

На правах рукописи

КИМ Александра Вячеславовна

**ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА
ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ БАКТЕРИЙ АКВАТОРИЙ
ПРИМОРСКОГО КРАЯ**

1.5.15 - экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток, 2022

Работа выполнена на кафедре биоразнообразия и морских биоресурсов Школы естественных наук федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»

Научный кандидат биологических наук **Богатыренко Елена**
руководитель **Александровна**

Официальные **Кондратьева Любовь Михайловна**, доктор биологических
оппоненты наук, профессор, ФГБУН «Институт водных и экологических проблем Хабаровского федерального исследовательского центра» ДВО РАН, главный научный сотрудник лаборатории гидрологии и гидрогеологии

Борzych Олег Геннадьевич, кандидат биологических наук, ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» ДВО РАН, научный сотрудник лаборатории морской микробиоты

Ведущая ФГБОУ ВО "Дальневосточный государственный технический
организация рыбохозяйственный университет", г. Владивосток

Защита состоится «15» июня 2022 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.253.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН по адресу: 690022 г. Владивосток, пр. 100-летия Владивостока, 159.

Факс: (423) 2310-193. E-mail: info@biosoil.ru

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим направлять по адресу: 690022 г. Владивосток, пр. 100-летия Владивостока, 159, ученому секретарю диссертационного совета.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН и на сайте «Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН: <http://www.biosoil.ru/>

Автореферат разослан « » марта 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических
наук



Елена Михайловна Саенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Японское море входит в число наиболее продуктивных регионов Мирового океана за счет смешения холодных и теплых течений, а также муссонного климата, характеризуется уникальным разнообразием флоры и фауны, в том числе ценных для промысла видов рыб и гидробионтов (Дулепова и др., 2004). Вместе с этим, в прибрежных водах некоторых регионов отмечается высокая степень антропогенного воздействия, связанная с увеличением численности населения на побережье и активным вовлечением прибрежной полосы в сферу хозяйственной деятельности человека.

Среди районов российского побережья Японского моря особенно загрязненным считается Приморский край. На юге Приморского края находится один из крупнейших заливов Японского моря – залив Петра Великого (Доклад..., 2017), на берегу которого расположены два густонаселенных города – Владивосток и Находка (общая численность населения около 1 млн чел) (Галышева, 2009). Основными источниками загрязнения морских вод являются промышленные предприятия, коммунально-бытовые стоки, морские порты, торговый и военно-морской флот. В прибрежных акваториях залива Петра Великого наблюдается хроническое загрязнение широким спектром поллютантов, включая тяжелые металлы, нефть, нефтепродукты, ПАВ и т.п. (Огородникова, 2001; Доклад..., 2017). Тем не менее, отмечается, что уровень и характер антропогенной нагрузки на всей протяженности прибрежной полосы Приморского края не одинаков и встречаются морские участки с благоприятным состоянием среды (Галышева, 2009).

Поступление большого количества загрязняющих веществ в морские воды способно негативно влиять как на отдельные организмы, так и на структурно-функциональные показатели биоценозов (Израэль, Цыбань, 1989). Микроорганизмы являются одними из первых, кто реагирует на происходящие изменения в экосистеме в силу своих уникальных биохимических и генетических особенностей, и в зависимости от экологического состояния среды, способны вырабатывать различные адаптационные механизмы для выживания, связанные с изменением клеточных структур, активности ферментных систем и т.д. (Рощина, Петров, 1997).

На сегодняшний день, микробиоценозы Японского моря недостаточно изучены. В найденной нами литературе отсутствуют комплексные исследования о влиянии антропогенной нагрузки на таксономический состав и биологические свойства культивируемых бактерий.

Степень разработанности темы. Основные работы, посвященные изучению микроорганизмов Японского моря, сводятся к изучению механизмов адаптации к экстремальным условиям морских глубин (Bale et al. 1997; Nogi et al. 1998), описанию новых таксонов (Romanenko et al., 2012; Nedashkovskaya et al., 2014; Doi, Osawa, 2019) или уникальных физиолого-биохимических свойств

отдельных видов или штаммов бактерий (Михайлов и др., 2004; Chaerun et al., 2004; Romanenko и др., 2013). В работе Михайлова В.В. (2004) собран обширный материал о встречающихся в российских водах Японского моря таксонах бактерий, однако в ней не приводится связь между их распространением и экологическим состоянием акваторий.

В научных исследованиях по оценке состояния прибрежных вод Приморского края показано, что антропогенная нагрузка приводит к увеличению в среде общей численности гетеротрофных микроорганизмов и появлению санитарно-показательных, патогенных и условно-патогенных бактерий (Христофорова, 2012; Христофорова и др., 2012; Бойченко, 2019). Также, об уровне и характере антропогенного воздействия, по мнению некоторых авторов, можно судить по изменению численности отдельных индикаторных эколого-физиологических групп микроорганизмов (нефтеустойчивые, фенолустойчивые, металлорезистентные и т.п.) (Безвербная, 2005; Калитина 2006; Калитина и др., 2006; Бузолева, 2012а; Христофорова, и др., 2012). Однако, вопрос, как антропогенное загрязнение в целом влияет на видовую структуру культивируемых бактерий в микробных сообществах и физиолого-биохимические свойства отдельных видов остается открытым.

Помимо этого, эколого-эпидемиологические последствия изменений биологических свойств бактерий (морфологических, культуральных, физиолого-биохимических и генетических) под действием антропогенного загрязнения еще не до конца определены, но можно предположить, что эти изменения могут сопровождаться приобретением микроорганизмами признаков, представляющих опасность для гидробионтов, наземных организмов и человека (Secades, 2001). Данные о влиянии загрязнения морской среды на проявление патогенных свойств у сапротрофных микроорганизмов в научной литературе не были обнаружены. Однако, по сообщению ряда исследователей, различные абиотические факторы среды могут приводить к повышению вирулентности у патогенных бактерий (Баснакьян, 2003; Сомов, Бузолева, 2004; Бузолева и др., 2014а).

Цель работы: изучить влияние антропогенной нагрузки на таксономическое разнообразие и биологические свойства культивируемых бактерий, выделенных из поверхностных вод акваторий Приморского края с разной степенью загрязнения.

Для выполнения цели работы были поставлены следующие **задачи:**

1. Определить таксономический состав сообществ культивируемых бактерий, выделенных из акваторий с разной степенью антропогенной нагрузки;
2. Изучить способность к утилизации различных органических субстратов у культивируемых бактерий, выделенных из акваторий с разной степенью антропогенной нагрузки;
3. Исследовать факторы патогенности, вирулентность и антибиотикочувствительность у культивируемых бактерий, выделенных из акваторий с разной степенью антропогенной нагрузки.

Научная новизна. Впервые показано, что в загрязненных акваториях Приморского края таксономическое разнообразие культивируемых бактерий увеличивается за счет аллохтонной микробиоты. Впервые установлено, что под действием антропогенного загрязнения изменяются качественные и количественные показатели ферментативной активности культивируемых бактерий в отношении характерных для морской среды органических субстратов. Впервые показано, что у сапротрофных бактерий, выделенных из акваторий, испытывающих антропогенную нагрузку, усиливается вирулентность за счет синтеза факторов патогенности, а также появляется множественная устойчивость к лекарственным препаратам.

