

# МИКРОБИОТА ВОДНОЙ ЭКОСИСТЕМЫ И БИОЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ<sup>1</sup>

## MICROBIOTA OF AQUATIC ECOSYSTEM AND BIOCIDAL ACTIVITY OF ISOLATES<sup>2</sup>

**L. Grigoryan  
V. Rusaeva  
Yu. Plotitsyna  
A. Rusakov**

*Summary.* During the study, water samples from the Enotaevka River were taken and their physical and chemical parameters were determined. The research showed that the actual data of natural water analyses do not exceed hygienic standards. The microbiological composition of the studied samples was established and seven pure cultures of bacterial isolates of the aquatic ecosystem were obtained. Studying the qualitative composition of microorganisms will improve the efficiency of purification and decontamination of natural waters.

*Keywords:* aquatic ecosystem, natural waters, water microflora, bacterial isolates, biocidal activity.

**Григорян Лилит Норайровна**

Кандидат биологических наук, доцент, Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева  
lilyagrigoryan90@mail.ru

**Русаева Валерия Рустамовна**

Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева  
rusaevavaleria@gmail.com

**Плотицына Юлия Андреевна**

Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева  
plotitsyna01@bk.ru

**Русаков Александр Вячеславович**

Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева  
bumbiro-schepard@mail.ru

*Аннотация.* В процессе исследования был проведен отбор образцов воды из реки Енотаевка и определены их физико-химические параметры. Исследования показали, что фактические данные анализов природной воды не превышают гигиенические нормативы. Установлен микробиологический состав исследуемых образцов и получено семь чистых культур бактериальных изолятов водной экосистемы. Изучение качественного состава микроорганизмов позволит повысить эффективность очистки и обезвреживания природных вод.

*Ключевые слова:* водная экосистема, природные воды, микрофлора воды, изоляты бактерий, биоцидная активность.

### Введение

Водные экосистемы — это водная среда, в которой биотические компоненты взаимодействуют с абиотическими компонентами водной экосистемы. Водные экосистемы относятся к числу наиболее разнообразных и динамичных сред на Земле, в которых обитает огромное количество биологических объектов, играющих важную роль в поддержании экологического баланса [5]. Микробиота природных вод отличается большим разнообразием и сложностью и включает бактерии, археи, грибы, простейшие и вирусы. Микробное сообщество является важным компонентом водных экосистем. Они взаимодействуют друг с другом и окружающей средой, образуя сложные сети, и влияют на стабильность экосистемы, играя важную роль, начиная от биодеградации и трансформации круговорота питательных веществ в органическом веществе и заканчивая регулированием качества воды посредством самоочищения водоемов [8].

Понимание состава и активности микробных сообществ в водной среде имеет решающее значение для оценки их экологического состояния и выявления потенциальных угроз качеству воды. Традиционных методов исследования часто бывает недостаточно, но современные методы, такие как секвенирование ДНК [7], выделение микроорганизмов и метагеномика, произвели революцию в изучении водной микробиоты и обнаружении загрязняющих веществ.

Водные экосистемы являются основными поглотителями загрязняющих веществ, и одной из основных проблем водных экосистем является воздействие антропогенной деятельности, такой как урбанизация, неразборчивое удаление отходов, индустриализация и сельскохозяйственная деятельность, которые могут привести к загрязнению водных объектов загрязняющими веществами, включая тяжёлые металлы, органические соединения и другие токсичные вещества [11].

<sup>1</sup> Исследование выполнено при поддержке Программы развития Астраханского государственного университета (Приоритет-2030).

<sup>2</sup> This research was supported by the Astrakhan State University Development Program (Priority-2030) ».

Это приводит к ухудшению качества воды, нарушению микробного баланса, распространению инфекционных заболеваний, размножению вредных микробов и утрате биологического разнообразия [4, 12].

