

УДК 579.26:579.68

Л. С. Бузолева<sup>1,2</sup>, Е. А. Богатыренко<sup>1</sup>, А. И. Еськова<sup>1</sup>,  
А. В. Ким<sup>1</sup>, Е. С. Долматова<sup>1</sup>, Ю. С. Голозубова<sup>1</sup>

**ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И  
ЭКОЛОГО-ТРОФИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА  
БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ПРИБРЕЖНЫХ  
АКВАТОРИЙ ЯПОНСКОГО МОРЯ С РАЗНОЙ  
АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКОЙ\***

Изучен таксономический состав сообществ культивируемых гетеротрофных бактерий из акваторий Японского моря с разной антропогенной нагрузкой (Приморский край, РФ). Показано, что в бактериальных сообществах бухт с хроническим загрязнением промышленными и коммунально-бытовыми стоками высокая доля условно-патогенных микроорганизмов, а также полностью исчезают некоторые группы микроорганизмов, характерные только для чистых районов. Изучение эколого-трофической структуры микробных сообществ показало свою неэффективность при интерпретации результатов по амилотической и протеолитической активности бактерий.

*Ключевые слова:* сообщества, таксономический состав, эколого-трофические группы, морские микроорганизмы.

В настоящее время загрязнение водных объектов создает угрозу здоровью населения, нормальному осуществлению хозяйственной и иной деятельности, состоянию окружающей природной среды, а также биологическому разнообразию морских организмов [12].

Для прибрежных вод Приморского края, активно используемых в хозяйственной деятельности населением береговых районов, характерна высокая степень загрязнения соединениями различной природы (нефтеуглеводороды, фенолы, тяжелые металлы и т.д.) [2].

Непрерывное увеличение сбросов хозяйственно-бытовых и промышленных сточных вод в прибрежную зону морей нарушает естественный гомеостаз экосистемы, чрезмерно насыщая ее биогенными и органическими веществами, отходами морского транспорта, а также целым комплексом токсичных веществ. Вместе с фекальными стоками в акватории поступает

---

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 14-50-00034).

© Л. С. Бузолева, Е. А. Богатыренко, А. И. Еськова, А. В. Ким,  
Е. С. Долматова, Ю. С. Голозубова, 2016

патогенная и условно-патогенная микрофлора, в частности бактерии группы кишечной палочки [12].

Совокупность этих факторов приводит к вмешательству в природную среду, которое способно нарушить естественные морские биоценозы, что может сказаться на разнообразии автохтонной микрофлоры и свойствах микроорганизмов [11].

Цель работы — определить влияние антропогенного загрязнения на таксономическое разнообразие и эколого-трофическую структуру сообществ гетеротрофных культивируемых бактерий из прибрежных акваторий Японского моря (Приморский край, РФ).

**Материал и методика исследований.** *Районы исследования.* Для проведения микробиологических исследований были выбраны прибрежные акватории Японского моря, различающиеся по гидрологическим параметрам, характеру и степени антропогенной нагрузки. Район работ включал бухты Золотой Рог и Находка, испытывающие значительное влияние промышленных, бытовых и речных стоков, а также бухты Круглую и Киевку с минимальными антропогенными нагрузками (рисунок). Пробы воды отбирали в июле и декабре 2013 и 2014 гг. с глубины 10—15 см от поверхности воды с помощью стерильных шприцов. В каждой исследуемой акватории пробы отбирали в трех различных точках.

Бухта Золотой Рог является наиболее загрязненным участком зал. Петра Великого (Японское море) [4]. На ее берегах расположены морской торговый порт, рыбный порт, судоремонтный завод г. Владивостока, а также части Тихоокеанского флота. Уровень загрязненности вод нефтяными углеводородами довольно высокий [1].

Бухта Круглая расположена на о. Русском, вдается в северный берег бух. Воевода [7]. На побережье отсутствуют жилые строения, влияние антропогенного фактора минимально.

