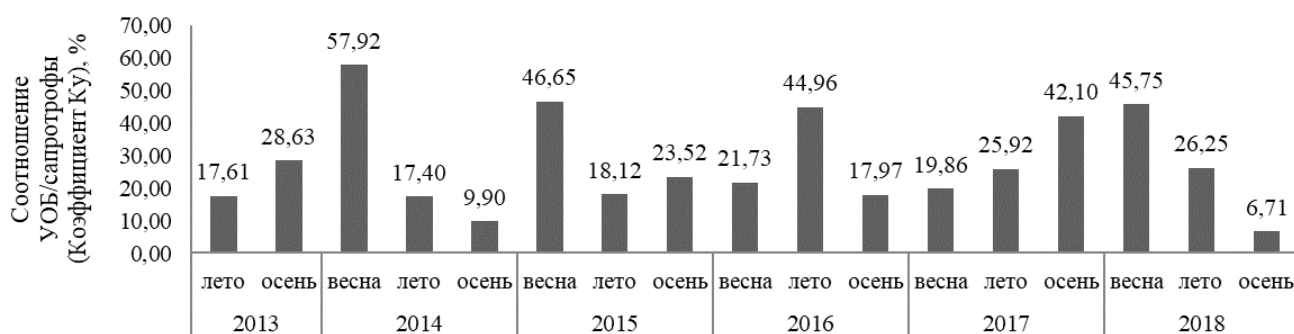


Рисунок 5 – Соотношение УОБ и сапротрофов в донных отложениях приглубой зоны западной части Северного Каспия

Максимум численности олиготрофных микроорганизмов в донных отложениях отмечен весной 2016 г. (рисунок 4). Сезонная динамика олиготрофного бактериобентоса отличалась разнонаправленностью. Значения коэффициента трофности K_t в грунте в большинстве случаев превышало 1. В донных отложениях массовое развитие олиготрофов невозможно, поскольку содержание органического вещества (0,1–28,2 г/кг) значительно превышало лимитирующий порог для олиготрофов. Преобладание в бактериобентосных сообществах сапротрофов свидетельствовало о том, что основная масса осаждающегося органического вещества находится на промежуточных этапах разложения и не закончила трансформацию в водной толще, что способствовало его накоплению в донных осадках.

В четвертой главе «Биоразнообразие бактериопланктона и бактериобентоса приглубой зоны западной части Северного Каспия» описано бактериальное биоразнообразие воды и донных отложений. В период мониторинга с 2013 по 2018 гг. из проб воды и донных отложений приглубой зоны западной части Северного Каспия методом постановки накопительных культур выделено более 2000 изолятов сапротрофных бактерий, относящихся к 28 таксонам: *Arthrobacter sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Aeromonas sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Bacillus sp.*, *Citrobacter sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Escherichia sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Hafnia sp.*, *Klebsiella sp.*, *Micrococcus sp.*, *Moraxella sp.*, *Nocardia sp.*, *Photobacterium sp.*, *Planococcus sp.*, *Proteus sp.*, *Providencia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Salinococcus sp.*, *Salmonella sp.*, *Serratia sp.*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Vibrio sp.* Из проб воды чаще выделяли представителей сем. Pseudomonadaceae и Vibrionaceae. В накопительных культурах донных отложений чаще отмечали бактерии сем. Pseudomonadaceae и грамположительные формы. Ежегодно наиболее часто отмечали *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Vibrio sp.* Остальные таксоны встречались единично.

Выделяемые из накопительных культур воды и донных отложений УОБ во многом повторяли разнообразие сапротрофов. В период исследований наиболее часто выделяли представителей *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* и *Vibrio sp.*

В элективных условиях среди выделенных сапротрофов в накопительных культурах воды отмечена тенденция увеличения встречаемости *Pseudomonas sp.*; в накопительных культурах донных отложений *Pseudomonas sp.* наиболее часто регистрировали в составе УОБ, в то время как среди сапротрофов представителей рода *Pseudomonas* отмечали значительно реже.

Особое внимание привлекало наличие среди непостоянных членов накопительных культур воды и грунта условно-патогенных бактерий *Aeromonas sp.*, *Enterococcus sp.*, *Moraxella sp.*, *Providencia sp.*, а также бактерий сем. Enterobacteriaceae (*Citrobacter sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia sp.*, *Hafnia sp.*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Salmonella sp.*, *Serratia sp.*, *Shigella sp.*). Выделенные бактерии сем. Enterobacteriaceae являлись санитарно-показательными, их обнаружение в пробах воды и грунта могло указывать на нарушение санитарного состояния акватории на фоне антропогенного воздействия.