Одним из многообещающих подходов к решению проблемы загрязнения воды является применение растворов на основе микроорганизмов для удаления загрязняющих веществ, улучшения качества воды и борьбы с популяциями вредных микроорганизмов. Было показано, что некоторые штаммы бактерий разлагают органические загрязнители, такие как нефтяные углеводороды [14]. Другие штаммы, такие как *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus* и *Micrococcus sp.*, используются для биоремедиации тяжёлых металлов [13].

Таким образом, изучение микробиоты водных экосистем имеет важное значение для мониторинга изменений окружающей среды, прогнозирования воздействия загрязняющих веществ и разработки стратегий устойчивого управления водными ресурсами [2].

#### Роль микробных изолятов в происхождении водных экосистем

Выделение отдельных штаммов микроорганизмов из их естественной среды обитания и других загрязняющих веществ с целью изучения и получения представления о функциональных ролях микроорганизмов в их экосистеме является основной мотивацией для создания микробных изолятов. Микробные изоляты позволяют изучать различные биологические и биохимические особенности, в том числе устойчивость к противомикробным препаратам, азотфиксацию, условия, способствующие нормальному росту (специфическая температура, pH, влажность, интенсивность освещения), патогенность, взаимоотношения с другими организмами из той же экосистемы (мутуализм, паразитизм, комменсализм), синтез ферментов, реакция на загрязняющие вещества, присутствие минералов.

Исследования показали, что микробные изоляты могут быть подвергнуты скринингу на биоцидную активность, которая представляет собой способность микроорганизма контролировать рост других микроорганизмов. Микроорганизмы, обладающие биоцидной активностью, играют очень важную роль в поддержании качества воды, поскольку они помогают поддерживать экологический баланс и контролировать популяцию патогенных микробов, это снижает распространение заболеваний и улучшает здоровье водных организмов

Исследования, связанные с микробными изолятами и консорциумами, на протяжении многих лет привлекали большое внимание ввиду их прикладного потенциала в области биотехнологического и экологического менеджмента. Азотфиксирующие бактерии, к которым относятся и цианобактерии, используются в водных

и наземных экосистемах для фиксации и связывания углерода. Кроме того, они применяются при очистке сточных вод, в биохимическом производстве, которое включает биоудобрения, биотопливо и производство кормов для скота [9]. Также выявление микробных изолятов, обладающих биоцидной активностью, может привести к созданию новых антимикробных средств, крайне необходимых для борьбы с серьёзной проблемой устойчивости к антибиотикам.

#### Важность азотфиксирующих бактерий в водных экосистемах

Азотфиксирующие бактерии очень важны в аквакультуре, поскольку они обеспечивают биологически доступный азот, который является важным элементом для роста фитопланктона, являющегося естественным кормом для креветок и рыб. Азот присутствует в различных формах: аммиак ( $\text{NH}_3$ ), нитраты ( $\text{NO}_3^-$ ) и растворённые органические соединения. Наличие азота является важным фактором, влияющим на продуктивность и здоровье водных экосистем. Процесс фиксации азота имеет решающее значение в условиях дефицита питательных веществ. Цианобактерии, как мы упоминали выше, играют важную роль в фиксации азота в пресноводных и морских системах. В большинстве океанов земли важным источником азота является деятельность азотфиксирующих микроорганизмов или диазотрофов [3]. Изучение азотфиксирующих бактерий в водных экосистемах даёт нам представление о факторах, регулирующих доступность азота и продуктивность в различных водоёмах. Скрининг и определение характеристик азотфиксирующих бактерий из водных экосистем, таких как устья рек и пресноводные озера, также важны для разработки биоудобрений и других методов устойчивого ведения сельского хозяйства с учётом их эпидемиологической значимости [10]. Выделение азотфиксирующих бактерий из водных экосистем очень важно для раскрытия их потенциала в фиторемедиации.

