



УДК 579.68+84:546.48+49+81

В. А. ИВАНИЦА, д. б. н., проф., зав. каф., А. Е. БУХТИЯРОВ, асс.

Одесский Национальный университет им. И. И. Мечникова, Одесса, Украина

## ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ ОДЕССКОГО ПРИБЕРЕЖЬЯ, УСТОЙЧИВЫХ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ

Из прибрежных вод Одесского залива - Нефтяной гавани, пляжей "Дельфин" и "Дача Ковалевского" изолированы штаммы доминирующих гетеротрофных грамотрицательных бактерий с фоновыми и высокими уровнями устойчивости к ионам  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и  $Hg^{2+}$ . Изучение фенотипических признаков выделенных штаммов бактерий позволило отнести подавляющее их большинство к родам *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* и *Enterobacter*. Массовое бактериальное население в исследованных районах представлено в основном видами *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. natriegens*, *V. nereis*, *Pseudomonas nautica*, *P. stutzeri*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas veronii*, устойчивые к свинцу - видами *Vibrio campbellii*, *V. harveyi*, *V. natriegens*, *V. nereis*, *Pseudomonas nautica*, *Enterobacter agglomerans*, резистентные к кадмию - видами *Vibrio harveyi*, *V. natriegens*, *V. nereis*, *Pseudomonas gelidicola*, *P. stutzeri*, *Enterobacter agglomerans*, к ртути - видами *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. marinus*, *V. natriegens*, *Pseudomonas nautica*, *Enterobacter agglomerans*. В исследованных районах не отмечено большого видового разнообразия бактерий, что характерно для акваторий с высокой антропогенной нагрузкой и неблагоприятной экологической ситуацией.

**Ключевые слова:** гетеротрофные морские бактерии, таксономия, устойчивость, ионы  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , Черное море

Принятие Международного Кодекса номенклатуры бактерий в 1973 г. [5] и создание на его основе Одобренного списка наименований бактерий (1980 г.) привели к тому, что многие виды и роды бактерий, обнаруженные ранее в Черном море [4, 6, 7, 10, 15 и др.], были определены как невалидные, названия которых действующий Кодекс использовать запрещает. Кроме того, применение молекулярно-биологических методов в систематике бактерий способствовало перемещению некоторых таксонов (прежде всего, родов и видов) в системе классификации прокариот. Фактически это привело к обесцениванию большого массива данных, накопленных учеными за многие десятилетия микробиологических исследований, и сделало невозможным описание и про-

ведение сравнительного анализа таксономического состава бактериального населения Черного моря - одного из самых изученных в микробиологическом отношении морских водоемов. Становится очевидным, что описание качественного состава гетеротрофных бактерий Черного моря необходимо начинать практически с начала.

Серьезная проблема загрязнения морской среды связана с поступлением тяжелых металлов с суши в прибрежные районы моря, образованием высокотоксичных металлорганических комплексов и с накоплением металлов гидробионтами (в том числе микроорганизмами) в дозах, опасных для их жизнедеятельности. Оказывая воздействие на генетический аппарат микроорганизмов, токсиканты

способствуют техногенной микроэволюции последних, изменяя состав микробных сообществ [2, 3, 13, 14].

Ранее [12] было показано, что представители микробных сообществ прибрежных вод г. Одессы обнаружили способность к росту при концентрациях свинца, кадмия и ртути, на 5 – 6 порядков превышающих концентрации этих металлов в водах исследованных районов. Доля резистентных бактерий и уровень их резистентности ко всем трем металлам возрастали в следующем порядке: пляж “Дельфин”, пляж “Дача Ковалевского”, Нефтяная гавань Одесского порта, что в целом соответствует уровню антропогенного воздействия на эти акватории.

Целью настоящей работы было определение таксономического состава гетеротрофных бактерий с фоновым и высоким уровнями устойчивости к тяжелым металлам, выделенных из прибрежных вод пляжа “Дельфин”, пляжа “Дача Ковалевского” и Нефтяной гавани Одесского порта.

**Материал и методы.** Объектом исследования служили 32 штамма гетеротрофных бактерий, изолированных из проб морской воды, отобранных в июне 1999 г. на 3-х станциях: в районе Центральной Нефтяной гавани Одесского порта (причал № 1), акватории пляжей “Дельфин” и “Дача Ковалевского” (причал № 138) с поверхностного горизонта воды (0 – 50 см) на расстоянии 50 м от берега. Из них 9 доминирующих представителей бактериопланктона выделены из воды в районе Нефтяной гавани, 9 – в районе пляжа “Дача Ковалевского” и 14 – в районе пляжа “Дельфин”.

