

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ПАВЛОВСЬКА МАРІЯ ОЛЕКСІЇВНА**

**УДК: 502.172:504.5:502.211**

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ПРОЦЕСИ САМОВІДНОВЛЕННЯ ЕКОСИСТЕМИ ЧОРНОГО МОРЯ  
ЗА ДІЇ КСЕНОБІОТИКІВ РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ**

101 «Екологія»  
10 «Природничі науки»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.  
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на  
відповідне джерело

М.О. Павловська

Науковий керівник:  
**Клепо Алла Володимирівна,**  
доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник

Київ–2023

## АНОТАЦІЯ

*Павловська М.О.* Процеси самовідновлення екосистеми Чорного моря за дії ксенобіотиків різного походження. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 101 – «Екологія». – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2023.

У дисертаційній роботі викладено результати комплексного дослідження структури та функції угруповань мікроорганізмів водної товщі та донних осадів Чорного моря та проведено оцінку можливостей застосування даних метагеномного аналізу у встановленні екологічного стану моря згідно вимог Рамкової Директиви про Морську Стратегію ЄС та Морської природоохоронної Стратегії України. Крім того, досліджено відповідь мікробних угруповань на антропогенне навантаження, а саме потенційну та реалізовану активність щодо розкладу ксенобіотиків, а також їх роль у перенесенні генів стійкості до антибіотиків у водному середовищі.

Напівзакритий характер Чорного моря, значний річковий стік та велика площа дренажного басейну зумовлюють екологічні проблеми даного водного об'єкту – евтрофікацію, надходження забруднюючих речовин, втрату біорізноманіття, поширення антибіотикорезистентності та мікропластику. Посилення інтенсивності військових дій на території України у 2022 - 2023 рр. поглиблює екологічні проблеми у чорноморському регіоні через надходження токсичних компонентів ракетного палива, руйнування об'єктів очисної інфраструктури на річках, що впадають в Чорне море, пошкодження промислових та сільськогосподарських об'єктів, а також шумове забруднення.

Через воєнний стан та бойові дії Україна не здатна слідувати Морській природоохоронній стратегії, що була схвалена у відповідь на необхідність гармонізації національного моніторингу з практиками ЄС і визначає проведення регулярної екологічної оцінки вод Чорного моря, як пріоритет та базу для регулювання та планування природоохоронної діяльності в чорноморському регіоні. Проте, майбутні заходи з повоєнного відновлення Чорного моря та

прилеглих територій вимагатимуть проведення масштабної екологічної оцінки його стану та подальшого моніторингу з урахуванням вимог Водної Директиви ЄС та Рамкової Директиви про морську стратегію ЄС. Традиційно екологічна оцінка стану морського середовища ґрунтується на дискрипторах, що визначаються хімічними, фізичними та біологічними параметрами. Біологічний блок включає в себе оцінку угруповань фіто- та зоопланктону, фіто- та зообентосу, риб та морських ссавців. Угруповання мікроорганізмів у традиційній екологічній оцінці повноцінно не враховуються. Водночас, відомо, що бактерії водної товщі та донних осадів є чутливими до природних та антропогенних змін середовища і реагують на них швидко, модифікуючи таксономічне різноманіття, фізіологічні та функціональні особливості. Причиною обмеженого використання даних щодо мікробних угруповань в екологічній оцінці та моніторингу є технічна складність ідентифікації морських мікроорганізмів. Однак, сучасні методи метагеномного аналізу дозволяють отримати детальну картину таксономічного та функціонального різноманіття мікробіоценозу морських екосистем із подальшим застосуванням згенерованого масиву даних в оцінці екологічного стану водного об'єкту.

Таким чином, актуальність дисертаційного дослідження полягає у:

- можливості масштабного аналізу розподілу мікробних екологічних ніш та ролі мікроорганізмів у біогеохімічних циклах в унікальних умовах напівзакритої та постійно стратифікованої екосистеми Чорного моря;
- необхідності дослідити відповідь екосистеми Чорного моря на значний вплив забруднюючих речовин, що присутні у високих концентраціях та постійно надходять із річковим стоком;
- потребі провести скринінг поширення антибіотикорезистентності в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря з метою встановлення потенційних джерел надходження генів стійкості до антибіотиків, як одних із забрудників середовища;

- необхідності визначення базового стану угруповань мікроорганізмів Чорного моря та їх відповіді на антропогенне навантаження до повномасштабного вторгнення російської федерації, що може бути використано для проведення порівняльного аналізу та екологічної оцінки у майбутньому після завершення бойових дій

- потребі проаналізувати доцільність використання метагеномних даних мікробіологічних досліджень в оцінці екологічного стану середовища та провести валідацію даного підходу.