Река Енотаевка, протекающая в Астраханской области России, представляет собой уникальную водную экосистему, в которой обитают разнообразные микробные сообщества. Река расположена в регионе с богатой историей сельского хозяйства и промышленности, что повлияло на качество воды и микробный состав. Изучение микробного разнообразия реки Енотаевка важно по нескольким причинам. Во-первых, это может дать ценную информацию об экологическом состоянии реки и ее способности поддерживать жизнедеятельность разнообразных организмов. Во-вторых, это может выявить присутствие видов микроорганизмов с уникальными метаболическими способностями, такими как расщепление загрязняющих веществ или фиксация азота, которые могут быть применены для рационального использования окружающей среды.

Изучение микробного разнообразия реки Енотаевка подчёркивает важность мониторинга микробиоты природных водоемов, особенно в регионах, подверженных значительному антропогенному воздействию. Выявление микробных изолятов, обладающих полезными свойствами, такими как азотфиксация и биоцидная активность, может дать ценную информацию о потенциальных возможностях применения этих микроорганизмов в управлении окружающей средой.

### Методы исследования

Объектом исследования являлась экосистема реки Енотаевка.

Устье реки Енотаевки расположено в 188 км от устья Волги. Река Енотаевка характеризуется следующими параметрами: длина — 70 км, высота истока — 23 м ниже уровня моря, высота устья — 25 м ниже уровня моря. Река является правым протоком Волги и отделяется от волжской протоки Воложка чуть южнее села Федоровка.

Для достижения поставленной цели мы провели исследования микробиологических и физико-химических показателей экосистемы реки Енотаевка (Астраханская область) для оценки биоцидного потенциала лабораторных штаммов водных микроорганизмов.

В качестве тест-культур, на которых проведен сравнительный анализ биологической активности лабораторных штаммов, использованы семь чистых изолятов бактерий, из которых четыре — это актинобактерии [1]. Данные тест-культуры выделены из толщи и поверхности водной экосистемы реки Енотаевка в 2024 году и зашифрованы под номерами: BP1, BP2, BP3, BP4, BP5, BP6, BP7.

Для хранения бактерий используется метод периодических пересевов (4–6 раз в год) на крахмально-казеиновой среде.

Исследование проводилось в лаборатории «Биотехнология, микробиология и почвоведение» на кафедре биотехнологии, аквакультуры, почвоведения и управления земельными ресурсами «Астраханского государственного университета им. В.Н. Татищева».

Анализ физико-химических показателей образцов воды проведен на базе Испытательной лаборатории филиала ФГБУ «Россельхозцентр» по Астраханской области.

*Посев образцов воды и культивирование микроорганизмов*

Отбор образцов воды из реки Енотаевка произведен 27 февраля 2024 года. Посев образцов воды из реки Енотаевка произведен поверхностным (с берега) и глубинным методами (с толщи) на плотные питательные среды: ГРМ-агар, крахмально-казеиновый агар, глицерин-аргининовый агар, среда Чапека.

Процесс выращивания культуры в ферментере BL-119593 Bailun Biotehcnology проводили с учетом следующего: температура культивирования ( $28 \pm 1$ ) °C; непрерывная работа шейкера при скорости перемешивания 120 об/мин при показателе  $pO_2$  (не ниже 20 %); давление воздуха в биореакторе 0,04–0,05 МПа; удельный расход воздуха в минуту 1,0–1,5 л/л среды.

*Метод перпендикулярных штрихов*

Посев штрихом производили по диаметру чашки Петри. Время инкубации составило 14 суток. После того как продуцент вырос и образовал антибиотические вещества, диффундирующие в толщу агара, перпендикулярно к его штриху подсевали штрихами тест-культуры (BP1, BP2, BP3, BP4, BP5, BP6, BP7), начиная от штриха к периферии чашки Петри.

Для посева использовали густые суспензии тест-организмов в стерильной водопроводной воде. Чашки Петри выдерживали в термостате при 30 °C в течение 7 суток.