Теоретическая и практическая значимость. Антропогенное загрязнение как экологический фактор влияет на качественные и количественные изменения состава культивируемых бактерий в микробных сообществах, а также на их биологические свойства. При сравнительных исследованиях водных акваторий установлено, чем выше антропогенная нагрузка, тем больше доля бактерий в микробных сообществах с широким набором факторов патогенности и устойчивостью к различным противомикробным препаратам. Установлено, что дегидрогеназная активность культивируемых бактерий может быть использована для определения органического загрязнения морских акваторий в качестве дополнительного или альтернативного метода изучения экологического состояния водных объектов. Предложен состав сред для выявления ферментативной активности по отношению к субстратам, характерным для морских вод (хитин, хитозан, хитин-глюкановый комплекс, фукоидан, альгинат и клетчатка). Используемые в работе методики определения ферментативной активности, факторов патогенности, цитопатических свойств и вирулентности у сапротрофных культивируемых бактерий могут быть использованы для оценки экологического состояния морских акваторий. Результаты научной работы можно использовать в курсах лекций для программ бакалавриата, магистратуры и аспирантуры биологического направления по таким дисциплинам как «Экология», «Экология микроорганизмов», «Мониторинг и биоремедиация», «Морская микробиология», «Основы регуляции метаболизма микроорганизмов», «Физиология микроорганизмов», «Микробиология и вирусология», «Санитарная микробиология», «Большой практикум по микробиологии».

Положения, выносимые на защиту:

1. Антропогенное загрязнение приводит к увеличению таксономического разнообразия культивируемых бактерий в поверхностных водах акваторий Приморского края за счет аллохтонной микробиоты.

2. Антропогенное загрязнение прибрежных вод приводит как к уменьшению доли бактерий-деструкторов органических субстратов, характерных для морской среды (хитин и его производные, клетчатка, альгинат натрия, фукоидан), так и к снижению скорости утилизации бактериями этих соединений.

3. Антропогенное загрязнение морских прибрежных вод влияет на развитие у бактерий мультирезистентности к антибиотикам и усиливает их вирулентность за счет широкого набора факторов патогенности.

Степень достоверности результатов. Достоверность подтверждается воспроизводимостью полученных результатов при повторении условий экспериментов, использование в работе общепринятых методик и статистических методов. Все полученные в ходе работы данные исследования задокументированы и внесены в лабораторные журналы.

Обоснованность научных положений диссертационной работы подтверждается привлечением большого массива научных публикаций по исследуемой тематике, как отечественных, так и зарубежных авторов.

Апробация работы. Результаты научной работы были представлены на всероссийских и международных конференциях и симпозиуме: шестая международная Байкальская конференция, 7-12 сентября 2015 г. Иркутск; 4-й Микробиологический симпозиум с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах», 7-12 сентября 2015, г. Иркутск; International conferees Unique Marine Ecosystems: Modern Technologies of Exploration and Conservation for Future Generations, August 4-7, 2016, Vladivostok (международная конференция «Уникальные морские экосистемы: современные технологии исследования и сохранение будущих поколений, 4-7 августа, 2016, Владивосток); всероссийская научно-практическая конференция «Фундаментальная дальневосточная наука-медицине» посвященной 100-летию со дня рождения академика Г.П. Сомова, 11 октября, 2017, Владивосток; международная научно-практическая конференция «Системы контроля окружающей среды – 2019», 12-13 сентября, 2019 г. Севастополь; всероссийская научно-практическая конференция «Понт Эвксинский – 2019», 23-27 сентября, 2019, г. Севастополь.

Результаты исследования включены в отчеты гранта Российского научного фонда №14-50-00034 по теме: «Технологии мониторинга и рационального использования морских биологических ресурсов» по направлению № 5 «Современные технологии контроля различных типов антропогенного загрязнения водной среды и оценки их влияния на морские биологические ресурсы», 2017-2018 гг.

По теме диссертации опубликовано 14 работ, из них в журналах рекомендованных ВАК – 3, получено 3 свидетельства о государственной регистрации базы данных.

Структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, выводов, списка сокращений и обозначений, списка литературы (231, в том числе 156 отечественных и 75 зарубежных источников) и приложений. Работа изложена на 134 страницах, содержит 14 рисунков, 7 таблиц и 7 приложений.

Личный вклад. Диссертант принимал непосредственное участие в сборе материала, проведении экспериментов, обработке, обобщении и анализе

результатов исследования, формировании задач и формулировке выводов диссертации, а также в подготовке материалов к публикации.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность за постоянную помощь, внимание и поддержку при выполнении работы научным руководителям – д.б.н., профессору Бузолевой Любови Степановне и к.б.н. Богатыренко Елене Александровне, а также коллегам кафедры биоразнообразия и морских биоресурсов ШЕН ДВФУ вед. инж. Дункай Т.И., к.б.н. Сидоренко М.Л. Особую признательность автор выражает коллегам из НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова н.с. Пономаревой А.Л., м.н.с. Еськовой А.И., лаб.-исслед. Обуховой В.С. и Гомза Л.Н. за помощь в проведении экспериментов и конструктивную критику.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, определены основные положения диссертации, выносимые на защиту.

Глава 1 «Обзор литературы»

В главе 1 собраны данные отечественной и зарубежной литературы по влиянию абиотических, биотических факторов среды и антропогенного загрязнения на микробиоценозы в морской среде. Изучены литературные данные, связанные с загрязнением морских акваторий Приморского края. Собран материал о взаимосвязи между сапротрофными и патогенными микроорганизмами.

Глава 2 «Объекты и методы исследования»

Районы исследований включали акватории с разной антропогенной нагрузкой.

Б. Золотой Рог впадает в северный берег пролива Босфор Восточный, между мысом Тигровым и мысом Голдобина, с северо-запада бухта ограничена полуостровом Шкота. На побережье акватории располагается крупный населенный пункт г. Владивосток, морской порт, судоремонтные предприятия, нефтебаза, административные и складские помещения. Основными источниками органического загрязнения прибрежных вод бухты являются хозяйственно-бытовые и промышленные сточные воды, р. Объяснения, балластные и льяльные воды военного, транспортного и рыболовного флота (Гаврилевский и др., 1998; Огородникова, 2001).

Б. Находка располагается на западе залива Находка. На побережье бухты расположен г. Находка и морской порт. Основными источниками загрязнения залива и в том числе бухты Находка являются специализированный морской нефтеналивной порт Козьмино, отходы промышленных и коммунальных предприятий, суда и портовые сооружения, а также речные стоки (Галышева, 2009; Доклад..., 2017).

Зал. Восток находится в юго-восточной части зал. Петра Великого на западе омывает берег м. Пещурова, на востоке м. Подосёнова, открыт с юга.

Залив Восток испытывает небольшую антропогенную нагрузку, в том числе рекреационный пресс, особенно в летний период времени (Галышева, Христофорова, 2007; Христофорова и др., 2012). Не смотря на это, за счет интенсивной циркуляции вод и выносу загрязненных вод из акватории залива наблюдается восстановление экологического состояния, особенно в осенне-зимне-весеннее время (Христофорова и др., 2019).

Б. Киевка располагается в южной части побережья Приморья и прилегает к берегу между двумя мысами Суткового и Островной. Данная акватория представляется как фоновый район при сравнительной оценке экологического состояния акваторий, относится открытому типу, поэтому прослеживается проникновение в их пределы разнообразной фауны. На побережье отсутствуют крупные населенные пункты и промышленные предприятия (Галышева, Коженкова, 2006; Галышева и др., 2008).