Ежегодно среди выделенных из воды и грунта приглубой зоны западной части Северного Каспия сапротрофных микроорганизмов массово встречались условно-патогенные бактерии, обладающие комплексом факторов патогенности и множественной антибиотикорезистентностью.

В период исследований в накопительных культурах часто регистрировали бактерии, обладающие сразу двумя факторами патогенности (рисунок 6), что повышало общую вирулентность данных микроорганизмов. Наличие у микроорганизмов, изолированных из накопительных культур воды и донных отложений приглубой зоны западной части Северного Каспия, одного или нескольких факторов патогенности, предположительно, указывало на вирулентную активность выделенных бактерий *in vitro*, при этом в период исследований бактериальные заболевания гидробионтов не выявлены.

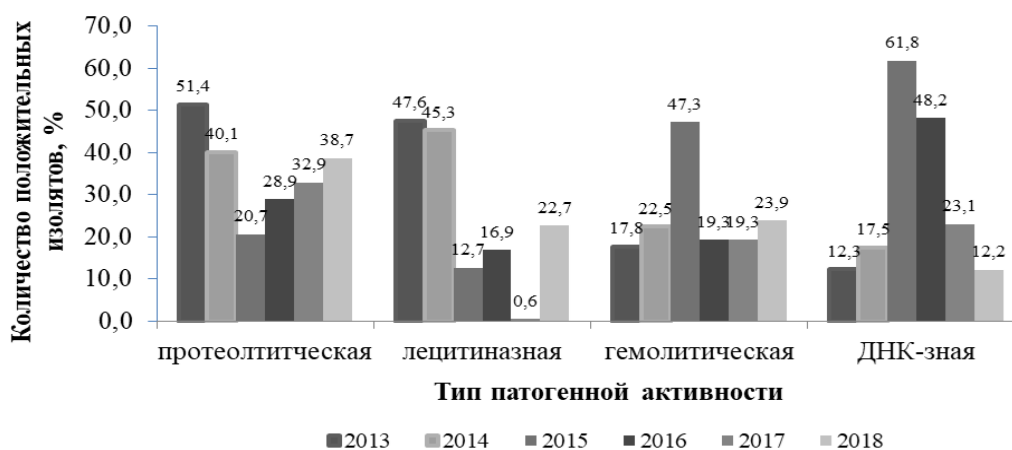


Рисунок 6 – Различные типы патогенности активности микроорганизмов в период исследований

Микроорганизмы, выделенные из воды и грунта северной части Каспийского моря, обладали множественной антибиотикорезистентностью по отношению различным группам препаратов. В многолетнем аспекте отмечена высокая резистентность выделенных бактерий к бета-лактамам антибиотикам оксациллину, бензилпеницилину и ампициллину (62–92 % выделенных изолятов). Минимальная резистентность выделенных бактерий отмечена к препаратам гентамицина и ципрофлоксацина, количество устойчивых изолятов в среднемноголетнем аспекте составляло 12,2 и 10,4 %, соответственно (таблица 1).

Таблица 1 – Доля бактерий, устойчивых к воздействию антибактериальных препаратов, %

Антибиотик	Год исследований						Средне-многолетнее значение
	2013	2014	2015	2016	2017	2018	
Амоксициллин	-	92,5	80,0	73,5	54,0	-	75,0
Ампициллин	-	62,5	83,6	78,3	59,6	76,0	72,0
Бензилпенициллин	74,3	85,0	83,6	88,0	70,3	-	80,2
Гентамицин	11,3	2,5	27,3	16,9	3,2	12,0	12,2
Имипенем	15,7	25,0	34,5	24,1	39,2	25,3	27,3
Левомецетин	20,5	27,5	-	-	24,1	40,0	28,0
Офлоксацин	-	2,5	43,6	21,7	8,9	22,7	19,9
Стрептомицин	17,7	20,0	47,3	30,1	24,4	21,3	26,8
Тетрациклин	24,5	15,0	-	-	9,9	38,7	22,0
Фурагин	19,3	37,5	85,5	50,6	48,7	-	48,3
Фурадонин	62,4	40,0	80,0	55,4	57,3	60,0	59,2
Ципрофлоксацин	6,5	2,5	-	-	8,6	24,0	10,4
Эритромицин	57,4	67,5	83,6	47,0	48,2	61,3	60,8