Вперше для Чорного моря було проведено масштабний аналіз таксономічного, функціонального складу та розподілу угруповань мікроорганізмів методами метагеномного аналізу у різних регіонах. Попередні дослідження мали точковий характер або фокусувались на вивченні певних таксономічних груп та метаболічних процесів у мікробних угрупованнях. У результаті проведених нами досліджень визначено, що таксономічний та функціональний склад угруповань мікроорганізмів Чорного моря змінюється із вертикальною стратифікацією водного стовпа у відповідності до градієнту фізико-хімічних умов середовища. Так, аналіз подібності угруповань (Analysis Of Similarities, ANOSIM) показав присутність, як регіональної диференціації між шельфовою зоною та відкритими водами ( $R=0,89$ ,  $p=0,0001$ ), так і вертикальної диференціації між зонами в межах різних глибин ( $R=0,64$ ,  $p=0,0001$ ).

Згідно отриманих нами даних, зразки з поверхні та термоклину утворювали єдиний кластер із переважанням *Flavobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Synechococcaceae*, частка яких становила 11%, 11% та 10 – 13%, відповідно. У функціональній структурі угруповання переважали групи генів (ідентифіковані за PICRUST), що відповідальні за асиміляційне відновлення сульфатів (40 – 47%) та оксигенний фотосинтез (19%). У зоні глибинного максимум хлорофілу нами було встановлено зростання частки *NS9* (3%), *Plactomycetaceae* (3%), та *Verrucomicrobiaceae* (3%) порівняно із верхніми шарами водного стовпа, що, імовірно, пов'язано з доступністю специфічних ресурсів, а саме субстрату росту, який надходить від фітопланктону під час активного цвітіння. На користь цього

свідчать попередні дані щодо домінування коколітофориди (*Coccolithaceae*) в Чорному морі у період проведення дисертаційного дослідження. Крім того було встановлено присутність позитивної кореляції між часткою гетеротрофних представників угруповань бактеріопланктону та чисельністю діатомових водоростей у поверхневих водах ( $r = 0,75$ ,  $p = 0,001$ ).

У субоксичній зоні Чорного моря нами було виявлено тенденцію до зростання частки зелених сірчаних (*Chlorobia* (7%)) та несірчаних (*Anaerolineae* (1%)) бактерій, що здатні до росту в умовах безкисневого середовища з низькою інтенсивністю освітлення. Водночас, у функціональній структурі набували поширеності гени аноксигенного фотосинтезу, частка яких становила 7%. Найвищою часткою в угрупованні субоксичної зони характеризувалась родина *A714017* (12%), представники якої, згідно попередніх досліджень, мають потенційну здатність до перемикання між анаеробним та аеробним метаболізмом.

Отримані нами дані свідчать про те, що безкиснева зона Чорного моря є екотонним середовищем, що характеризується зниженням освітленості та зростанням концентрації сірководню з глибиною. Структура та розподіл досліджуваних угруповань мікроорганізмів відповідали екотонному характеру середовища. Так, частка зелених сірчаних бактерій *Chlorobiaceae* мала тенденцію до зниження з глибиною - від 22% у верхніх шарах до 0,08% в глибокій безкисневій зоні (750 – 1000 м). Крім того нами було встановлено високе різноманіття сульфатвідновлювальних бактерій, серед яких переважали *Desulfarculaceae* (6%), *SAR324* (3%) та *Desulfobacteraceae* (2%). А частка функціональних компонентів дисиміляційної сульфат-редукції складала 8%.

Подальший кореляційний аналіз засвідчив присутність достовірного зв'язку між таксономічним, функціональним різноманіттям досліджуваних угруповань та градієнтом фізико-хімічних параметрів середовища. Так, було встановлено позитивну кореляцію між часткою оксигенного фотосинтезу та дисиміляційного відновлення нітратів та поширеністю *Flavobacteriaceae*, *Synechococcaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Planctomycetaceae*, *Pelagibacteraceae* та *Microbacteraceae*.

Розподіл представників *A714017*, *Piscirickettsiaceae*, *Chlorobiaceae*, *Helicobacteraceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfarculaceae* характеризувався позитивною кореляцією із часткою функціональних компонентів аноксигенного фотосинтезу, денитрифікації та дисиміляційного відновлення сульфатів. А глибину, концентрацію  $O_2$ ,  $PO_4$  та  $NO_3$  було визначено, як найбільш значущі фактори формування функціональної структури досліджуваного угруповання.

З метою дослідження екологічної ролі угруповань мікроорганізмів Чорного моря було проведено аналіз активності бактерій водної товщі та донних осадів у процесах біотрансформації ксенобіотиків. Дослідження здійснювали методом кількісної ПЛР в реальному часі за генами, що кодують розклад поліароматичних вуглеводнів (ПАВ), поліхлорбіфенілів (ПХБ) та хлорорганічних сполук (ХОС).