Отбор и посев проб поверхностных вод. Материалом работы послужили образцы поверхностных вод, отобранных в б. Золотой Рог, б. Находка, б. Киевка и зал. Восток в июне-августе 2015 и 2016 гг. согласно ГОСТ 31942-12 (2013). Посев проб производили методом Дригальского (Герхард, 1983) на питательную среду для морских микроорганизмов (СММ) (Бузолева, 2012а). Полученные чистые культуры бактерий использовали для всех последующих опытов.

Идентификацию выделенных культивируемых бактерий проводили на основе морфологических, культуральных, физиолого-биохимических свойств (Берджи, 1980; The Prokariotes, 1992) с использованием API-стрипов фирмы BioMerieux (API 20 E, API 20 NE, API 50 CH, API Staph, API 20 Strep, API Listeria), а также анализа структуры их гена 16S рНК (праймеры 27F/1350R) (Денисова и др., 1999; Lane et al, 1985). С помощью программы NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) проводили поиск гомологичных последовательностей в GenBank (международном банке данных) (Altschul et al., 1997).

Дегидрогеназную активность чистых культур бактерий определяли тетразолиевым методом (Методические рекомендации..., 1978). Использовали в качестве тестируемого объекта суспензию суточных чистых культур бактерий (10^9 кл/мл).

Исследование способности бактерий разлагать различные органические субстраты. Для определения ферментативной активности использовали агаризованные среды, содержащие один из следующих субстратов: обезжиренное молоко, Твин (20, 60, 80), крахмал (Бузолева, 2012а). Инкубировали в течение 3-4 суток при температуре 25⁰С. О наличии протеолитической активности судили по появлению вокруг колоний зон гидролиза субстрата, а при определении липолитической активности отмечали появление помутнения вокруг колоний бактерий за счет образования кристаллов кальциевого мыла. Для выявления амилалитической активности в чашки с крахмальной средой добавляли раствор Люголя и отмечали появление

светлых колец вокруг колоний, свидетельствующих о наличии амилаз (Бузолева, 2012а).

Способность разлагать хитин, хитозан, клетчатку, фукоидан, альгинат натрия и хитин-глюкановый комплекс определяли путем высева суточных культур бактерий на созданные нами питательных средах. За основу была взята модифицированная минеральная среда Ворошиловой-Диановой (Ворошилова, Дианова, 1952). В качестве единственного источника углерода использовали соответствующий полисахарид в концентрации 1%. Для контроля параллельно высевали штаммы бактерий на минеральную среду без добавления органического субстрата. Инкубировали до 10 суток при комнатной температуре. Отмечали рост бактерий на среде с субстратом и отсутствие роста на голодной минеральной среде.

Для изучения *хитиназной активности* была проведена не только качественная, но и количественная оценка по выходу образующегося при гидролизе хитина N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) (Рысакова и др., 2006).

Для определения *адгезивности* бактерий использовали метод В. И. Бриллис (1986), основанный на способности микроорганизмов прикрепляется к поверхности клеток, в частности эритроцитах человека 0 (I) группы Rh (+) крови.

Определение гемолитической, плазмокоагуляционной и гиалуронидазной активностей. Плазмокоагуляционную активность определяли по образованию хлопьев через 5 минут после смешивания цитратной плазмы с суточной культурой бактерий (10^9 кл/мл). Гемолитическую активность определяли по образованию зоны гидролиза на кровяном агаре вокруг колоний бактерий (Лабинская, 2005). Гиалуронидазную активность определяли по свертыванию гиалуроновой кислоты, при добавлении к ней суточной бактериальной взвеси (10^9 кл/мл) и 15% уксусной кислоты, вызывающий свертывание гиалуроновой кислоты. Положительную реакцию учитывали при отсутствии коагулированного сгустка (Куяров, Сайгушева, 2012).

Определение цитопатических свойств. Для изучения способности бактерий проявлять цитопатические свойства была использована культура клеток зеленой мартышки (линия Vero E6) (Tan, et al., 2004). Готовили суспензию суточных культур бактерий в концентрации 10^9 кл/мл на среде СММ, далее методом последовательного десятикратного разведения доводили рабочие концентрации бактериальной взвеси от 10^9 до 10^4 кл/мл. Суспензии каждой концентрации клеток бактерий добавляли в монослой клеток Vero E6, инкубировали 3 суток при температуре 36°C . Через 24, 48 и 72 часа оценивали результат. Цитопатические свойства бактерий считали выраженными при наблюдении в поле зрения микроскопа дегенеративных изменений монослоя Vero E6.

Вирулентность определяли по показателю LD_{50} . Использовали суспензию суточных культур бактерий в концентрации 10^9 кл/мл, далее методом последовательного десятикратного разведения доводили концентрации бактериальной суспензии от 10^9 до 10^4 кл/мл и заражали по 5

мышей внутрибрюшинно (вводимая доза 0,5 мл). Наблюдали в течение 30 суток ежедневно, отмечая в протоколе опыта количество павших и живых животных. LD₅₀ рассчитывали по формуле Кербера (Лабинская и др., 2004; Тихонович, 2013).

Определение антибиотикочувствительности. Для определения антибиотикочувствительности бактерий использовали диско-диффузионный метод на среде АГВ (МУК 4.2. 1890-04, 2004). В работу были взяты 7 видов антибиотиков (карбеницилин, тетрациклин, ампициллин, цефотаксим, цiproфлоксацин, цефтозидим, цефоперазон) фирмы НИЦФ СПб. Выбранные антибиотики обладают активностью против грамотрицательных бактерий, в том числе и бактерий рода *Pseudomonas* (Страчунский, Козлов, 2002; Супотницкий, 2011).

Статистическая обработка данных. Для определения сходства между составами бактериальных сообществ акваторий Приморского края использовали расчеты кластерного расстояния на основе евклидовых дистанций (Воробьев и др., 2006). Для определения видового разнообразия бактериальных сообществ использовали расчет индекса α разнообразия Фишера (Fisher et al, 1943). Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Vegan (<https://github.com/vegandevs/vegan/issues>) в R v. 3.5.0 (<https://www.r-studio.com>). Значения уровней дегидрогеназной и хитиназной активностей бактерий, выделенных из разных акваторий Приморского края, сравнивали с помощью U-критерия Манна-Уитни (Гублер, Генкин, 1973). Медиану для значений дегидрогеназной и хитиназной активностей культивируемых бактерий рассчитывали в программе Microsoft Office Excel 2010.

Глава 3 «Таксономическое разнообразие культивируемых бактерий из поверхностных вод акваторий Приморского края с разной антропогенной нагрузкой»

В ходе работы из морской среды изолировано 259 штаммов бактерий относящихся к 33 родам, из них 78 штаммов - из б. Золотой Рог, 99 штаммов - б. Находка, 41 штамм - зал. Восток и 41 штамм - б. Киевка. В б. Золотой Рог все выделенные бактерии относились к 22 родам, в б. Находка - к 21, в б. Киевка - к 12 и зал. Восток - к 11.

Исследование таксономического разнообразия полученных чистых культур бактерий показало, что во всех акваториях встречались бактерии родов *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*. По литературным источникам известно, что представители данных таксономических групп являются типичными для морских вод и встречаются повсеместно (Малыгина, Кацев, 2003; Михайлов, 2004; Михайлов и др., 2004; Могильникова и др., 2009; Сулова и др., 2012; Семенов и др., 2014).