Десять штаммов гетеротрофных бактерий с фоновым уровнем резистентности были изолированы путем посева проб воды на питательные среды, не содержащие тяжелых металлов; 8 штаммов, устойчивых к свинцу, выделены со среды с 1.0 или 1.5 ммоль/л  $Pb^{2+}$ , 7 штаммов, резистентных к кадмию, – со среды с 0.5 или 1.0 ммоль/л  $Cd^{2+}$  и 7 штаммов, устойчивых к ртути, изолированы со среды, содержащей 0.1 ммоль/л  $Hg^{2+}$ .

Для выделения, культивирования и хранения культур бактерий использовали модифицированную плотную питательную среду Ю. А. Горбенко [1]: пептон – 5 г, агар-агар – 15 г, вода морская – до 1 л, pH среды 7.2. Изоляцию штаммов бактерий проводили на питательной среде с содержанием одной из следующих солей тяжелых металлов –  $HgCl_2$ ,  $Pb(NO_3)_2$  и  $CdCl_2$  и без них. Посевы бактерий инкубировали в течение 5 сут при 22°C с последующим выделением чистых культур из колоний всех морфологических типов.

В ходе исследований проведено изучение фенотипических признаков бактерий (морфологических, культуральных, тинкториальных, физиолого-биохимических свойств) по общепринятым методикам [11] и с применением анализатора VactoScan-4.

**Результаты.** Все выделенные штаммы доминирующих бактерий с фоновым и высоким уровнем резистентности к токсичным металлам были грамотрицательные, каталазоположительные, неспорозные подвижные палочки, в подавляющем большинстве факультативные анаэробы, имеющие цитохромоксидазу, с окислительным и бродильным типом метаболизма.

Наибольшую биохимическую активность по отношению к сахарам и многоатомным спиртам проявили бактерии, резистентные к кадмию, а наименьшую – бактерии, выросшие на среде с высокой концентрацией ртути. Наибольшее число штаммов, продуцирующих ферменты оксидазу, каталазу, аргининдигидролазу, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, триптофандеаминазу, тирозиндекарбоксилазу, нитратредуктазу, уреазу и желатиназу, выделены с питательной среды, содержащей ртуть, а наименьшее – со среды с кадмием. Большинство бактерий, выделенных на среде без примесей токсичных металлов, продуцируют индол, сероводород, ацетоин и растут на среде с цитратом натрия (среда Сим-

монса). В меньшей степени это характерно для штаммов бактерий, устойчивых к ртути.

Основываясь на изученных фенотипических признаках, изолированные из прибрежных вод штаммы доминирующих гетеротрофных бактерий с различным уровнем устойчивости к тяжелым металлам были отнесены к родам *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* и *Enterobacter* [8].

Из данных, представленных на рис. 1, следует, что доминирующие бактерии из акватории Нефтяной гавани, выросшие на пита-

тельной среде без примесей токсичного металла, отнесены к *Vibrio nereis* (54.2 %) и *Pseudomonas nautica* (23.6 %). Среди бактерий, резистентных к высоким концентрациям свинца (1.0 ммоль/л), преобладают *V. nereis* (42.5 %) и *P. nautica* (28.8 %). Бактерии, устойчивые к кадмию (0.5 ммоль/л), представлены видами *V. nereis* (88 %), *Enterobacter agglomerans* (10 %) и *Pseudomonas stutzeri* (2 %). *P. nautica* (93.9 %) и *Vibrio marinus* (5.8 %) доминируют среди бактерий, резистентных к ртути (0.05 ммоль/л).