У дисертаційному дослідженні було показано присутність потенційної здатності до розкладу ксенобіотиків в угрупованні мікроорганізмів Чорного моря. Виявлено, що найвищі показники копійності мав ген розкладу біфенілів *bphA1* - в середньому  $1,4 \times 10^5$  копій/мл у зразках з водної товщі та  $1,4 \times 10^6 \pm 3,3 \times 10^5$  копій/мг у донних осадах. Другим за поширеністю був ген *linB*, копійність якого коливалась в межах від  $6,2 \times 10^3$  до  $2,6 \times 10^4$  копій/мл у воді і становила в середньому  $1,2 \times 10^5 \pm 2,7 \times 10^4$  копій/мг у донних осадах. Найвища копійність генів кільцево-гідроксилювальної діоксигенази грамнегативних (*PAH-RHD $\alpha$ -N*) та грампозитивних бактерій (*PAH-RHD $\alpha$ -P*) спостерігалась у зразках донних осадів - в середньому  $5,4 \times 10^4 \pm 3,2 \times 10^3$  та  $1,6 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^4$  копій/мг відповідно.

З метою встановлення показників реалізованої активності мікроорганізмів Чорного моря у процесах розкладу ксенобіотиків було проведено оцінку транскрипції катаболічних генів. Згідно отриманих нами даних найвищі показники транскрипції спостерігались для генів розкладу хлорорганічних сполук – *linA* та *linB*, що узгоджується з високими концентраціями  $\beta$ -гексахлорциклогексану у водах Чорного моря на момент відбору.

Ген розкладу біфенілів, що характеризувався найвищими показниками копійності, мав низький рівень транскрипції, що, ймовірно, пов'язано із відсутністю біфенілу у навколишньому середовищі. Так, на момент відбору у волі та донних осадах Чорного моря були поширені стійкі ПХБ, що мали у своїй структурі  $\geq 4$  атомів хлору.

Нами було показано присутність відмінностей у копійності та транскрипції генів розкладу поліароматичних сполук між грампозитивними та грамнегативними бактеріями. Так, транскрипція генів розкладу ПАВ грампозитивних бактерій була присутня у всіх досліджуваних зонах водної товщі та у донних осадах. Водночас, транскрипцію генів біотрансформації ПАВ грамнегативними бактеріями було виявлено спорадично, в окремих зразках. Зафіксовані відмінності можуть бути пов'язані з різною стратегією та спеціалізацією цих мікроорганізмів. Відомо, що грампозитивні бактерії, здатні до розкладу ПАВ є К-стратегіями, що спеціалізуються на біотрансформації високомолекулярних стійких ПАВ таких, як флуорантен, пірен та бензопірен, які превалювали у зразках морської води на момент відбору. Таким чином, переважання високомолекулярних ПАВ може сприяти поширеності та стимулювати активність грампозитивних К-стратегів.

У цілому аналіз екологічної ролі угруповань мікроорганізмів Чорного моря показав присутність, як потенційної, так і реалізованої активності щодо розкладу забруднюючих речовин. Отримані нами дані вказують на зниження концентрації менш стійких органічних забруднювачів, таких як біфеніл, нафтален  $\alpha$ - та  $\gamma$ -ГХЦГ під впливом мікробної активності. Однак, присутня тенденція до накопичення в середовищі більш стійких ксенобіотиків - високомолекулярні ПАВ та  $\beta$ -ГХЦГ, хоча нами зафіксована функціональна активність мікроорганізмів спрямована на їх розклад.

Окремим важливим питанням оцінки екологічного стану є дослідження поширення антибіотикорезистентності в угрупованнях мікроорганізмів. Нами було проведено дослідження поширення генів стійкості до антибіотиків, що у міжнародних екологічних дослідженнях прирівнюється до "полютантів". Вибір

таргетних генів для аналізу ґрунтувався на даних щодо використання антибіотиків у чорноморському регіоні, а також щодо присутності антибіотиків у водах річки Дунай, стік якої несе масований вплив на екосистему Чорного моря.

Було показано, що гени стійкості до беталактамів, ванкоміцину, макролідів та колістину поширені у різних частинах акваторії Чорного моря з тенденцією до зменшення копійності від шельфових зон до відкритих вод. Найпоширенішим був ген стійкості до ванкоміцину ( $2 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-1}$  копій/мкл). Нормалізована копійність генів стійкості до беталактамів – *blaSHV* та *blaCMY* становила  $4 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-2}$  копій/мкл та  $1 \times 10^{-2} \pm 3 \times 10^{-3}$  копій/мкл, відповідно.