Примечание: «-» - нет данных

Высокая устойчивость выделенных бактерий к различным классам антибиотиков еще раз подтверждала значительное антропогенное воздействие на морскую среду, в том числе и за счет привнесения бактериального загрязнения на акваторию. Развитие множественной антибиотикорезистентности представителей микробиоты моря также предполагало высокие адаптационные возможности выделенных микроорганизмов.

Оценку биоразнообразия бактериопланктона и бактериобентоса Северного Каспия производили с помощью индекса Шеннона (Шитиков, 2003). Для сапротрофного бактериопланктона индекс Шеннона варьировал в пределах 2,065–2,616 бит. Видовое разнообразие УОБ в условиях накопительных культур на протяжении всего периода исследований уступало сапротрофам, индекс Шеннона составлял 1,354–2,188 бит. В сапротрофном бактериопланктоне отмечена тенденция уменьшения видового разнообразия, в то время как биоразнообразие углеводородокисляющих бактерий имеет нечеткую периодичность. В донных отложениях Северного Каспия индекс Шеннона для сапротрофов варьировал в пределах 1,709–2,466 бит. Видовое разнообразие УОБ в донных отложениях уступало сапротрофам, индекс Шеннона составлял 1,075–2,033 бит.

В пятой главе «Выделение углеводородокисляющих бактерий из вод Северного Каспия» представлены результаты скрининга микроорганизмов – нефтедеструкторов,

перспективных для применения в целях биоремедиации морской акватории. В результате скрининга из воды северной части Каспийского моря выделен бактериальный изолят–нефтедеструктор, не проявлявший факторов патогенности в виде гемолитической, протеолитической, ДНК-зной и лецитиназной активностей, обладающий чувствительностью к различным группам антимикробных препаратов. На основании проведенного анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК культура идентифицирована как *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T.

Исследования эмульгирующей активности показали, что *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T не синтезировал экзогенных биосурфактантов, однако обладал гидрофобной клеточной стенкой, показатель гидрофобности клеточных стенок выделенной культуры составлял 48 %.

Убыль нефти в морской воде и жидкой минеральной среде определяли гравиметрическим методом. В контрольных пробах без внесения суспензии бактерий убыль нефти к 30 суткам достигала 13,3%, при внесении суспензии *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T (титр клеток $1,23 \pm 0,12$ млрд кл./мл) - деструкция углеводов повышалась до 41,9 % (рисунок 7).

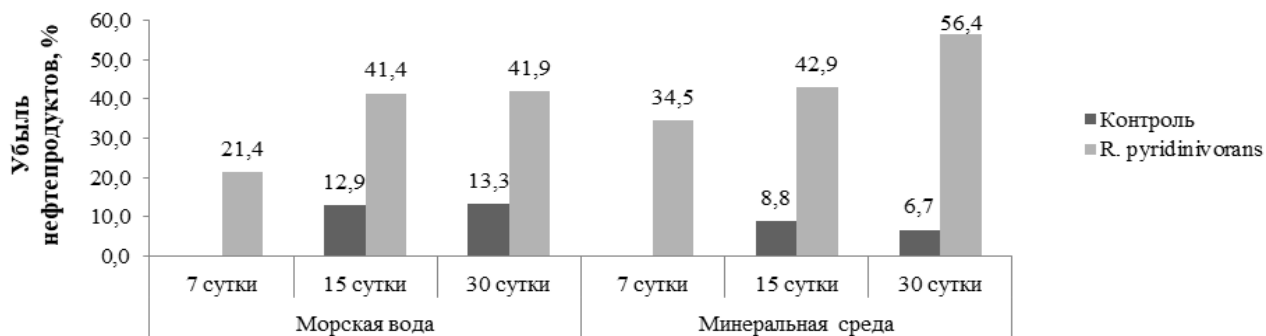


Рисунок 7 – Деградация нефти (гравиметрический метод) в контрольной пробе и пробе, содержащей *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T

В контрольной пробе на минеральной среде убыль нефти к 30-м суткам составила 6,67–8,82%. Применение суспензии *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T продемонстрировало максимальную деструкцию нефти (34,5%) в первые 7 суток эксперимента, в последующем степень деградации нефти повышалась до 56,4% на 30-е сутки.