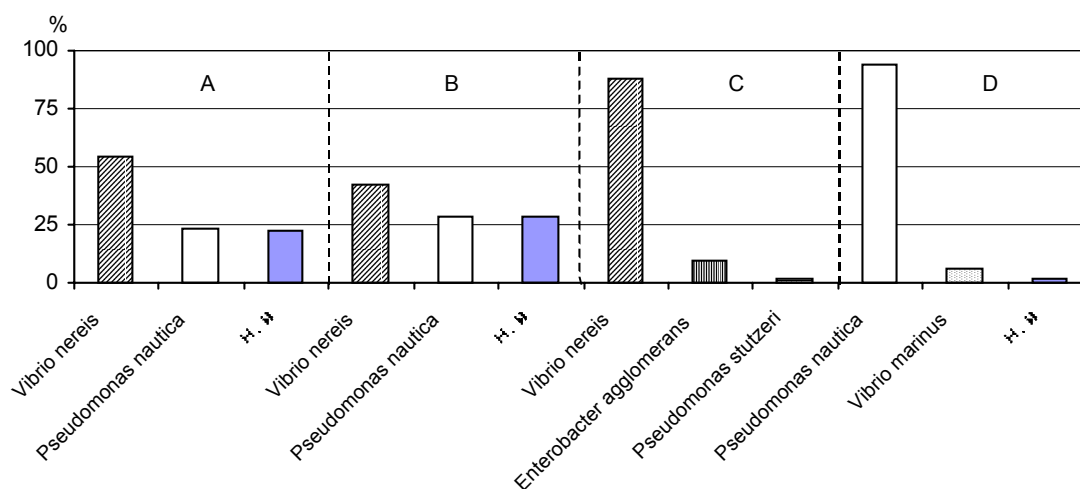


Рис. 1. Таксономический состав бактерий из района Нефтяной гавани, выросших на питательных средах без тяжелых металлов (A) и содержащих 1 ммоль/л Pb<sup>2+</sup> (B), 0.5 ммоль/л Cd<sup>2+</sup> (C), 0.05 ммоль/л Hg<sup>2+</sup> (D). Н. и. - не идентифицированные виды

Fig. 1. Taxonomic composition of bacteria from the Oil terminal region full-grown on the media without heavy metals (A) and with 1 mmol/l Pb<sup>2+</sup> (B), 0.5 mmol/l Cd<sup>2+</sup> (C), 0.05 mmol/l Hg<sup>2+</sup> (D); Н. и. - unidentified species

Представители рода *Vibrio* преобладали в пробах морской воды из района пляжа “Дача Ковалевского” (рис. 2). Среди гетеротрофных бактерий, выявляемых посевом на среду без тяжелых металлов, основное место занимали виды *Vibrio campbellii* (78.9 %) - обитатель прибрежных вод, и *V. harveyi* (13.7 %). К *Aeromonas veronii* отнесено 6 % штаммов. Как известно, аэромонады встречаются в пресных поверхностных и в сточных водах. В этом районе таксономический состав бактерий, устойчивых к свинцу и ртути, принципиально не отличался от состава бактерий, выросших на среде без токсичных металлов. Доминировали

те же виды – *Vibrio campbellii* и *V. harveyi*, хотя в разных соотношениях: резистентные к свинцу *V. campbellii* – 70 %, *V. harveyi* – 20 %, резистентные к ртути *V. harveyi* – 44.4 %, а *V. campbellii* – 33.3 %. *Aeromonas veronii*, обнаруженный на среде без токсикантов, не проявил устойчивости к тяжелым металлам. Среди штаммов, выросших на среде с максимальной концентрацией кадмия (0.5 ммоль/л), преобладали виды *V. harveyi* (42.6 %) и *Enterobacter agglomerans* (36.2 %). *V. campbellii* не выявлялся в числе доминирующих бактерий, устойчивых к кадмию.

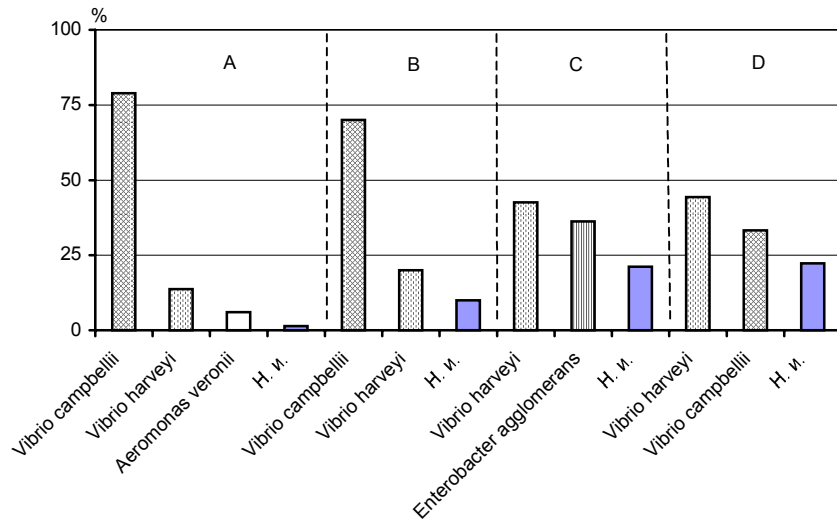


Рис. 2. Таксономический состав бактерий из района пляжа “Дача Ковалевского”, выросших на питательных средах без тяжелых металлов (А) и содержащих 1 ммоль/л  $Pb^{2+}$  (В), 0.5 ммоль/л  $Cd^{2+}$  (С) и 0.05 ммоль/л  $Hg^{2+}$  (D). Н. и. - не идентифицированные виды