У дисертаційному дослідженні було вперше для Чорного моря виявлено ген стійкості до колістину – *mcr-1* із копійністю  $5 \times 10^{-2} \pm 3 \times 10^{-2}$  копій/мкл. Найнижча копійність спостерігалась для генів *ermB* ( $1 \times 10^{-3} \pm 5 \times 10^{-4}$  копій/мкл) та *vanA* ( $1 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-4}$  копій/мкл).

Отримані нами показники копійності генів антибіотикорезистентності є високими і знаходяться в межах діапазону копійності генів стійкості до беталактамів (*blaOXA*), який було визначено для басейну річки Дунай –  $2,4 \times 10^{-8}$  –  $3,1 \times 10^{-2}$  копій/мкл.

Встановлена нами тенденція до зниження поширеності антибіотикорезистентності у поверхневих водах Чорного моря із північно-західного шельфу до відкритих вод відповідає попереднім даним щодо просторового розподілу копійності гену стійкості до сульфонамідів *sul1* у прибережних водах Чорного моря. Різниця копійності генів антибіотикорезистентності у прибережних та відкритих Чорного моря є яскравим свідченням антропогенного впливу на поширення явища стійкості до антибіотиків у досліджуваній акваторії.

З метою ідентифікації джерел появи генів стійкості до антибіотиків в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря було проаналізовано генетичні маркери представників відділу *Bacteroidetes*, специфічних до фекальної мікробіоти людини, жуйних тварин та свиней. Було встановлено позитивну



кореляцію між показниками антибіотикорезистентності та кількістю копій *Bacteroidetes* жуйних тварин, що склала  $6 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2$  та  $4 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2$  копій/мкл в районі шельфу та у відкритих водах, відповідно.

Таким чином, нами показано присутність екологічної проблеми поширення стійкості до антибіотиків в акваторії Чорного моря. Поширеність генів стійкості до антибіотиків може розглядатись у якості одного з індикаторів екологічної оцінки Чорного моря у майбутньому. Враховуючи потенційні шляхи надходження генів антибіотикорезистентності із річковим стоком, доцільною є дослідження поширеності та розподілу генів стійкості до антибіотиків у великих річках - Дунаї та Дністрі, що дозволить точніше визначити ймовірні джерела забруднення.

За результатами дослідження таксономічної та функціональної структури угруповань мікроорганізмів Чорного моря, а також їх ролі в екосистемі нами було проведено аналіз можливості використання отриманих даних для екологічної оцінки. Було здійснено розрахунок індексу microgAMBI (microbial genomic Marine Biotic Index) та Pi (Pressure index) на основі, відповідно, даних таксономічного складу угруповань бактерій водної товщі та донних осадів та концентрації забруднюючих речовин у зразках.

За розрахованими нами значеннями microgAMBI екологічний стан вод Чорного моря переважно “добрий” (microgAMBI = 1,47 - 2,34) (категорії згідно Водної Рамкової Директиви ЄС). Лише на трьох станціях було зафіксовано “задовільний” (microgAMBI = 2,5), “поганий” (microgAMBI = 3,75) та “дуже поганий” (microgAMBI = 4,6) стан. Було встановлено присутність негативної кореляції між часткою *Actinomycetales* ( $r=0,6$ ,  $p=0,04$ ) та *Halomonadaceae* ( $r=0,6$ ,  $p=0,04$ ) у досліджуваних угрупованнях бактеріопланктону та екологічним станом середовища. Тому дані таксономічні групи можна розглядати, як потенційні індикатори стану вод Чорного моря.

Розраховані нами значення microgAMBI показали, що донні осади Чорного моря характеризуються гіршим екологічним станом, ніж водне середовище. Екологічний стан було визначено, як “поганий” (microgAMBI = 4,1 – 4,4) та

“задовільний” ( $\text{microgAMBI} = 2,6 - 3,4$ ). Частка *Dehalococcoidetes* в угрупованні донних осадів мала негативну кореляцію із екологічним станом середовища ( $r = 0,9$ ,  $p = 0,05$ ), а отже теж може в перспективі бути використана, як індикатор.

Було встановлено певні розбіжності між оцінкою екологічного стану середовища за хімічними параметрами та за структурою мікробних угруповань. Однак, можна стверджувати, що  $\text{microgAMBI}$  дозволяє уточнювати висновки щодо екологічного стану, як вод, так і донних осадів. Тому на даному етапі доцільним є застосування  $\text{microgAMBI}$ , як складової комплексного підходу до екологічної оцінки стану екосистеми Чорного моря. Водночас, використання  $\text{microgAMBI}$  має певні обмеження через залежність результатів від: 1) наповненості баз даних, за якими визначається таксономічна приналежність мікроорганізмів 2) наявності досліджень реакції мікробного угруповання на надходження певного типу ксенобіотиків до середовища, як лабораторних, так і в реальних умовах навколишнього середовища. Отже, перспективним є додаткові дослідження та валідація даного індексу.