Бухта Находка расположена на западе зал. Находка Японского моря, на юге Приморского края. На берегу бухты располагаются торговый порт, рыбный порт, Находкинский судоремонтный завод и Приморский судоремонтный завод — крупнейшие предприятия г. Находки [1].

Бухта Киевка расположена в восточной части побережья Приморья, имеет широтную протяженность, открыта с южной стороны и относится к типу бухт со свободным водообменом и существенным береговым стоком. Основными гидрологическими процессами, определяющими режим вод бухты, является сток р. Киевки, вторжения вод из открытого моря и соседних бухт [7].

*Выделение и идентификация морских изолятов.* Исследуемые пробы воды после серии разведений высевали на агаризованную питательную среду для морских микроорганизмов [15] и культивировали в термостате при температуре 25°C в течение двух суток. Численность микроорганизмов вы-



Карта-схема района исследований: 1 — бух. Золотой рог; 2 — бух. Круглая; 3 — бух. Находка; 4 — бух. Киевка.

ражали в КОЕ/мл. Идентификацию полученных изолятов проводили на основе морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств [10]. В работе также были использованы наборы для идентификации API 20E, API 20NE, API 50CH, API Listeria, API Coryne (BioMerieux, Франция).

*Выделение эколого-трофических групп морских сообществ.* Для изучения эколого-трофической структуры бактериальных сообществ исследуемых районов определяли амилолитическую, протеолитическую, липолитическую и нефтеокисляющую активность полученных микроорганизмов.

Для определения ферментативной активности все полученные штаммы бактерий высевали на чашки с агаризованной средой, содержащей в качестве единственного источника углерода один из следующих субстратов: крахмал, твин 40, твин 80 и казеин. Культивирование микроорганизмов проводили в термостате при температуре 25°C в течение 3—4 сут. О наличии энзимной активности судили по появлению зон гидролиза субстрата вокруг посева бактерий на соответствующих средах. Наличие липолитической активности фиксировали по появлению мутного ореола вокруг посева за счет образования кристаллов кальциевого мыла. Для выявления зон гидролиза на среде с крахмалом в чашки дополнительно вносили раствор Люголя и отмечали появление светлых колец вокруг посевов, свидетельствующее о наличии амилаз [8].

Для определения нефтеокисляющей способности микроорганизмов методом отпечатков проводили посев чистых культур на среду для морских организмов с добавлением флотского мазута в возрастающих концентрациях (от 0,2 до 1,5%). Инкубацию проводили при комнатной температуре 2—3 сут. Уровень индивидуальной устойчивости бактериальных штаммов к нефтеуг-

леводородам оценивали на основе определения минимальной ингибирующей концентрации нефтеуглеводорода [14].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10. Сходство таксономического состава микробных сообществ из разных районов исследования изучали с помощью коэффициента Жаккара [3].

### *Результаты исследований и их обсуждение*

*Численность и таксономическое разнообразие бактериальных сообществ.* На первом этапе наших исследований была определена общая численность гетеротрофных культивируемых микроорганизмов из разных акваторий (табл. 1). Как известно, если численность составляет до  $10^3$  КОЕ/мл, то такие воды относят к чистым или олигосапробным; если численность составляет  $10^4$ — $10^5$  КОЕ/мл — воды считают мезосапробными, обогащенными биологическими соединениями; численность  $10^6$  КОЕ/мл и выше — показатель высокого загрязнения и соответствует полисапробным водам [2].

На основании полученных данных было установлено, что воды бухт Золотой Рог и Находка можно отнести к полисапробным водам, как в летнее, так и в зимнее время года (см. табл. 1). При этом наиболее загрязненным районом является бух. Золотой Рог. Высокая численность микроорганизмов в указанных акваториях связана с круглогодичными промышленными и бытовыми стоками крупных городов — Владивостока и Находки.