Дегградация углеводов полиароматического ряда (ПАУ) с использованием суспензии *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T к 30-м суткам достигала 46,21 %, что превышало значения контроля более, чем в 2 раза (рисунок 8).

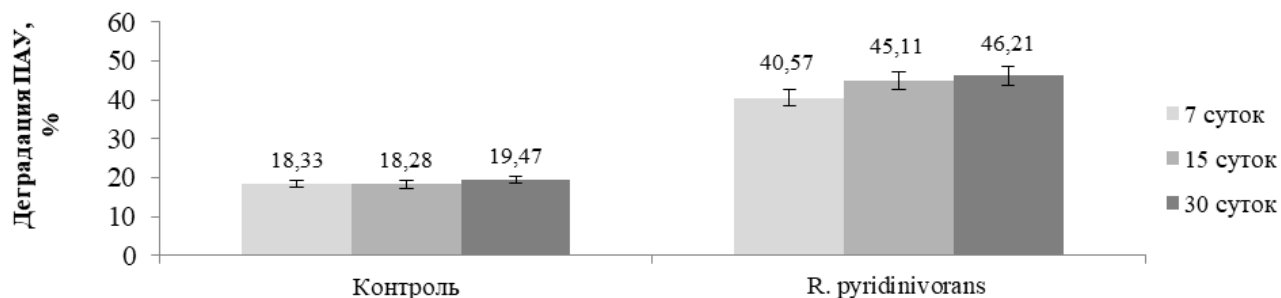


Рисунок 8 – Дегградация полиароматических углеводов (ПАУ) в контрольной пробе и пробе, содержащей *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T

Степень дегградации алифатических углеводов при внесении *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T практически постоянна на всем протяжении эксперимента (51,6–55,2%). (рисунок 9а).

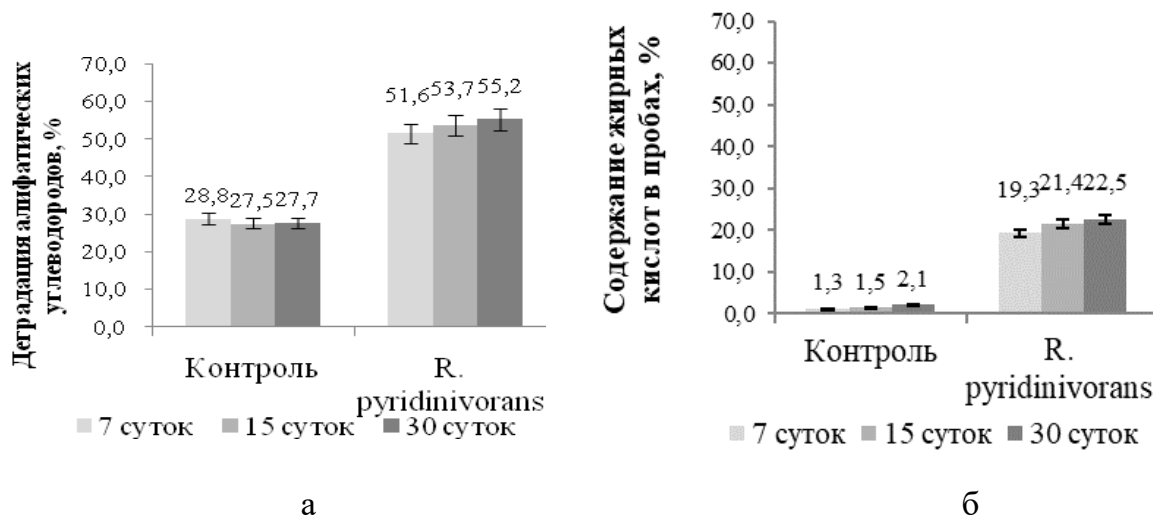


Рисунок 9 – Дегградация алифатических углеводов (а) и содержание жирных кислот (б) в контрольной пробе и пробе, содержащей *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T

Методом ИК-спектрометрии определяли не только остаточное содержание нефтепродуктов, но и содержание в инокуляте жирных кислот. В контрольной пробе, не содержавшей бактериальную культуру, содержание жирных кислот оставалось

стабильно низким на протяжении всего эксперимента (рисунок 9б). В пробах, содержащих *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T, уже на 7-е сутки содержание жирных кислот превышало контрольные показатели более чем в 10 раз и продолжало увеличиваться до окончания эксперимента. Такая динамика содержания жирных кислот в пробах с бактериальной культурой наряду с общим снижением алифатических углеводов указывала на то, что бактериальный изолят не только разрушал широкий спектр нефтяных углеводов, но и, вероятно, переводил часть из них в другое состояние (жирные кислоты), делая их более доступными для других групп микроорганизмов.