Fig. 2. Taxonomic composition of bacteria from beach “Datcha Kovalevskogo” full-grown on the media without heavy metals (A) and with 1 mmol/l  $Pb^{2+}$  (B), 0.5 mmol/l  $Cd^{2+}$  (C), 0.05 mmol/l  $Hg^{2+}$  (D). Н. и. - unidentified species

В морской воде в районе пляжа “Дельфин” (рис. 3) к группе доминирующих бактерий, определяемых посевом на среду без тяжелых металлов, принадлежали *Pseudomonas*

*stutzeri* (30.8 %), *Enterobacter agglomerans* (12 %), *Vibrio alginolyticus* (10.8 %) и *V. natriegens* (7.2 %).

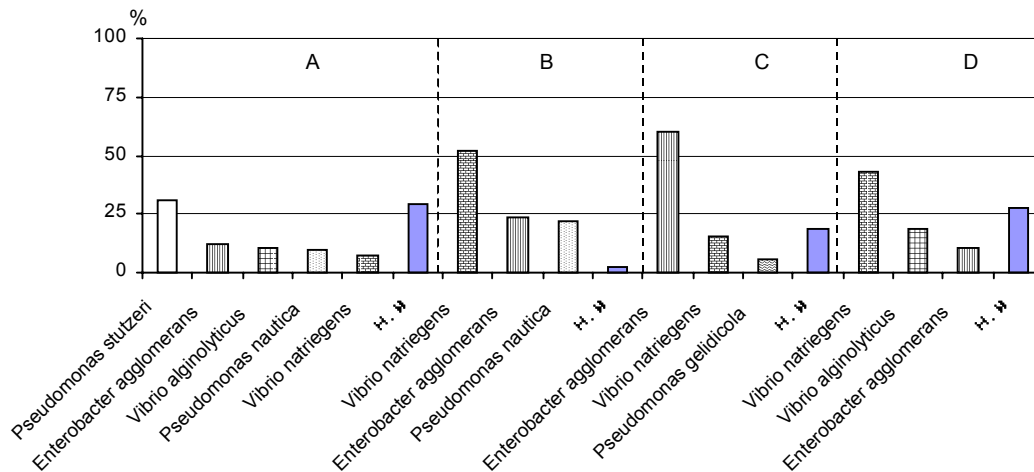


Рис. 3. Таксономический состав бактерий из района пляжа “Дельфин”, выросших на питательных средах без тяжелых металлов (А) и содержащих 0.5 ммоль/л  $Pb^{2+}$  (В), 0.1 ммоль/л  $Cd^{2+}$  (С), 0.01 ммоль/л  $Hg^{2+}$  (D). Н. и. - не идентифицированные виды

Fig. 3. Taxonomic composition of bacteria from beach “Delfin”, full-grown on the media without heavy metals (A) and with 0.5 mmol/l  $Pb^{2+}$  (B), 0.1 mmol/l  $Cd^{2+}$  (C), 0.01 mmol/l  $Hg^{2+}$  (D). Н. и. - unidentified species

Среди резистентных к максимальным концентрациям свинца (0.5 ммоль/л) бактерий преобладают *V. natriegens* (51.9 %), *E. agglomerans* (23.5 %) и *Pseudomonas nautica* (22.2 %). Наиболее устойчивы к кадмию (0.1 ммоль/л) *E. agglomerans* (60.3 %), *V. natriegens* (15.1 %) и *Pseudomonas gelidicola* (5.6 %). Резистентных к ртути (0.01 ммоль/л) бактерий из этого района

идентифицировали как *V. natriegens* (43 %), *V. alginolyticus* (18.3 %) и *E. agglomerans* (10.8 %). К сожалению, часть культур, изолированных из исследованных районов, идентифицировать не удалось (рис. 1 - 3). Их доля в некоторых случаях достигала 19.0 - 29.1 %.