Воды бухт Круглая и Киевка можно отнести к мезосапробным водам как в летнее, так и зимнее время года. Несмотря на то, что эти бухты не испытывают антропогенного пресса, довольно высокие значения численности микроорганизмов связаны, скорее всего, с высоким разнообразием морской флоры и фауны, являющихся источником доступного органического вещества для бактерий [1].

Стоит отметить, что во всех бухтах отмечалось лишь незначительные сезонные колебания численности микроорганизмов, а в целом содержание бактерий в воде оставалось стабильным на протяжении двух лет исследований.

В ходе изучения таксономического богатства морских бактериальных сообществ было выделено и идентифицировано до рода 327 штаммов бактерий, из них 83 — из вод бух. Золотой Рог, 86 — из бух. Круглой, 94 — из бух. Киевка и 64 — из бух. Находка (табл. 2).

Согласно полученным данным, высокое таксономическое разнообразие (14 родов бактерий) и наибольшее количество штаммов было выделено из чистого района — бух. Киевка. В ее микробном сообществе доминировали представители р. *Bacillus* (13 штаммов). Известно, что бактерии этого рода — преимущественно почвенные микроорганизмы и в морскую среду могут поступать вместе с терригенными и речными стоками [13]. В бухту впадает р. Киевка, которая вносит в море микрофлору почвенного слоя, что и обу-

### 1. Численность культивируемых микроорганизмов из акваторий с разной антропогенной нагрузкой, КОЕ/мл

Районы исследований	2013 г.		2014 г.	
	июль	декабрь	июль	декабрь
бух. Киевка	$(6,1 \pm 1,5) \times 10^5$	$(8,1 \pm 0,5) \times 10^4$	$(2,1 \pm 0,9) \times 10^5$	$(6,9 \pm 1,5) \times 10^4$
бух. Находка	$(2,8 \pm 0,4) \times 10^7$	$(5,3 \pm 1,4) \times 10^6$	$(6,7 \pm 1,1) \times 10^7$	$(4,8 \pm 1,3) \times 10^6$
бух. Круглая	$(4,2 \pm 1,0) \times 10^5$	$(3,2 \pm 0,8) \times 10^4$	$(5,72 \pm 1,5) \times 10^5$	$(9,1 \pm 0,6) \times 10^4$
бух. Золотой Рог	$(3,8 \pm 1,4) \times 10^8$	$(2,8 \pm 1,1) \times 10^7$	$(8,8 \pm 1,4) \times 10^8$	$(6,8 \pm 1,4) \times 10^7$

славливает высокую долю *Bacillus* среди выделенных нами штаммов. Также в водах бух. Киевка были многочисленны бактерии родов *Pseudoalteromonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, которые являются типичными представителями морской микробиоты [5].

Из вод бух. Круглой было выделено 86 штаммов бактерий, отнесенных к 14 родам. В микробном сообществе данной акватории доминировали псевдомонады (10 штаммов), многочисленны были представители родов *Micrococcus*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*.

При сравнении состава сообществ двух чистых акваторий было установлено, что коэффициент сходства Жаккара ( $K_j$ ) для них равен 0,87, что говорит о большом количестве таксонов, характерных как для бух. Киевка, так и для бух. Круглой, несмотря на географическую удаленность и отличия по гидрологическим параметрам этих территорий. Отличались бухты по двум родам бактерий: только в бух. Киевка встречались представители *Rhodococcus*, а только в бух. Круглой — *Corynebacterium*.

Из бух. Золотой Рог было выделено 83 штамма бактерий, из них доминирующими были энтеробактерии (*Escherichia*, *Klebsiella*). Кроме того, были многочисленны бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Enterococcus*. Стоит отметить, что только из бух. Золотой Рог были выделены представители патогенной *Listeria monocytogenes*. Этот факт, а также высокое содержание условно-патогенной микробиоты указывает на значительное загрязнение вод бух. Золотой Рог коммунально-бытовыми стоками. Одновременно с увеличением доли патогенных и условно-патогенных бактерий наблюдается исчезновение типичных для чистых районов микроорганизмов — *Sarcina*, *Arthrobacter*, *Halomonas*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*.