Общая деструкция нефтепродуктов алканового ряда при внесении суспензии *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T достигала 51,2 % к 15 суткам (рисунок 10).

Максимальную деструкцию отмечали для алканов с длиной углеродной цепи C25-C40. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что бактериальный штамм *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T способен утилизировать практически весь комплекс алкановых углеводов в различные временные промежутки.

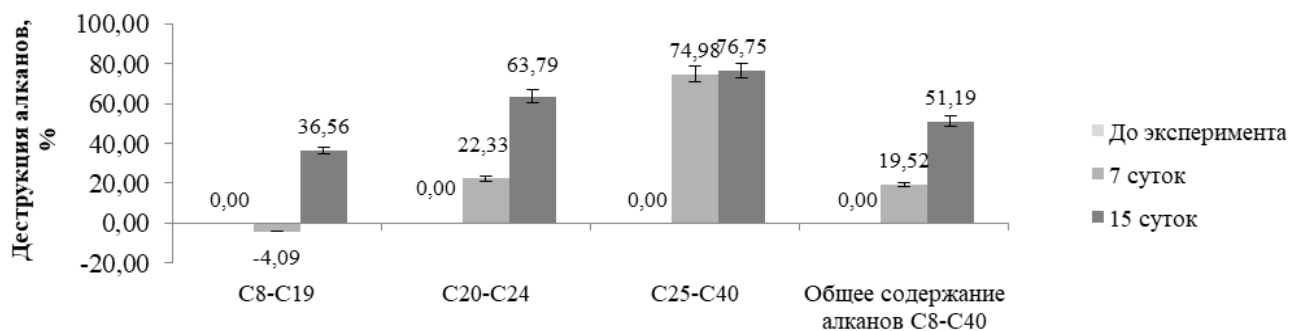


Рисунок 10 – Убыль алканов в пробе, содержащей *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T

В целом, в результате исследований из вод Северного Каспия отобран и исследован аборигенный штамм актинобактерий, не обладавший факторами патогенности и множественной антибиотикорезистентностью, обладающий гидрофобной активностью и способный к деструкции нефти, в том числе и отдельных ее фракций, что свидетельствует о перспективности использования *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T в качестве эффективного деструктора нефтяных углеводов различной природы.

В **заключении** обобщены результаты, полученные в ходе исследований. Показано, что в результате комплексного изучения бактериальных сообществ воды и донных

отложений установлена тесная взаимосвязь внутри различных физиологических групп бактерий. Максимумы и минимумы численности бактерий приходились на одни и те же временные промежутки, таксономический состав бактерий, выделенных из воды и грунта, практически идентичен. В бактериопланктоне отмечали большую адаптивность к нефтяному загрязнению, чем в бактериобентосе. Если во временном аспекте в количественных характеристиках, определяющих состояние бактериальных сообществ воды и донных отложений, отмечена тенденция к улучшению микробиологического состояния за счет снижения трофности и увеличения соотношения УОБ и сапротрофов, то снижение биоразнообразия культивируемого сапротрофного и углеводородокисляющего бактериопланктона и бактериобентоса, наряду частой регистрацией в накопительных культурах бактерий, обладавших факторами патогенности и множественной антибиотикорезистентностью указывало на стрессирование бактериальных сообществ исследованной акватории. Новый выделенный штамм *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T демонстрировал не только высокую степень утилизации нефтяных углеводов, но и безопасность за счет отсутствия факторов патогенности и множественной антибиотикорезистентности, что делает его перспективным объектом для использования в биоремедиационных процессах.