**Ключові слова:** мікроорганізми, планктон, таксономічна структура угруповань, екологічна оцінка, морські екосистеми, Чорне море, вертикальна стратифікація, Рамкова Директива про Морську Стратегію ЄС, ксенобіотики, біотрансформація, антибіотикорезистентність

## ANNOTATION

*Pavlovska M.O.* Black sea ecosystem recovery under the influence of pollutants of different origin. – The qualification scientific work as a manuscript.

Thesis for the academic degree of Doctor of Philosophy in the specialty 101 – "Ecology". – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2023.

A comprehensive study of structure and function of the Black sea microbial communities inhabiting the water column and sediments is presented in the thesis. Additionally, microbial metagenomic data is tested for its potential applicability in the Black sea ecological status assessment according to the requirements of the EU Marine Strategy Framework Directive and the Ukrainian Marine Conservation Strategy. Additionally, the response of microbial communities to anthropogenic pressure, particularly their potential and realized activity in xenobiotics degradation, as well as their role in the antibiotic resistance genes dissemination in the aquatic environment, were investigated.

The semi-closed nature of the Black Sea, significant river inflow, and a large drainage basin contribute to environmental problems it faces, such as eutrophication, the influx of pollutants, loss of biodiversity, the spread of antibiotic resistance, and microplastic contamination. The escalation of military activities in Ukraine from 2022 to 2023 exacerbates the environmental issues in the Black Sea region due to the introduction of toxic components from rocket fuel, the destruction of wastewater treatment infrastructure along the rivers that flow into the Black Sea, damage to industrial and agricultural facilities, as well as noise pollution.

Due to the state of war and ongoing military operations, Ukraine is unable to adhere to the Marine Conservation Strategy, which was approved to harmonize national monitoring practices with those of the EU and establishes regular ecological assessment of the Black Sea waters as a priority and basis for conservation activities in the Black Sea region. However, future post-war recovery measures for the Black Sea and adjacent territories will require a comprehensive environmental assessment of its state and monitoring in accordance with the requirements of the EU Water Framework

Directive and the Marine Strategy Framework Directive. Traditionally, the ecological assessment of the marine environment is based on descriptors determined by chemical, physical, and biological parameters. The biological component includes the assessment of phytoplankton, zooplankton, phyto- and zoobenthos, fish, and marine mammals. Microbial communities are not fully considered in traditional ecological assessments. However, it is known that bacteria in the water column and sediments are sensitive to natural and anthropogenic environmental changes and respond rapidly, modifying taxonomic diversity, physiological, and functional characteristics. The limited use of data on microbial communities in ecological assessment and monitoring is due to the technical complexity of marine microorganisms' identification. Nevertheless, modern metagenomic analysis methods allow for a detailed analysis of the taxonomic and functional diversity of marine microbial ecosystems, with subsequent application of the generated dataset in water bodies' ecological status assessment.

Thus the relevance of the Thesis lies in:

The possibility of a comprehensive analysis to infer the distribution of microbial ecological niches and the role of microorganisms in biogeochemical cycles in the unique environment of the Black Sea semi-closed and permanently stratified ecosystem.

- the need to investigate the response of the Black Sea ecosystem to the significant influence of pollutants that are present in high concentrations and constantly delivered via river runoff.
- the necessity to conduct screening for the spread of antibiotic resistance in microbial communities of the Black Sea in order to identify potential sources of antibiotic resistance genes as environmental contaminants.
- the importance of inferring the baseline state of the Black sea microbial communities and their response to anthropogenic pressures prior to the full-scale invasion by the russian federation, which can be used for comparative analysis and ecological assessment in the future after the cessation of hostilities.
- the need to analyze the potential of using metagenomic data from microbiological studies in assessing the ecological status and to validate this approach.

A comprehensive analysis of microbial communities' taxonomic and functional composition and their distribution in different Black sea regions was conducted for the first time using metagenomic methods. Previous studies were limited in scope or focused on studying specific taxonomic groups and metabolic processes within microbial communities. The results of our research have revealed that the taxonomic and functional composition of Black Sea microbial communities varies with the vertical stratification of the water column in accordance with the gradient of physicochemical environmental conditions. The ANOSIM demonstrated the presence of both regional differentiation between the shelf zone and open waters ( $r=0,89$ ,  $p=0,0001$ ) and vertical differentiation within different depth zones ( $r=0,64$ ,  $p=0,0001$ ).