Из бух. Находка было выделено наименьшее количество штаммов — 64, которые отнесены к 11 родам. Доминировали представители р. *Pseudomonas*, многочисленны были *Klebsiella* и *Vibrio*. Также как в бух. Золотой Рог, в бух. Находка встречались энтерококки. На основе показателей присутствия бактерий р. *Enterococcus*, свидетельствующих о свежем фекальном загряз-

## 2. Таксономическое разнообразие культивируемых гетеротрофных бактерий (количество штаммов)

Роды бактерий	бух. Киевка	бух. Находка	бух. Круглая	бух. Золотой Рог
<i>Micrococcus</i>	7	5	8	5
<i>Actinomyces</i>	6	5	7	5
<i>Bacillus</i>	13	0	7	8
<i>Sarcina</i>	7	0	5	0
<i>Acinetobacter</i>	7	4	5	3
<i>Pseudomonas</i>	6	12	10	8
<i>Arthrobacter</i>	4	2	6	0
<i>Vibrio</i>	8	7	7	9
<i>Halomonas</i>	5	0	4	0
<i>Flavobacterium</i>	6	0	5	0
<i>Rhodococcus</i>	4	0	0	0
<i>Acetobacter</i>	4	0	5	0
<i>Escherichia</i>	0	6	0	9
<i>Proteus</i>	0	0	0	5
<i>Citrobacter</i>	0	0	0	4
<i>Klebsiella</i>	0	9	0	8
<i>Listeria</i>	0	0	0	3
<i>Enterococcus</i>	0	6	0	7
<i>Corynebacterium</i>	0	0	4	0
<i>Pseudoalteromonas</i>	9	3	7	4
<i>Aeromonas</i>	8	5	6	5
Итого	94	64	86	83

нении, и *Escherichia*, характерных для хронического фекального загрязнения [2], можно отметить, что обе указанные акватории подвергаются постоянному загрязнению коммунально-бытовыми отходами. В то время как в водах чистых районов (бух. Круглая, бух. Киевка) бактерии, относящиеся к санитарно-показательным микроорганизмам, не обнаружены.

Результаты, полученные для вод бух. Находка, также свидетельствуют о исчезновении в микробном сообществе бактерий, характерных для чистых акваторий — *Sarcina*, *Halomonas*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*.  $K_j$  для микробных сообществ бухт Находка и Золотой Рог составил 0,67, что, в первую очередь, обусловлено более низким биоразнообразием в бух. Находка энтеробактерий и отсутствием бацилл.

При сравнении сходства таксономического разнообразия бухт со значительным антропогенным загрязнением (бух. Золотой Рог, бух. Находка) и бухт с минимальным антропогенным влиянием (бух. Киевка, бух. Круглая) было установлено, что  $K_j$  для этой пары равен 0,43. Это говорит о значительном изменении состава бактериальных сообществ под действием стрессовых факторов среды.

*Эколого-трофические группы морских сообществ.* При исследовании нефтеокисляющей способности выделенных микроорганизмов установлено, что на среде, содержащей 0,2% мазута, выросли практически все штаммы из бух. Золотой Рог и большая часть коллекции из бух. Находка (табл. 3). Более высокие концентрации углеводов приводили к снижению доли устойчивых бактерий в обеих бухтах. В коллекциях указанных акваторий были штаммы бактерий, сохранявшие способность к росту при относительно высокой концентрации мазута (1,0 и 1,5%).