Несмотря на сходство состава автохтонной микробиоты в исследуемых районах, значения индекса α разнообразия Фишера были выше в загрязненных акваториях - 10,29 и 8,77 для б. Золотой Рог и б. Находка, соответственно. В то

время как для б. Киевка и зал. Восток индекс был равен 4,93 в обоих случаях. Подобные различия могут быть связаны с присутствием в загрязненных акваториях патогенных и условно-патогенных бактерий. Так, доля выделенных патогенных и условно-патогенных бактерий в б. Находка была равна 21,4%, б. Золотой Рог - 30%, а фоновых районах эти микроорганизмы не были обнаружены.

И из б. Золотой Рог и из б. Находка были выделены представители родов: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Yersinia*, *Pantoea*, *Proteus*, *Serratia*. Также, в б. Золотой Рог присутствовали патогенные и условно-патогенные бактерии родов *Salmonella*, *Enterobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus*, а в б. Находка - *Staphylococcus* и *Kocuria*.

Кластерный анализ показал, что акватории, испытывающие мощное антропогенное загрязнение наиболее схожи между собой по составу микробного сообщества, то же самое наблюдается и в акваториях с минимальным антропогенным прессом (рис. 1).

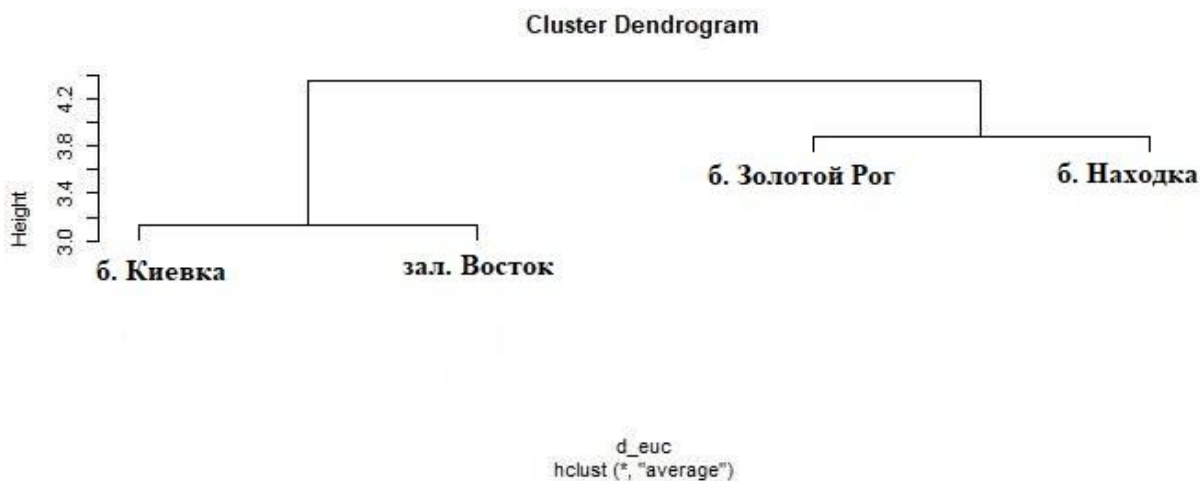


Рисунок 1 – Кластерная дендрограмма, характеризующая различия между составами культивируемых бактерий в микробных сообществах акваторий Приморского края

Глава 4 «Биохимические свойства культивируемых бактерий из поверхностных вод акваторий Приморского края с разной антропогенной нагрузкой»

Известно, что определение дегидрогеназной активности (ДГА) является одним из основных методов оценки экологического состояния (Тупин и др., 2010), т.к. позволяет в кратчайшие сроки определить происходящие изменения в окружающей среде за счет окислительных процессов. Ферменты дегидрогеназы относятся к классу оксидоредуктаз, катализирующих реакции, связанные с процессами дыхания, гликолиза и брожения, участвуют в переносе атомов водорода от субстрата-донора к акцептору. По величине показателя ДГА можно определить количество легкоокисляемого субстрата утилизируемого микроорганизмами в исследуемом экотопе (Кобелева, 2014).

В основном суммарное значение ДГА определяют в пробе почвы, сточных вод или ила (Тупин и др., 2010), при этом не учитывается состав и численность микроорганизмов, участвующих в окислительных процессах. В нашей работе определение ДГА использовали для выявления изменений активности ферментов дегидрогеназ у культивируемых бактерий под действием антропогенного загрязнения.

В работе были исследованы 95 штаммов бактерий, выделенных в 2015 году, из них 21 штамм из б. Золотой Рог, 27 - из б. Находка, 24 - из зал. Восток и 27 - из б. Киевка на наличие ДГА.

Интересно отметить, что большая доля бактерий с высокой ДГА была обнаружена в б. Золотой Рог и б. Находка (максимальные значения 8 и 6,8 усл.ед. соответственно). Для сравнения исследуемых акваторий между собой по ДГА культивируемых бактерий определяли значение медианы, которое равнялось 3 усл. ед. Согласно проведенным исследованиям, в загрязненных бухтах доля бактериальных штаммов со значениями ДГА выше 3 усл. ед. составила в б. Золотой Рог 71,4%, б. Находка- 85,2%, б. Киевка - 11,1%, в зал. Восток- 8,3%.

При анализе полученных данных с помощью критерия Манна-Уитни, не было выявлено статистически достоверных различий в значениях ДГА культивируемых бактерий, выделенных из б. Золотой Рог и б. Находка, что может указывать на схожие уровни активности ферментов дегидрогеназ у гетеротрофных бактерий в загрязненных районах. Похожие результаты получили при сравнении значений ДГА бактерий, выделенных из условно чистых акваторий.

При оценке различий между культивируемыми бактериями, выделенными из загрязненных акваторий (б. Золотой Рог и б. Находка) и из условно чистых (б. Киевка и зал. Восток) по ДГА, выявлено, что U-критерий находится в зоне значимости, следовательно, можно говорить о статистически достоверном различии в активности дегидрогеназ между бактериями, выделенными из акваторий, обремененных антропогенной нагрузкой и бактериями из условно чистых районов.

Очевидно, что поступление в воды б. Золотой Рог и б. Находка большого количества органических соединений с коммунально-бытовыми, промышленными и речными стоками приводит к усилению активности ферментов дегидрогеназ у гетеротрофных бактерий. Учитывая полученные результаты, тест на ДГА отдельных штаммов бактерий может быть использован для определения уровня органического загрязнения в качестве альтернативы химическим методам.

На следующем этапе проводили качественную оценку амилолитической, протеолитической и липолитической активностей исследуемых бактерий. Данный подход нередко используют для определения уровня антропогенного воздействия на морскую среду (Израэль, Цыбань, 1981; Дмитриева, 1999б, 1999в; Калитина, 2006; Калитина и др., 2006).

В нашей работе было установлено, что частота встречаемости у бактерий амилолитической и протеолитической активности в загрязненных и фоновых районах практически не отличалась между собой. Например, доля бактерий, выделенных из бухт Золотой Рог и Находка, обладающих протеолитической активностью составила 51% и 37%, амилолитической 37% и 41% соответственно. А в б. Киевка доля бактерий с протеолитической активностью составила 41%, с амилолитической – 37%, в зал. Восток – 46% и 41% соответственно.

Как известно, многие микроорганизмы могут синтезировать ферменты амилазы и протеазы в присутствии легкоразлагаемых соединений (Димитриева, 1999б). Данные органические субстраты постоянно присутствуют в морской воде за счет естественных процессов жизнедеятельности морских организмов и терригенных стоков в условно чистых районах. Дополнительно они могут поступать вместе с коммунально-бытовыми и промышленными сбросами в районах с антропогенной нагрузкой. В этом случае сложно разграничить между собой природные и антропогенные источники поступления органических веществ. Вероятно, поэтому частота встречаемости амилолитической и протеолитической активностей у микроорганизмов из разных акваторий практически не отличалась.