**Обсуждение.** Известно [9], что в летний период для прибрежных вод г. Одессы характерно преобладание спорозоных форм бактерий, которые концентрируются у поверхности воды. Однако изучение выделенных нами доминирующих бактерий выявило превалирование неспорозоных палочек, размеры которых составляли 0.4 – 0.8 x 1.3 – 2 мкм.

Полученные нами данные относительно таксономического состава бактерий морской воды Одесского побережья дополняют имеющиеся сведения о биологическом разнообразии микробных ценозов Черного моря. Необходимо отметить, что в отличие от данных, полученных ранее [9], нами не установлено заметного доминирования в водах Одесского побережья представителей грамположительных бактерий рода *Bacillus*. В то же время, нами подтверждено отмеченное преобладание грамотрицательных бактерий комплекса *Vibrio* – *Aeromonas* – *Photobacterium* – *Lucibacterium*, который цитированным авторам не удалось дифференцировать более точно. При этом подавляющее большинство изолированных нами доминирующих гетеротрофных бактерий отнесено к родам *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*.

Очевидно, вполне закономерным следует считать наличие среди массового бактериального населения прибрежных вод в районе крупного мегаполиса, каковым является Одесса, бактерий *Enterobacter agglomerans* (сем. Enterobacteriaceae). В исследованиях, проведенных Н. Г. Теплинской с соавторами [9] в 1973 – 1975 гг., преобладали представители родов *Escherichia* и *Edwardsiella*.

Для биоценозов прибрежных вод Одесского залива, особенно для так называемых

“малых акваторий” с постоянно действующими “ливневыми” стоками и затрудненным водообменом с открытой частью моря, характерно доминирование гетеротрофных грамотрицательных палочковидных бактерий, образующих бесцветные колонии. В исследуемых районах не отмечено большого видового разнообразия бактерий, что характерно для акваторий с высокой антропогенной нагрузкой и неблагоприятной экологической ситуацией [7].

Выявленный высокий уровень фоновой устойчивости доминирующих бактерий к токсичным металлам при их незначительном содержании в воде прибрежных районов представляет интерес для понимания механизмов адаптации и изменчивости микроорганизмов под влиянием антропогенного загрязнения морской среды.

**Выводы.** 1. Установлено, что в Одесском заливе в районах Центральной Нефтяной гавани порта, акватории пляжей “Дельфин” и “Дача Ковалевского” массовое бактериальное население представлено в основном видами родов *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* и *Enterobacter*. 2. Доминирующие гетеротрофные бактерии с фоновым уровнем устойчивости к ионам  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и  $Hg^{2+}$  относятся к *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. natriegens*, *V. nereis*, *Pseudomonas nautica*, *P. stutzeri*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas veronii*. 3. Видовой состав доминирующих бактерий с высоким уровнем устойчивости к свинцу, кадмию и ртути принципиально не отличается от таксономического состава бактерий с фоновым уровнем резистентности к этим металлам.

1. Горбенко Ю. А. О наиболее благоприятном количестве “сухого питательного агара” в средах для культивирования морских гетеротрофных микроорганизмов // Микробиология. - 1961. - 30, вып.1. - С. 168 - 172.
2. Іваниця В. О. Стан і мінливість ценозів в умовах антропогенного забруднення прісноводних і

морських екосистем // Мікробіол. журн. - 1994. - 56, вип. 1. - С. 61.

3. Іваниця В. О. Стан та мінливість мікробних ценозів морських екосистем: автореф. дис. ... докт. біол. наук. - Одеса, 1996. - 48 с.