According to our data, samples from the surface and thermocline formed a single cluster dominated by *Flavobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae*, and *Synechococcaceae*, accounting for 11%, 11%, and 10-13%, respectively. Assimilatory sulfate reduction (40-47%) and oxygenic photosynthesis (19%), identified by PICRUST algorithm, dominated the community functional repertoire. An increase in the abundance of *NS9* (3%), *Plactomycetaceae* (3%), and *Verrucomicrobiaceae* (3%) was observed in the deep chlorophyll maximum zone, compared to the upper layers of the water column. This is likely associated with the availability of specific resources, particularly growth substrates derived from phytoplankton during active bloom. This is supported by previous data on the dominance of *Coccolithaceae* in the Black Sea during the period of our survey period. Furthermore, a positive correlation was found between the proportion of heterotrophic bacteria in the bacterioplankton community and the abundance of diatoms in surface waters ( $r=0,75$ ,  $p=0,001$ ).

The suboxic zone of the Black Sea was characterized by a trend towards an increased proportion of green sulfur bacteria (*Chlorobia* (7%)) and non-sulfur bacteria (*Anaerolineae* (1%)), which are capable of growing in oxygen-depleted environments with low light intensity. Additionally, an increase in the prevalence of genes associated with anoxygenic photosynthesis, accounting for 7%, was observed in the functional structure of the studied community. The family *A714017* (12%) represented the highest proportion within the suboxic zone community, and previous research suggests that its

members have the potential for metabolic switching between anaerobic and aerobic metabolism.

Our data indicate that the anoxic zone of the Black Sea is an ecotone environment characterized by a decrease in light availability and increase in hydrogen sulfide concentration with depth. The structure and distribution of the investigated microbial communities corresponded to the ecotone nature of the environment. For instance, the proportion of green sulfur bacteria (*Chlorobiaceae*) showed a trend towards a decrease with depth, ranging from 22% in the upper layers to 0,08% in the deep anoxic zone (750 - 1000 m). Additionally, a high diversity of sulfate-reducing bacteria was detected, with *Desulfarculaceae* (6%), *SAR324* (3%), and *Desulfobacteraceae* (2%) being the predominant groups. The functional component related to dissimilatory sulfate reduction accounted for 8% of the total microbial community.

Subsequent correlation analysis revealed a significant relationship between the taxonomic and functional diversity of the investigated microbial communities and the gradient of physicochemical parameters in the environment. Positive correlation was found between the proportion of oxygenic photosynthesis and dissimilatory nitrate reduction, and the prevalence of *Flavobacteriaceae*, *Synechococcaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Planctomycetaceae*, *Pelagibacteraceae*, and *Microbacteriaceae*. The distribution of *A714017*, *Piscirickettsiaceae*, *Chlorobiaceae*, *Helicobacteraceae*, *Desulfobacteraceae*, and *Desulfarculaceae* showed a positive correlation with the proportion of functional components related to anoxygenic photosynthesis, denitrification, and dissimilatory sulfate reduction. Depth, oxygen concentration,  $\text{PO}_4$ , and  $\text{NO}_3$  were identified as the most significant factors shaping the functional structure of the investigated microbial community.

Analysis of bacterial activity towards xenobiotics' degradation was conducted with the purpose to investigate the ecological role of microbial communities in the Black sea water column and sediments. The study was performed using real-time quantitative PCR targeting genes involved in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and chlorinated organic compounds (COCs).

Our study demonstrated the presence of potential capability for xenobiotic degradation in the microbial communities of the Black Sea. The highest abundance was observed for the biphenyl degradation gene *bphA1*, with an average of  $1,4 \times 10^5$  copies/mL in water samples and  $1,4 \times 10^6 \pm 3,3 \times 10^5$  copies/mg in sediment samples. The second most prevalent gene was *linB*, with copy numbers ranging from  $6,2 \times 10^3$  to  $2,6 \times 10^4$  copies/mL in water and an average of  $1,2 \times 10^5 \pm 2,7 \times 10^4$  copies/mg in sediments. The highest copy numbers of the ring-hydroxylating dioxygenase genes in gram-negative bacteria (*PAH-RHD $\alpha$ -N*) and gram-positive bacteria (*PAH-RHD $\alpha$ -P*) were observed in sediment samples, with the average of  $5,4 \times 10^4 \pm 3,2 \times 10^3$  and  $1,6 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^4$  copies/mg, respectively.

The transcription of catabolic genes was assessed in order to determine the realized activity of the Black sea microorganisms in xenobiotics degradation processes of xenobiotics. According to our data, the highest transcription levels were observed for the genes involved in the degradation of chlorinated organic compounds, namely *linA* and *linB*. This finding is consistent with the high concentrations of  $\beta$ -hexachlorocyclohexane in the Black Sea waters during our sampling campaign.

The gene involved in the biphenyl degradation, which exhibited the highest copy numbers, showed a low level of transcription, presumably due to the absence of biphenyl in the surrounding environment. Indeed, persistent polychlorinated biphenyls (PCBs) containing  $\geq 4$  chlorine atoms were prevalent in the Black sea water column and sediments at the time of sampling.