Доля бактерий с липолитической активностью составила в загрязненных районах б. Золотой Рог до 80%, в б. Находка до 45%, в то время как в условно чистых акваториях б. Киевка до 19% и зал. Восток до 17%. Природными источниками липидов могут быть останки мертвых животных и растений. Однако основной вклад в поступление липидов в морскую среду вносят коммунально-бытовые и промышленные стоки, а также аварийные разливы нефти и нефтепродуктов (Цыбань, Теплинская, 1982; Теплинская, 1990; Киреева, 2006). Учитывая, существенное загрязнение б. Золотой Рог и б. Находка нефтяными углеводородами (Доклад..., 2017), становятся вполне объяснимы полученные нами результаты по липолитической активности культивируемых бактерий.

Поскольку по результатам исследований не выявлено различия по амилолитической и протеолитической активности у культивируемых бактерий, выделенных из загрязненных и условно чистых акваторий. То было сделано предположение, что под действием антропогенной нагрузки, возможно, будет изменяться активность других ферментов по отношению к субстратам характерным морским водам.

Для этого нами были созданы специальные питательные среды, содержащие в качестве единственного источника углерода органические субстраты, типичные для морских акваторий, такие как хитин и его производные, клетчатка, фукоидан, альгинат натрия (рис. 2 А, Б).

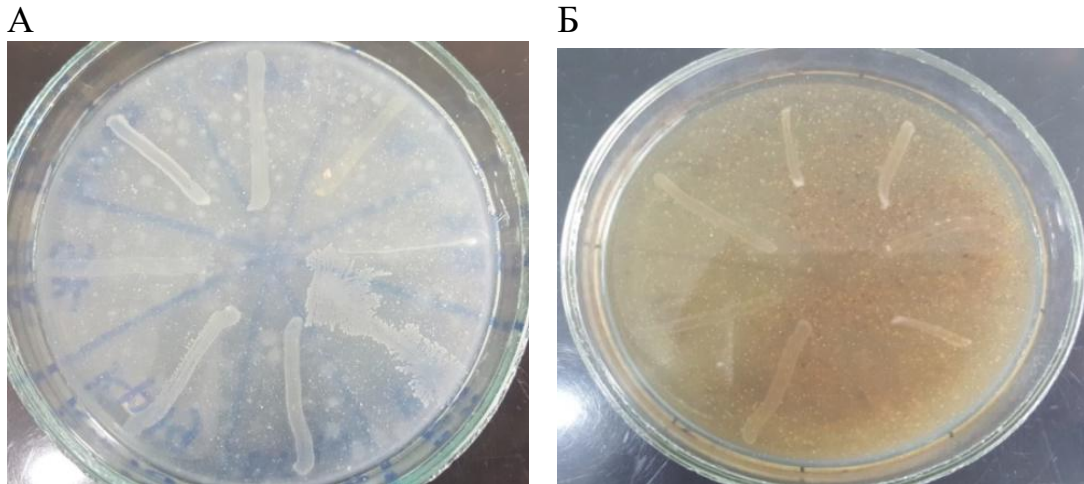


Рисунок – 2 Рост штаммов бактерий на минеральной среде с добавлением в качестве единственного источника углерода: А – хитозан; Б – клетчатка

Установлено, что в условно чистых акваториях доля бактерий, способных к деструкции хитина, хитозана, ХГК, фукоидана, клетчатки и альгинат натрия выше по сравнению с загрязненными районами в среднем на 15-20% (рис. 3). В основном ферментативная активность к этим субстратам выявлена у представителей автохтонной микрофлоры, например у бактерий рода *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Chryseobacterium* и редко встречалась у условно-патогенных и патогенных бактерий.

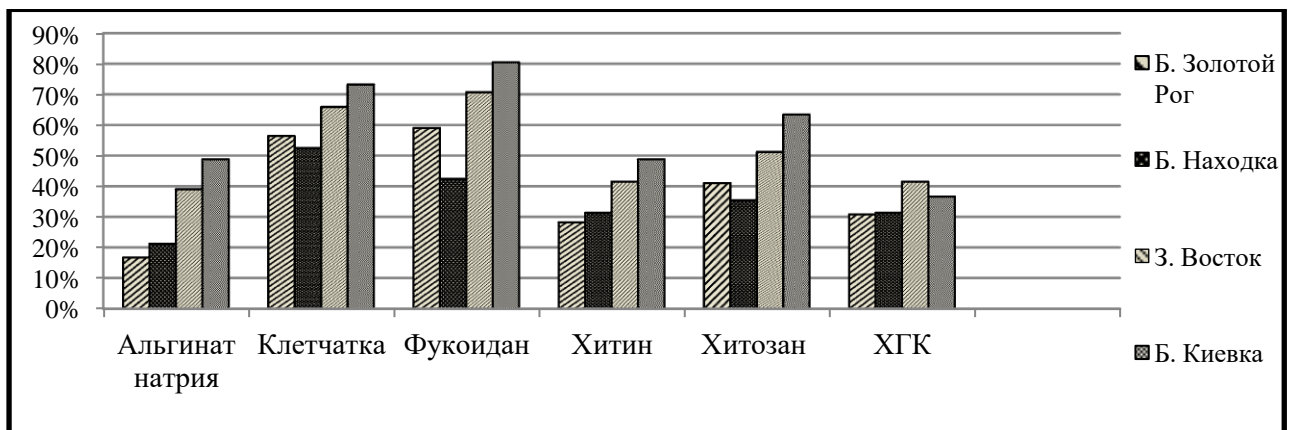


Рисунок 3 - Доля бактериальных штаммов, обладающих ферментативной активностью по отношению к хитину, хитозану, ХГК ракообразных, фукоидану, альгинату натрия и клетчатке бурых водорослей

Интересно отметить, что рост культур бактерий, выделенных из условно чистых районов, отмечали на 3-4 сутки культивирования, в то время как из акваторий с высокой антропогенной нагрузкой только на 7-8. Вероятно всего, у бактерий, выделенных из загрязненных районов, это связано с удлинением лаг-фазы при переходе к утилизации более сложных органических соединений (Готтшалк, 1982).

Учитывая, что антропогенное загрязнение может влиять не только на скорость роста бактерий на определенных субстратах, но и на значения ферментативной активности, была проведена количественная оценка активности хитиназы. В работу были взяты все штаммы бактерий, выросшие на минеральной среде с добавлением в качестве единственного источника углерода хитин. Всего исследовано 94 штамма бактерий: из б. Золотой Рог - 25, б. Находка - 31, зал. Восток - 17, б. Киевка - 21.

Показано, что доля штаммов бактерий обладающих хитиназной активностью со значением медианы равной 4 Е/г и выше составила в б. Киевка- 71%, зал. Восток - 59%, б. Находка - 42%, б. Золотой Рог - 20%.

При анализе полученных данных с помощью критерия Манна-Уитни не выявлено статистически достоверных различий в значениях хитиназной активности культивируемых бактерий, выделенных из б. Золотой Рог и б. Находка, что может указывать на схожие уровни активности хитиназ у гетеротрофных бактерий в загрязненных районах. Похожие результаты получились при сравнении значений хитиназной активности бактерий, выделенных из условно чистых акваторий.

Значения U-критерий находились в зоне значимости при сравнении хитиназной активности бактерий, выделенных из акваторий с антропогенной нагрузкой б. Золотой Рог и б. Находка с условно чистыми районами б. Киевка и зал. Восток. Таким образом, загрязнение приводит к снижению активности хитиназ у гетеротрофных бактерий.