ВЫВОДЫ

1. Средние значения общей численности бактерий в воде исследованной акватории в период 2013–2018 гг. ежегодно снижались от весны к осени. Сезонная динамика численности культивируемых сапротрофных, углеводородокисляющих и олиготрофных бактерий была разнонаправленной. В период исследований отмечен тренд на снижение численности сапротрофного, углеводородокисляющего и олиготрофного бактериопланктона. Соотношение УОБ и сапротрофов в воде изменялось от 10,08 до 85,86%, коэффициент трофности K_T – от 0,38 до 8,87.
2. В донных отложениях ежегодно максимум численности сапротрофов отмечен в весенний период, к лету концентрация бактерий сокращалась, а к осени возрастала. Динамика численности УОБ и олиготрофных бактерий не имела определенной сезонной направленности. Соотношение УОБ и сапротрофов в донных отложениях изменялось от 6,71 до 57,92%, коэффициент трофности K_T – от 0,67 до 20,41.
3. Наиболее значимыми гидролого-гидрохимическими параметрами морской среды для бактериальных сообществ исследуемой акватории являлись объем волжского стока в весенний период и концентрация минеральных форм азота и кремния летом и осенью.
4. Сезонные различия в таксономическом составе культивируемых сапротрофных и углеводородокисляющих бактерий не выявлены, доминантами являлись представители р. *Pseudomonas*. Наиболее распространенным фактором патогенности у бактерий являлась протеолитическая активность (до 51%), антибиотикорезистентность проявляли 84–100% культивируемых бактерий.
5. Выделенный и идентифицированный по гену 16S рРНК новый штамм *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9T обладал гидрофобной активностью и активной деструкцией нефти до 56%, в том числе алканов, полиароматических и алифатических углеводородов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Дьякова, С. А. Бактериальные гетеротрофные изоляты Каспийского моря, трансформирующие нефть и нефтепродукты / С.А. Дьякова, Н.В. Карыгина, О.Б. Сопрунова // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2017. – № 3-1. – С. 63-66.
2. Дьякова, С.А. Современное состояние микроэкосистемы Северного Каспия / С.А. Дьякова, Е.Р. Галяутдинова, Е.Г. Лардыгина // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2018. – № 4. – С. 30-38. – DOI 10.24143/2073-5529-2018-4-30-38.
3. Serebrennikova, E. A. Comprehensive Oceanographic Survey of the Northern and Middle Caspian Sea aboard the R/V Issledovatel' Kaspiya in June 2016 / E. A. Serebrennikova, S. A. Dyakova // Oceanology. – 2018. – Vol. 58, No. 3. – P. 497-498. – DOI 10.1134/S0001437018030165. **SCOPUS**
4. Дьякова, С.А. Состояние бактериопланктона Северного Каспия в современных условиях / С.А. Дьякова, О.Б. Сопрунова, Е.Р. Галяутдинова [и др.] // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2021. – № 4. – С. 31-38. – DOI 10.24143/2073-5529-2021-4-31-38.
5. Дьякова, С.А. Исследование патогенной активности и антибиотикорезистентности культивируемых гетеротрофных бактерий, выделенных из воды и донных отложений приглубой зоны западной части Северного Каспия / С.А. Дьякова, А.В. Менькова, Е.Р. Кирюхина, О.Б. Сопрунова // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2024. – Т.18, №1(216). – С. 34-44. – DOI 10.33920/sel-09-2401-03.

Статьи, опубликованные в других рецензируемых изданиях

1. Володина, В. В. Условно-патогенная микрофлора каспийского тюленя (*Pusa caspica*) и среды его обитания в условиях антропогенного прессинга / В. В. Володина, С. А. Дьякова // Труды ВНИРО. – 2016. – Т. 162. – С. 87-96.
2. Дьякова, С.А. Изучение деструкции и трансформации нефти и нефтепродуктов бактериальными изолятами / С.А. Дьякова, Н.В. Карыгина, О.Б. Сопрунова // Экобиотех. – 2019. – Т. 2. – № 3. – С. 253-256. – DOI 10.31163/2618-964X-2019-2-3-253-256.
3. Dyakova, S. Current State of Heterotrophic Bacterioplankton and Bacteriobenthos in the Northern and Middle Parts of the Caspian Sea / S. Dyakova, V. Volodina, E. Galyautdinova, A. Menkova, O. Soprunova // KnE Life Sciences «International Applied Research Conference «Biological Resources Development and Environmental Management». – 2020. – P. 262–273.

WoS