The differences in the abundance and transcription of genes involved in the degradation of polycyclic aromatic compounds (PAHs) between gram-positive and gram-negative bacteria were demonstrated. The transcription of PAH degradation genes in gram-positive bacteria was detected in all investigated zones of the water column and sediments. In contrast, sporadic transcription of gram-negative PAH biotransformation genes was found in certain samples only. The observed differences may be attributed to the varying strategies and specialization of these microorganisms. Gram-positive bacteria capable of degrading PAHs are known as K-strategists, specializing in the biotransformation of high-molecular-weight persistent PAHs such

as fluoranthene, pyrene, and benzo[a]pyrene, which were prevalent in the seawater during the sampling campaign. Thus, the predominance of high-molecular-weight PAHs may contribute to the prevalence and stimulation of gram-positive K-strategists activity.

In general, the analysis of the Black sea microbial communities' ecological role revealed the presence of both potential and realized activity directed at the degradation of pollutants. Our data indicate a decrease in the concentration of less persistent organic pollutants, such as biphenyl, naphthalene,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane, under the influence of microbial activity. However, there is a trend for the accumulation of more persistent xenobiotics, such as high-molecular-weight PAHs and  $\beta$ -hexachlorocyclohexane, in the environment, although our findings indicate functional activity of microorganisms aimed at their degradation.

An important aspect of the Black sea ecological status assessment is the study of antibiotic resistance prevalence in microbial communities. We conducted research on the dissemination of antibiotic resistance genes, which are known to be treated as "pollutants" in international ecological studies. The selection of target genes for the analysis was based on data regarding antibiotics' usage in the Black Sea region, as well as the presence of antibiotics in the waters of the Danube River, whose discharge has a significant impact on the Black Sea ecosystem.

It has been shown that genes coding for the resistance to beta-lactams, vancomycin, macrolides, and colistin are prevalent in different parts of the Black Sea water column, with a decreasing abundance trend from the shelf zones to the open waters. The most common was the vancomycin resistance gene ( $2 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-1}$  copies/ $\mu$ L). The normalized abundance of beta-lactam resistance genes, *blaSHV* and *blaCMY*, was  $4 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-2}$  copies/ $\mu$ L and  $1 \times 10^{-2} \pm 3 \times 10^{-3}$  copies/ $\mu$ L, respectively.

The presence of the colistin resistance gene, *mcr-1*, was detected for the first time in the Black Sea, with an abundance of  $5 \times 10^{-2} \pm 3 \times 10^{-2}$  copies/ $\mu$ L. The lowest abundance was observed for the *ermB* gene ( $1 \times 10^{-3} \pm 5 \times 10^{-4}$  copies/ $\mu$ L) and the *vanA* gene ( $1 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-4}$  copies/ $\mu$ L).



The calculated abundance of antibiotic resistance genes is high and falls within the range of beta-lactam resistance genes' (*blaOXA*) abundance determined for the Danube River basin, which was  $2,4 \times 10^{-8} - 3,1 \times 10^{-2}$  copies/ $\mu$ L.

The observed decrease in antibiotic resistance prevalence from the northwestern shelf to the open waters corresponds to the previous data on the spatial distribution of the sulfonamide resistance gene *sulI* abundance in the coastal area of the Black Sea. The difference in the abundance of antibiotic resistance genes between the Black Sea coastal and open waters is a clear indication of anthropogenic influence on the spread of antibiotic resistance in the studied environment.

Genetic markers specific to the *Bacteroidetes* phylum, associated with human fecal microbiota, ruminant animals, and pigs, were analyzed in order to identify the sources of antibiotic resistance genes in microbial communities of the Black Sea. A positive correlation was found between the antibiotic resistance genes and the abundance of rumen-specific *Bacteroidetes*, which reached  $6 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2$  and  $4 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L in the shelf and open waters regions, respectively.

We have demonstrated the presence of an ecological problem regarding the spread of antibiotic resistance in the Black Sea. The prevalence of antibiotic resistance genes can be considered as one of the indicators for the ecological assessment of the Black Sea in the future. Considering the potential pathways of antibiotic resistance gene influx through river runoff, it is important to investigate the prevalence and distribution of antibiotic resistance genes in major rivers such as the Danube and Dniester, which will provide a more accurate estimation of the likely sources of contamination.

The data obtained on the studied Black sea microbial communities' taxonomic and functional structure and their role in the ecosystem was analyzed for the potential to be used for ecological assessment. The microgAMBI (microbial genomic Marine Biotic Index) was calculated based on the taxonomic composition of bacterial communities in water column and sediments, whereas the Pi (Pressure index) was inferred with pollutants' concentration in the samples.