Следовательно, можно сделать вывод, что под действием антропогенного загрязнения снижается частота проявления ферментативной активности у культивируемых бактерий по отношению к субстратам, характерным для морской среды, а также скорость утилизации бактериями этих субстратов.

Глава 5 «Факторы патогенности, вирулентность и антибиотикочувствительность бактерий, выделенных из поверхностных вод акваторий Приморского края с разной антропогенной нагрузкой»

По литературным данным, известно, что различные факторы среды (температура, рН, соленость и т.д.) могут влиять на изменение патогенного потенциала у возбудителей сапрозоонозов (Баснакьян, 2003; Сомов, Бузолева, 2004). При этом, установлено, что наличие в среде загрязняющих веществ, таких как тяжелые металлы, также оказывают стимулирующее, либо угнетающее действие на факторы вирулентности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (Бузолева и др., 2014а).

Исходя из предположения, что под действием антропогенного загрязнения сапротрофные микроорганизмы могут изменять свои биологические свойства, в частности, патогенный потенциал, были проведены исследования по выявлению у полученных нами бактерий способности к адгезии, синтезу плазмокоагулазы, гиалуронидазы, гемолизина, цитотоксинов, а также вирулентности и устойчивости к антибиотикам.

Исследования показали, что доля высоко- и среднеадгезивных штаммов бактерий была выше в б. Находка и б. Золотой Рог по сравнению с условно чистыми акваториями (рис. 4). В зал. Восток высокоадгезивные бактерии не обнаружены.

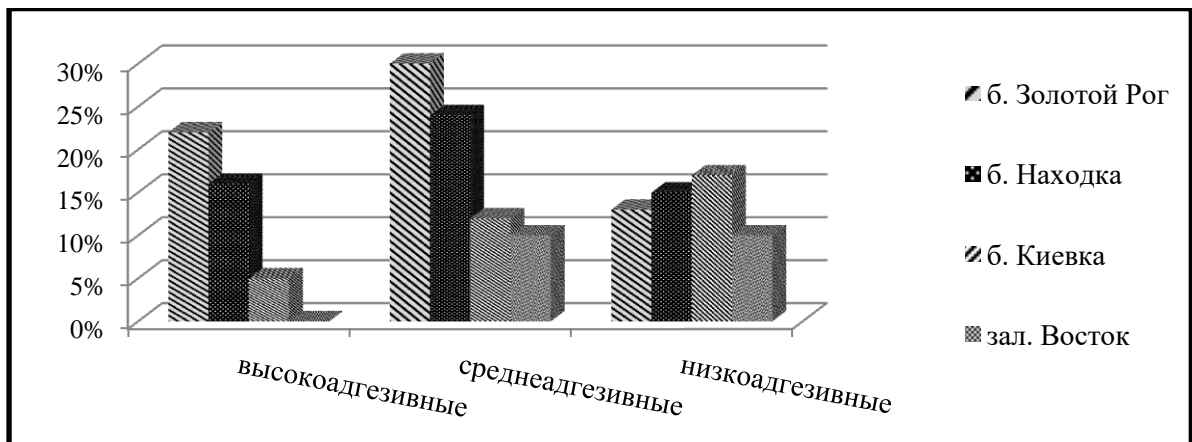


Рисунок 4 – Сравнительная характеристика адгезивности гетеротрофных бактерий, выделенных из акваторий с разной степенью антропогенного пресса

Доля бактериальных штаммов с плазмокоагулазной и гиалуронидазной активностями была также выше в б. Золотой Рог и б. Находка по сравнению с фоновыми районами. А гемолитическая активность обнаружена только у штаммов бактерий, выделенных из загрязненных акваторий (рис. 5).

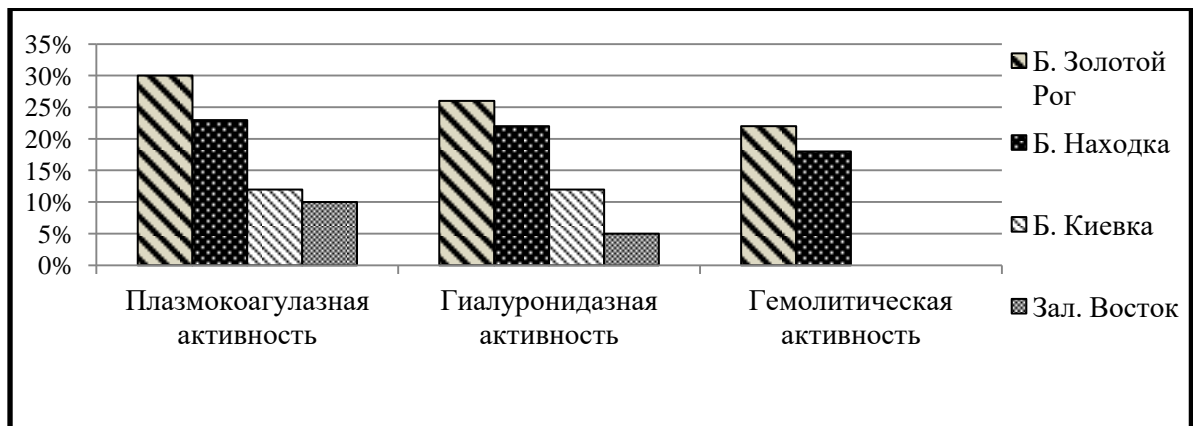


Рисунок 5 – Сравнительная характеристика гемолитической, плазмокоагулазной и гиалуронидазной активности гетеротрофных бактерий, выделенных из акваторий с разной антропогенной нагрузкой

Для подтверждения гипотезы о влиянии антропогенного загрязнения проводили исследования на проявление цитопатических свойств, вирулентность и антибиотикочувствительность у бактерий рода *Pseudomonas*, которые встречались во всех исследуемых акваториях и по численности являлись одними из доминирующих групп микроорганизмов.

Всего было взято в работу 19 штаммов бактерий, относящихся к роду *Pseudomonas*, 9 - из б. Киевка, и 10 - из б. Золотой Рог.

Как видно из таблицы 1 значительный цитопатический эффект наблюдали у штаммов бактерий, выделенных из б. Золотой Рог. 80% штаммов *Pseudomonas*, выделенных из б. Золотой Рог разрушали клетки монослоя при разведении культуры бактерий до 10^4 кл/мл. При этом штаммы из б. Киевка слабо разрушали клетки монослоя при разведении культуры до 10^7 кл/мл, и практически не наблюдали цитопатического действия при последующих разведениях культуры этих бактерий (таб. 1, рис. 6).