*Метод агаровых блочков*

Метод агаровых блочков предусматривает использование разных питательных сред для выращивания продуцента антибиотика и тест-организма. Для выявления антибиотических веществ актинобактерий предполагаемый продуцент выращивали на ГРА-агаре.

### Результаты

В результате анализа количественных показателей, полученных по итогам исследования, было определено, что максимальная численность микроорганизмов, полученная в результате высева образцов воды на твердые питательные среды, наблюдалась на ГРМ-агаре ( $5,3 \cdot 10^4$ – $9,9 \cdot 10^4$  КОЕ/мл)

Это на порядок превышает численность микроорганизмов, выделенных на других питательных средах: среда Чапека, агар крахмально-аммиачный, агар крахмально-казеиновый. В них число микроорганизмов варьировалось от  $1,3 \cdot 10^4$  до  $3,8 \cdot 10^4$  КОЕ/мл воды, то есть находилось в пределах одного порядка.

В варианте с образцом воды с берега (поверхностный посев) выявлена максимальная численность микроорганизмов от  $2,2 \cdot 10^4$  до  $9,9 \cdot 10^4$  КОЕ/мл воды, минимальное значение данного показателя ( $1,3 \cdot 10^4$ – $5,3 \cdot 10^4$  КОЕ/мл) установлено в варианте с образцом воды с толщи (глубинный посев). Общее микробное число в остальных пробах не превышало  $1,5 \cdot 10^4$  КОЕ/мл.

В результате исследования выделено семь изолятов водных бактерий. Данные изоляты выделены методом поверхностного посева из образцов воды, отобранных с берега и зашифрованы под следующими номерами: BP1, BP2, BP3, BP4, BP5, BP6, BP7.

## Обсуждение результатов

В повышении эффективности биологического способа очистки природных вод значительную роль играет определение основных видов микроорганизмов, участвующих в процессе очистки, создание оптимальных условий для их деятельности.

Антагонистическую активность лабораторных штаммов актинобактерий исследовали методом диффузии в агар, используя агаровые блочки диаметром 6 мм. Исследования показали, что в отличие от метода перпендикулярных штрихов метод агаровых блоков дал возможность определить антагонистическую активность в отношении четырех тест-культур, однако зона лизирования роста микроорганизмов оказалась значительной.

Определены физико-химические параметры образцов воды из реки Енотаевка. Кислотность (7,1), запах (1 балл), мутность (0,2 мг/дм<sup>3</sup>), тяжелые металлы и пестициды (ГХЦГ, ДДТ) в исследуемых пробах оказались идентичны и в пределах нормы. В образцах не выявлены плавающие примеси, а взвешенные вещества (по сравнению с естественными условиями) составили в среднем 0,11 мг/дм<sup>3</sup>.

Значение биохимического потребления кислорода составило 1,15 мг/дм<sup>3</sup>, при нормативном показателе — 3 мг/дм<sup>3</sup>, что может быть связано с сезонными факторами среды. Сухой остаток в образцах с берега составил 315,2 мг/дм<sup>3</sup>, в остальных вариантах — 303,8 мг/дм<sup>3</sup>. Значение хлорид-ионов колебалось от 67,4 мг/дм<sup>3</sup>

до 70,9 мг/дм<sup>3</sup>, сульфат-ионов — от 48,7 мг/дм<sup>3</sup> до 52,9 мг/дм<sup>3</sup>, нитрат-анионов — от 14,6 мг/дм<sup>3</sup> до 16,5 мг/дм<sup>3</sup>.

Микробиологический анализ показал, что максимальная численность микроорганизмов выявлена в варианте с образцом воды с берега (поверхностный посев) и составила от  $2,2 \cdot 10^4$  до  $9,9 \cdot 10^4$  КОЕ/мл воды, минимальное значение данного показателя ( $1,3 \cdot 10^4$ – $5,3 \cdot 10^4$  КОЕ/мл) зафиксировано в варианте с образцом воды с толщи (глубинный посев). Общее микробное число в остальных пробах не превышало  $1,5 \cdot 10^4$  КОЕ/мл. Получено 7 изолятов водных бактерий (BP1, BP2, BP3, BP4, BP5, BP6, BP7).