4. Крисс А. Е., Рукина Е. А., Бирюзова В. И. Видовой состав микроорганизмов Черного моря // Тр. Севастоп. биол. ст. - 1950. - 7. - С. 50 - 68.
5. Международный кодекс номенклатуры бактерий: Пер. с англ. / Под ред. Л. В. Калакуцкого, Е. Н. Кондратьева - М.: Наука, 1978. - 207 с.
6. Лебедева М. Н. Систематический состав и общая эколого-физиологическая характеристика микрофлоры / Основы биологической продуктивности Черного моря. - Киев: Наук. думка, 1979. - С. 176 - 183.
7. Нижегородова Л. Е., Нидзвецкая Л. М. Бактериальное население воды и гидробионтов - фильтраторов на отдельных участках Одесского залива // Микробиол. журн. - 1980. - 42, вып. 2. - С. 143 - 148.
8. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Г. А. Заварзина. - М.: Мир, 1997. - 1. - 432 с.
9. Теплинская Н. Г., Нижегородова Л. Е., Нидзвецкая Л. М. Сезонные изменения качественного состава сапрофитных и кишечных бактерий северо-западной части Черного моря // Экология моря. - 1984. - вып. 18. - С. 48 - 52.
10. Цыбань А. В. Бактериоценоз и бактериопланктон шельфовой области Черного моря. - Киев: Наук. думка, 1970. - 274 с.
11. Baumann P., Baumann L. The marine gram-negative eubacteria / The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria / Ed. by M.P. Starr, H. Stolp, H. Truper et al. - Berlin etc.: Springer-Verlag, 1986. - 2. - P. 1272 - 1331.
12. Ivanitsa V. A., Buchtiyarov A. Ye. Resistance level to heavy metals of microbial coenoses of the Black Sea shoreface // Вісник Одеського держ. ун-ту. - 2000. - 5, вип. 1. - С. 204 - 208.
13. Kenarova A., Bogoev V. Heavy metal tolerance of sediment microorganisms from natural and metal-polluted habitats // Report Bulg. AS. - 2001. - 54, № 8. - С. 91 - 94.
14. Nies D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes // FEMS Microbiology Reviews. - 2003. - 27. - P. 313 - 339.
15. Zaitsev Yu. P., Alexandrov B.G. Black Sea biological diversity. Ukraine. - New York: United Nations Publ., 1998. - 351 p.

Поступила 29 апреля 2004 г.

**Taxonomic composition of marine heterotrophic bacteria in Odessa coastal waters resistant to heavy metals.**

**V. O. Ivanitsa, A. E. Bukhtiyarov.** Dominant heterotrophic gram negative bacteria with basal and high levels of resistance to  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ions were isolated from coastal water of Odessa, namely the Oil terminal and beaches "Delfin" and "Datcha Kovalevskogo". Investigation of phenotypic features of isolated bacterial strains allowed to relate them to genera *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, and *Enterobacter*. Mass bacterial population in investigated regions was presented by species *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio campbellii*, *V. harveyi*, *V. natriegens*, *V. nereis*, *Pseudomonas nautica*, *P. stutzeri*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas veronii*. The species resistant to lead were *Vibrio campbellii*, *V. harveyi*, *V. natriegens*, *V. nereis*, *Pseudomonas nautica*, *Enterobacter agglomerans*, the species resistant to cadmium were *Vibrio harveyi*, *V. natriegens*, *V. nereis*, *Pseudomonas gelidicola*, *P. stutzeri*, *Enterobacter agglomerans*, and the species resistant to mercury were *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. marinus*, *V. natriegens*, *Pseudomonas nautica*, *Enterobacter agglomerans*. In investigated bacterial diversity, characteristic for aquatoria with high anthropogenic impact and unfavourable ecological situation was not recorded.

**Key words:** heterotrophic marine bacteria, taxonomy, resistance, ions  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , Black Sea

**Таксономічний склад гетеротрофних бактерій Одеського узбережжя, стійких до важких металів.**

**В. О. Іваниця, А. Є. Бухтіяров.** З прибережних вод Одеси - Нафтової гавані, пляжів "Дельфін" і "Дача Ковалевського" ізольовані штами домінуючих гетеротрофних грамнегативних бактерій з фоновими і високими рівнями стійкості до іонів  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  і  $Hg^{2+}$ . Вивчення фенотипових ознак виділених штамів бактерій дозволило віднести переважну більшість їх до родів *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* і *Enterobacter*. Масове бактеріальне населення в досліджених районах представлено в основному *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. natriegens*, *V. nereis*, *Pseudomonas nautica*, *P. stutzeri*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas veronii*, стійкі до свинцю - видами *Vibrio campbellii*, *V. harveyi*, *V. natriegens*, *V. nereis*, *Pseudomonas nautica*, *Enterobacter agglomerans*, резистентні до кадмію - видами *Vibrio harveyi*, *V. natriegens*, *V. nereis*, *Pseudomonas gelidicola*, *P. stutzeri*, *Enterobacter agglomerans*, а до ртуті - видами *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. marinus*, *V. natriegens*, *Pseudomonas nautica*, *Enterobacter agglomerans*. У досліджуваних районах моря не відзначалося великої видової різноманітності бактерій, що характерно для акваторій з високим антропогенним навантаженням і несприятливою екологічною ситуацією.

**Ключові слова:** гетеротрофні морські бактерії, таксономія, стійкість, іони  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , Чорне море