Что касается бактерий бухт Киевка и Круглая, то они оказались чувствительными к повышению в среде концентрации нефтепродукта (см. табл. 3). Способность к росту на среде с 0,2 и 0,6% мазута продемонстрировало 8,4—20,3% штаммов исследуемых сообществ. При повышении концентрации нефтеуглеводородов до 0,8% бактерии из чистых районов прекращали рост.

Доля нефтеокисляющих бактерий высока в бухтах Золотой Рог и Находка, т. к. в портовых водах этих акваторий постоянно присутствуют продукты нефти, поступающие от многочисленных судов. Полученные результаты адекватно отражают ситуацию в исследуемых акваториях, которые по степени загрязнения нефтеуглеводородами, на основании литературных данных, можно расположить в следующий ряд: бух. Золотой Рог > бух. Находка > бух. Круглая > бух. Киевка [6].

Помимо техногенного органического загрязнения, исследуемые нами прибрежные воды бухт Золотой Рог и Находка страдают от большого количества поступающих канализационных сточных вод [9], поэтому представляло интерес выяснить, способны ли морские микроорганизмы разлагать иные, чем нефтеуглеводороды, органические субстраты. Большинство представителей различных групп микроорганизмов способны к синтезу экзоферментов, относящихся к классу гидролаз, расщепляющих крупные макромолекулы на более доступные соединения, проникающие через мембрану бактериальной клетки.

Высокая доля в бактериальных сообществах бухт Находка и Золотой Рог микроорганизмов с протеолитической (соответственно 30,2 и 60,0%), липолитической (соответственно 45,0 и 80,0%) и амилолитической активностью (соответственно 52,0 и 63,0%) подтверждает значительное органическое загрязнение этих акваторий, которое вызывается мощным сбросом больших объемов канализационных вод. Однако, согласно полученным данным, в чистых бухтах также отмечалось присутствие большого количества бактерий, синтезирующих амилазу (43,0% — бух. Круглая, 65,0% — бух. Киевка) и протеазу (38,2% — бух. Круглая, 42,9% — бух. Киевка). Очевидно, что подобные



### 3. Доля нефтеуглеводородокисляющих штаммов, выделенных из акваторий с разной антропогенной нагрузкой, %

Районы исследований	Концентрация флотского мазута, %				
	0,2	0,6	0,8	1	1,5
бух. Золотой Рог	91,7	72,2	38,9	30,2	12,3
бух. Находка	74,4	56,4	35,9	29,1	9,6
бух. Киевка	17,8	8,4	0	0	0
бух. Круглая	20,3	14,2	0	0	0

результаты объясняются наличием в указанных акваториях органических веществ природного происхождения, а именно, останков водорослей и морских животных. Только данные по липолитической активности объективно отражали характер и степень воздействия на природные экосистемы. Так, в чистых бухтах доля микроорганизмов, обладающих липазным комплексом, составила всего 14,3% для бух. Киевка и 18,1% — для бух. Круглой. Для разграничения источников органического загрязнения, вероятнее всего, требуется подбор селективных питательных сред для выявления более узких или специфичных эколого-трофических групп микроорганизмов.

#### Заключение

Антропогенное загрязнение прибрежных акваторий промышленными и коммунально-бытовыми стоками приводит к увеличению в бактериальных сообществах доли патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также к снижению доли и исчезновению автохтонной микрофлоры, характерной для чистых районов. В бухтах Золотой Рог и Находка отмечалась высокая доля бактерий, устойчивых к различным концентрациям нефтеуглеводородов, в бухтах Киевка и Круглая большинство штаммов бактерий были чувствительны к токсичному действию загрязняющих веществ. Для микробных сообществ всех исследуемых районов было характерно присутствие сравнительно большого количества микроорганизмов с протеолитической и амилитической активностью, что не отражает природу используемых ими субстратов. Таким образом, требуется подбор питательных сред для более точного определения характера и степени воздействия на морскую среду.