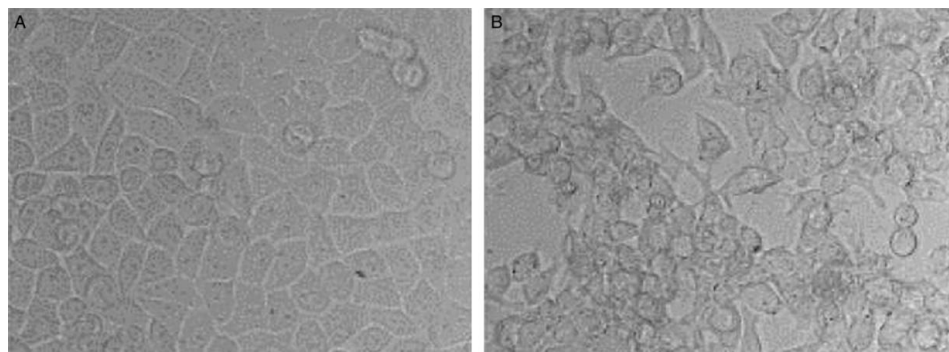


Рисунок 6 – Разрушение клеток монослоя под микроскопом: А) не разрушенный; В) разрушенный

Таблица 1 – Оценка цитопатических свойств бактерий рода *Pseudomonas*

Бактерии рода <i>Pseudomonas</i>	Разведение, кл/мл					
	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4
Б. Киевка						
<i>Ps. putida</i> 1К	+					
<i>Ps. psychrophila</i> 2 К	+	+	+			
<i>Ps. putida</i> 3 К	+					
<i>Ps. putida</i> 4 К	+	+				
<i>Ps. putida</i> 5 К	+	+	+			
<i>Ps. panacis</i> 6 К	+	+				
<i>Ps. stutzeri</i> 7 К	+	+				
<i>Ps. azotoformans</i> 8 К	+	+				
<i>Ps. psychrophila</i> 9 К	+	+				
Б. Золотой Рог						
<i>Ps. psychrophila</i> 1 ЗР	+	+	+			
<i>Ps. putida</i> 2 ЗР	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. putida</i> 3 ЗР	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. fluorescence</i> 4 ЗР	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. azotoformans</i> 5 ЗР	+	+	+	+		
<i>Ps. fluorescence</i> 6 ЗР	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. fluorescence</i> 7 ЗР	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. fluorescence</i> 8 ЗР	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. fluorescence</i> 9 ЗР	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. fluorescence</i> 10 ЗР	+	+	+	+	+	+

Примечание: “+” - разрушение клеток, “-” отсутствие разрушения

Штаммы бактерий с выраженными факторами патогенности были проверены на вирулентность, т.е. определена степень патогенного потенциала исследуемых бактерий (LD_{50}) на беспородных белых мышах (табл. 2).

Таблица 2 – Определение вирулентности у бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из районов с разной антропогенной нагрузкой

Место выделени я	№ Штамма	Заража ющая доза кл/мл	Всего заражен ных объекто в	Период инкубации, сутки						% летальнос ти
				1	2	5	10	15	20	
				Количество выживших животных						
Б. Золотой Рог	<i>Pseudomonas putida</i> 2 ЗР	10^9	5	5	2	2	2	2	2	60%
		10^7	5	5	5	5	5	5	5	0%
		10^5	5	5	5	5	5	5	5	0%
		10^3	5	5	5	5	5	5	5	0%
		10^1	5	5	5	5	5	5	5	0%
	<i>Pseudomonas fluorescence</i> 6 ЗР	10^9	5	5	3	3	3	3	3	40%
		10^7	5	5	5	5	5	5	5	0%
		10^5	5	5	5	4	4	4	4	20%
		10^3	5	5	5	4	4	4	4	20%
		10^1	5	5	5	5	5	5	5	0%
Б. Киевка	<i>Pseudomonas putida</i> 5 К	10^9	5	5	5	5	5	5	5	0%
		10^7	5	5	5	5	5	5	5	0%
		10^5	5	5	5	5	5	5	5	0%
		10^3	5	5	5	5	5	5	5	0%
		10^1	5	5	5	5	5	5	5	0%
	<i>Pseudomonas psychrophila</i> 2 К	10^9	5	5	5	5	5	5	5	0%
		10^7	5	5	5	5	5	5	5	0%
		10^5	5	5	5	5	5	5	5	0%
		10^3	5	5	5	5	5	5	5	0%
		10^1	5	5	5	5	5	5	5	0%
	Контроль		5	5	5	5	5	5	5	0%

В результате эксперимента выявлено, что у штаммов из б. Золотой Рог *Pseudomonas putida* 2 ЗР $LD_{50} = 6,3 \times 10^8 \pm 0,55$ кл/мл, а у штамма *Pseudomonas fluorescence* 6 ЗР $LD_{50} = 6,3 \times 10^7 \pm 0,53$ кл/мл. Штаммы, выделенные из б. Киевка были авирулентны.

При исследовании антибиотикочувствительности бактерий оказалось, что наибольшее подавление роста бактериальных клеток отмечено при использовании ципрофлоксацина и цефоперазона как в б. Золотой Рог так и в б. Киевка.

60% (6 штаммов) бактерий из б. Золотой Рог показали устойчивость ко всем антибиотикам, взятым в работу, при этом 20 % (2 штамма) бактерий были устойчивы к более 5 из 7 антибиотикам. По литературным данным известно, что в районах активно используемых в хозяйственной деятельности и принимающих наибольшее количество загрязняющих веществ, появляются устойчивые формы микроорганизмов к антибактериальным веществам за счет

накопления и распространения плазмид, несущих гены устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам, которые могут передаваться от одних бактерий другим (Burton et al., 1982; Tenover, 2006).

Среди бактерий, выделенных из б. Киевка, только 22,2% (2 штамма) проявляли устойчивость ко всем используемым антибиотикам, большая же часть были чувствительны практически ко всем антимикробным препаратам. В природе антибиотики синтезируются некоторыми микроорганизмами и служат естественным средством межвидовой борьбы у них, поэтому бактерии могут приобретать устойчивость к их действию, следовательно, не большой процент штаммов устойчивых к антимикробным препаратам в условно чистых акваториях вполне объясним (Абдуллин и др., 1997).

Полученные данные по цитопатической активности, LD_{50} и антибиотикочувствительности также подтверждают гипотезу о влиянии различных факторов среды, в том числе и антропогенного загрязнения на усиление патогенного потенциала у бактерий.

Кроме того, согласно данным литературы, в водах б. Золотой Рог высока численность бактерий, устойчивых к тяжелым металлам (Безвербная и др., 2005), а металлоустойчивость у бактерий часто связана с антибиотикорезистентностью, что может быть обусловлено присутствием в бактериальной клетке одних и тех же плазмид, где локализованы соответствующие гены (Alonso et al, 2001).

Очевидно, что постоянное длительное биологическое загрязнение микроорганизмами, которые поступают в б. Золотой Рог и б. Находка различными стоками, может быть причиной приобретения сапротрофными бактериями тех или иных факторов патогенности. В основе этих процессов лежат закономерности функционирования генов патогенности, мутации, а также перенос генов между микроорганизмами одного или разных видов. Учитывая, что гены, ответственные за патогенные свойства, часто собраны в островки патогенности (Juhas et al., 2009) или локализованы в плазмидах (Tor et al., 2000), можно предположить, что они могут мигрировать в клетки сапротрофных бактерий. Кроме того, не исключена возможность влияния поллютантов (нефтеуглеводородов, фенолов, тяжелых металлов) как стрессовых факторов, являющихся причиной не только фенотипической модификационной изменчивости, но и генетических изменений (Цыбань и др., 2000; Иванов, Егоров, 2007).

Таким образом, бактерии под влиянием антропогенного загрязнения способны изменять свои биологические свойства в сторону повышения патогенного потенциала. Загрязнение морской среды приводит к проявлению и появлению агрессивных свойств у бактерий, в качестве ответной реакции на воздействие стрессового фактора. Полученные результаты имеют как общебиологическое, так и важное эколого-эпидемиологическое значение.

ВЫВОДЫ

1. Из прибрежных вод Приморского края было выделено и таксономически охарактеризовано 259 штаммов бактерий, из них 78 штаммов – из б. Золотой Рог, 99 штаммов – б. Находка, 41 штамм – зал. Восток и 41 штамм – б. Киевка.