## Заключение

Полученные нами результаты показывают необходимость продолжения исследований для понимания сложных взаимодействий между микробными сообществами и окружающей их средой, особенно в условиях растущих экологических проблем.

Проведенные нами исследования подтвердили высокую значимость изучения микробиологических и физико-химических показателей экосистемы реки Енотаевка. Учитывая необходимость очистки и обезвреживания природных вод, представляется необходимым исследование биоцидного потенциала лабораторных штаммов актинобактерий. Установлено, что исследуемый изолят является потенциальным продуцентом активных метаболитов для очистки природных вод, что требует дальнейших комплексных работ в данной области.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Григорян Л.Н. природной Экологические показатели и определены биотехнологические возможности воды почвенных образцов актинобактерий (эффективности обзор) / Л.Н. Батаева, Григорян Ю.В. свидетельствует Батаева // работ Теоретическая и штаммов прикладная биотехнологическое экология. — 2023. — № 2. — С. 6–19.
2. Abduv M., Asgarova M., Karimova A., Mammadova T., Sadiq M., and Mammadova K. Technological solutions for water resources management in Azerbaijan to achieve sustainable development: monitoring and improvement of management and forecasting // *Revista Gestão & Tecnologia*, vol. 24, no. 2, pp. 96–113, 2024.
3. Bagali S.S. Review: nitrogen fixing microorganisms // *International Journal of Microbiological Research*, vol. 3, no. 1, pp. 46–52, 2012.
4. Bashir I. et al. Concerns and Threats of Contamination on Aquatic Ecosystems // *Bioremediation and Biotechnology: Sustainable Approaches to Pollution Degradation*, pp. 1–26, 2020.
5. Bugubayeva A.U. et al. Improving the level of water quality and plant species diversity in the reservoir accumulating natural effluents from the reclaimed uranium-containing industrial waste dump // *Brazilian Journal of Biology*, vol. 84, 2024.
6. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, vol. 21, no. 5, 2021.
7. Da Purificação Junior A.F. et al. Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health // *African Journal of Microbiology Research*, vol. 11, no. 28, pp. 1142–1149, 2017.
8. Kapetanović D., Katouli M., and Lušić D. V. Microbial Communities in Changing Aquatic Environments // *Microorganisms*, vol. 12, no. 4, p. 726, 2024.
9. Llamas A., Leon-Miranda E., and Tejada-Jimenez M. Microalgal and Nitrogen-Fixing Bacterial Consortia: From Interaction to Biotechnological Potential // *Plants*, vol. 12, no. 13, pp. 24–76, 2023.
10. Nazir R., Zaffar M.R., and Amin I. Chapter 8 — Bacterial biofilms: the remarkable heterogeneous biological communities and nitrogen fixing microorganisms in lakes // *Freshwater Microbiology: Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems*, pp. 307–340, 2019.
11. Ongayev M. et al. Analysis of hydrochemical parameters of surface water sources used for watering pastures to improve the water quality // *Caspian Journal of Environmental Sciences*, vol. 21, no. 4, pp. 875–883, 2023.
12. Osintseva M. and Ishutin I. Influence of Natural, Climatic, and Industrial Factors on Air and Water Quality in The Kemerovo Region (Kuzbass, Russia) // *Qubahan Academic Journal*, vol. 3, no. 3, pp. 1–10, 2023.
13. Tarekegn M. et al. Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment // *Cogent Food & Agriculture*, vol. 6, no. 1, 2020.
14. Varjani S.J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons // *Bioresource Technology*, vol. 223, pp. 277–286, 2017.