\*\*

*Вивчено таксономічний склад угруповань гетеротрофних бактерій акваторій Японського моря (Приморський край, РФ) з різним антропогенним навантаженням. Показано, що у бактеріальних угрупованнях бухт із хронічним забрудненням промисловими та комунально-побутовими стоками високою є частка умовно-патогенних мікроорганізмів, а також повністю зникають деякі групи мікроорганізмів, характерні лише для чистих районів. Вивчення еколого-трофічної структури мікробних угруповань показало свою неефективність при інтерпретації результатів щодо амілолітичної та протеолітичної активності бактерій.*

\*\*



*The taxonomical structure of culturable heterotrophic bacterial communities from waters of the Sea of Japan (Primorskii krai, Russia) with different anthropogenic pressure is studied. It is shown that in bacterial communities of bays with chronic pollution by industrial and household drains the share of opportunistic microorganisms is high, and also some groups of microorganisms which are common for pure areas completely disappear. Studying of ecological and trophic structure of microbic communities showed the inefficiency the interpretation of results based on amylolytic and proteolytic activity of bacteria.*

\*\*

1. Бойченко Т.В. Химико-экологическая и микробиологическая оценка качества морских поверхностных вод Южного Приморья: Дис. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 2004. — 150 с.
2. Бузолева Л.С. Микробиологическая оценка прибрежных вод. Учебно-полевая практика: учебное пособие. — Владивосток: Тинро-центр, 2012. — 72 с.
3. Елисеева И.И., Рукавишников В.О. Группировка, корреляция, распознавание образов: статистические методы классификации и измерения связей. — М.: Статистика, 1977. — 143 с.
4. Ермолицкая М.З. Сохранение биоразнообразия дальневосточных морей на примере лососевых рыб // Исследования Мирового океана: материалы Междунар. науч. конф. — Владивосток: Дальрыбвтуз, 2008. — С. 98—99.
5. Израэль Ю.А., Цыбань А.В. Антропогенная экология океана. — М.: Флинта наука, 2009. — 520 с.
6. Калинина Е.Г. Влияние органического загрязнения на структуру и состояние микробных сообществ поверхностных вод бухты Золотой Рог: Дис. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 2006. — 191 с.
7. Лоция северо-западного берега Японского моря от реки Туманная до мыса Белкина. — СПб.: Изд. ГУНиО, 2005. — 360 с.
8. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта. — М.: Мир, 1983. — 536 с.
9. Огородникова А.А. Эколого-экономическая оценка воздействия береговых источников загрязнения на природную среду и биоресурсы залива Петра Великого. — Владивосток: ТИНРО-центр, 2001. — 193 с.
10. Определитель бактерий Берджи в 2 томах / Под ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снитг. — М.: Мир, 1997.
11. Цыбань А.В., Панов Г.В., Барина С.П. Индикаторная микрофлора в Балтийском море // Исследование экосистемы Балтийского моря. Вып. 3. — Л.: Гидрометеиздат, 1990. — С. 69—83.
12. Цыбань А.В., Панов Г.В., Барина С.П., Мошарова И.В. Экологические свойства и динамика гетеротрофных микроорганизмов. — М.: Наука, 2000. — 26 с.
13. Attwell R.W., Colwell, R.R. Thermoactinomyces as terrestrial indicators for estuarine and marine waters // Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes / Ed. by L. Ortiz, L. F. Wojalil, V. Yakoleff. — London: Acad. Press, 1984. — P. 453—372.

14. *Lambert R.J.W., Pearson J.* Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values // *J. of Appl. Microbiol.* — 2000. — Vol. 88, N 5. — 784—790 p.
15. *Youchimizu M., Kimura T.* Study of intestinal microflora of Salmonids // *Fish Pathol.* — 1976. — Vol. 10, N 2. — P. 243—259.

<sup>1</sup> Дальневосточный федеральный университет,  
Владивосток, РФ

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии СО РАМН,  
Владивосток, РФ

Поступила 29.06.16