2. Таксономическое разнообразие и частота выделения культивируемых бактерий из акваторий с хроническим антропогенным загрязнением оказались выше, чем в фоновых районах, за счет патогенной и условно-патогенной микробиоты. Кластерный анализ выявил наибольшее сходство бактериальных сообществ между б. Золотой Рог и б. Находка, а также б. Киевка и зал. Восток.

3. Впервые показано, что антропогенная нагрузка не влияет на частоту выявления у культивируемых бактерий амилолитической и протеолитической активностей. Частота выявления липаз у бактерий, выделенных из загрязненных акваторий, была выше (до 80%), чем из фоновых (до 19%), что указывает на значительное влияние техногенного загрязнения морской среды на изменение биологических свойств бактерий. Значения ДГА у бактерий из б. Золотой Рог и б. Находка были также достоверно выше, чем у бактерий из б. Киевка и зал. Восток.

4. Установлено, что доля штаммов бактерий, проявивших способность к разложению хитина, хитозана, ХГК, фукоидана, альгинат натрия и клетчатки в б. Находка и б. Золотой Рог была существенно меньше, чем в б. Киевка и зал. Восток. Для бактерий, выделенных из загрязненных акваторий, отмечалось замедление роста на питательных средах со специфическими субстратами и более низкие количественные значения хитиназной активности по сравнению с бактериями из условно чистых районов.

5. Доказано, что штаммы бактерий из акваторий с хроническим антропогенным загрязнением, чаще проявляли высокую адгезивность и обладали плазмокоагуляционной, гиалуронидазной и гемолитической активностями, чем штаммы из условно чистых районов.

6. Впервые показано, что вирулентностью и устойчивостью к широкому спектру антимикробных соединений обладали штаммы бактерий рода *Pseudomonas* только из акватории с существенной антропогенной нагрузкой.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК:

1. Бузолева, Л.С. Влияние антропогенного загрязнения на проявление патогенных свойств у морских псевдомонад / Л.С. Бузолева, А.В. Ким, Е.А. Богатыренко // Современные проблемы науки и образования [Электронный ресурс]. – 2015. – № 5. – Режим доступа: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22330>.

2. Бузолева, Л.С. Проявление патогенных свойств у морских бактерий под влиянием антропогенного загрязнения / Л.С. Бузолева, А.В. Ким, Г.Г.

Компанец, Е.А. Богатыренко // Экология человека. – Архангельск: Северный государственный медицинский университет. – 2016. – № 3. – С. 30–36.

3. Голозубова, Ю.С. Разнообразие культивируемых гетеротрофных бактерий, выделенных из поверхностных вод бухты Восток Японского моря / Ю.С. Голозубова, Л.С. Бузолева, Е.А. Богатыренко, **А.В. Ким**, А.И. Еськова // Самарский научный вестник. – Самара: СГСПУ. – 2017. – Т. 6, № 4 (21). – С. 32–35.

Статьи, опубликованные в изданиях, включенных в базу Scopus:

4. Бузолева, Л.С. Таксономический состав и эколого-трофическая структура бактериальных сообществ прибрежных акваторий Японского моря с разной антропогенной нагрузкой / Л.С. Бузолева, Е.А. Богатыренко, А.И. Еськова, **А.В. Ким**, Ю.С. Голозубова // Гидробиологический журнал. – 2016. – Т. 52. – № 4. – С. 72–81.

Работы, опубликованные в материалах международных, всероссийских конференций и симпозиуме:

5. Бузолева, Л.С. Характеристика таксономического состава и гидролитических свойств морских бактерий из акваторий с разной антропогенной нагрузкой / Л.С. Бузолева, Е. А. Богатыренко, **А.В. Ким**, Ю.С. Голозубова, А.И. Еськова, Е.С. Долматова // Материалы 4-й микробиологического симпозиума с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах». – Иркутск. – 2015. – С. 256–257.

6. **Ким, А.В.** Микробиологические методы оценки экологического состояния морских акваторий / А.В. Ким, Е.С. Долматова, А.И. Еськова, Л.С. Бузолева, Ю.С. Голозубова // Материалы Шестой Международной Байкальской конференции.- Иркутск: изд-во «Аспринт». – 2015. – С. 118–120.

7. Golozubova, Y.S. Microbiological biodiversity of surface seawater with different anthropogenic stress / Y.S. Golozubova, L.S. Buzoleva, A.I. Eskova, **A.V. Kim**, E.A. Bogatyrenko // Unique Marine Ecosystems: Modern Technologies of Exploration and Conservation for Future Generations.- Vladivostok: Far Eastern federal univ. – 2016. – P. 125.

8. **Ким, А.В.** Сравнительная характеристика биологических свойств микроорганизмов, выделенных из морских акваторий с разной антропогенной нагрузкой / А.В. Ким, Л.С. Бузолева, Е.А. Богатыренко // Материалы Научно-практической конференции «Фундаментальная дальневосточная наука-медицине» посвященной 100-летию со дня рождения академика Г.П. Сомова. – Владивосток: Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2017. – С. 41–44.

9. Богатыренко, Е.А. Оценка и контроль антропогенного загрязнения Японского моря на основе анализа таксономической структуры бактериоценозов / Е.А. Богатыренко, **А.В. Ким**, Т.И. Дункай, А.И. Еськова // Материалы Международной научно-практической конференции «Системы контроля окружающей среды – 2019». – Севастополь: ИПТС, 2019. – С. 97.

10. **Ким, А.В.** Мониторинг антропогенного загрязнения Японского моря на основе изучения биологических свойств бактериальных сообществ / А.В.

Ким, Е.А. Богатыренко, А.И. Еськова, Т.И. Дункай // Материалы Международной научно-практической конференции «Системы контроля окружающей среды – 2019». – Севастополь: ИПТС, 2019. – С. 98.

11. Богатыренко, Е.А. Исследование влияния антропогенного загрязнения Японского моря на основе изучения биологических свойств бактериальных сообществ / Е.А. Богатыренко, **А.В. Ким**, Т.И. Дункай, А.И. Еськова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Понт Эвксинский – 2019». – Севастополь: ИнБЮМ, 2019. – С. 113–114.

Свидетельства о государственной регистрации базы данных

12. Свидетельство о государственной регистрации базы данных для ЭВМ 2015620483 Российская Федерация. Характеристика штаммов псевдомонад, выделенных из морской воды прибрежных зон Японского моря / Л.С. Бузолева, **А.В. Ким**, Ю.С. Голозубова; заявитель и правообладатель ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет». - № 2014621781; заявл. 15.12.14; опубл. 16.03.2015 - 1 с.

13. Свидетельство о государственной регистрации базы данных для ЭВМ 2015621755 Российская Федерация. Характеристика штаммов морских бактерий, выделенных из прибрежных вод г. Владивостока / Л.С. Бузолева, **А.В. Ким**, Ю.С. Голозубова; заявитель и правообладатель ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет». - № 2015621311; заявл. 23.10.2015; опубл. 09.12.2015 - 1 с.

14. Свидетельство о государственной регистрации базы данных для ЭВМ 2016621429 Российская Федерация. Таксономическая характеристика и некоторые физиолого-биохимические свойства культивируемых гетеротрофов, выделенных из акваторий с разной антропогенной нагрузкой / Л.С. Бузолева, **А.В. Ким**, А.И. Еськова, Е.А. Богатыренко; заявитель и правообладатель ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет». - № 2016621170; заявл. 29.08.2016; опубл. 24.10.2016 - 1 с.