According to the calculated microgAMBI values, the ecological status of the Black Sea waters is predominantly "good" (microgAMBI = 1,47 – 2,34), based on the

categories defined in the EU Water Framework Directive. Only three stations showed a "moderate" (microgAMBI = 2.5), "poor" (microgAMBI = 3.75), and "bad" (microgAMBI = 4.6) status. A negative correlation between the abundance of *Actinomycetales* ( $r = 0.6$ ,  $p = 0.04$ ) and *Halomonadaceae* ( $r = 0.6$ ,  $p = 0.04$ ) within the investigated bacterioplankton communities and the environmental status was observed. Therefore, these taxonomic groups can be considered as potential indicators of the Black Sea water quality.

MicrogAMBI values calculated for the Black sea sediments indicated that they are characterized by a poorer ecological status compared to the water column. The ecological status was determined to be "poor" (microgAMBI = 4.1 – 4.4) and "moderate" (microgAMBI = 2.6 – 3.4). The abundance of *Dehalococcoidetes* in the sediment community exhibited a negative correlation with the environmental status ( $r = 0.9$ ,  $p = 0.05$ ), suggesting that it can also be potentially used as an indicator.

Certain discrepancies were identified between the assessment of the environmental status based on chemical parameters and the structure of microbial communities. However, it can be argued that microgAMBI allows for a more precise evaluation of the environmental status, both in the water column and sediment. Therefore, at this stage, it is appropriate to apply microgAMBI as a component of a comprehensive approach to the Black Sea ecosystem monitoring.

However, the use of microgAMBI has certain limitations due to its dependence on: 1) the completeness of the databases used to determine the taxonomic affiliation of microorganisms, and 2) the availability of studies on the response of microbial communities to the influx of specific xenobiotics into the environment, both in laboratory and real environmental conditions. Therefore, further research and validation of this index are promising.

**Key words:** microorganisms, plankton, taxonomic structure of the communities, ecological assessment, marine ecosystems, the Black Sea, vertical stratification, EU Marine Framework Strategy Directive, xenobiotics, biodegradation, antibiotic resistance

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у науковому фаховому виданні України

1. **Pavlovska M.**, Solomenko L., Prekrasna E. 2021. Ecological evaluation of aquatic microorganisms role in xenobiotics transformation with the reference to the Black sea. Біологічні системи: теорія та інновації», 12 (1). <http://dx.doi.org/10.31548/biologiya2021.01.007> (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано експериментальну частину, проаналізовано одержані результати, написано статтю).

2. **Pavlovska M.**, Solomenko L., Prekrasna E., Dykyi E. 2020. Xenobiotics' impact on black sea prokaryotic communities' qualitative composition. Біологічні системи: теорія та інновації, 11 (1). – с. 50-59 (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано експериментальну частину, проаналізовано одержані результати, написано статтю).

3. **Pavlovska M.**, Klepko A., Prekrasna-Kviatkovska Ye. 2023. The utility of metageomic data for the Black sea ecological status assessment. Біологічні системи: теорія та інновації. (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано розрахунки, проаналізовано одержані результати, написано статтю).

### Статті у періодичному науковому виданні іншої держави, яка входить до Організації економічного співробітництва та розвитку та/або

### Європейського Союзу

4. Stoica E., **Pavlovska M.**, Dykyi E., Kormas K. 2017. Next generation sequencing-based approaches to characterize microbial pathogenic community and their potential relation to the Black Sea ecosystem status. CIESM Workshop Monographs. Searching for Bacterial Pathogens in the Digital Ocean 49 (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано експериментальну частину, проаналізовано одержані результати, написано статтю).

5. Slobodnik J., Alygizakis N., Oswald P., Oswaldova M., Nika M-C., Vrana B., Prokes R., Stoica E., **Pavlovska M.**, Prekrasna I., Dykyi E., and Thomaidis N. 2019.

EMBLAS - Improving Environmental Monitoring in the Black Sea. Norman Bulletin: 6

[https://www.normandata.eu/sites/default/files/files/bulletins/Bulletin\\_Norman\\_n°6\\_octobre2019\\_06\\_11\\_2019.pdf](https://www.normandata.eu/sites/default/files/files/bulletins/Bulletin_Norman_n°6_octobre2019_06_11_2019.pdf) (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано експериментальну частину, проаналізовано одержані результати, написано статтю).

6. **Pavlovska M.**, Zhang Y., Yang J., Dykyi E., Prekrasna I., Slobodnik J., Stoica E. 2020. From Bacteria to Marine Mammals: Holistic Pelagic Biodiversity Monitoring of the Black Sea via eDNA Metabarcoding Approach. *Environment International*. 135, 10.1016/j.envint.2019.105307 (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано експериментальну частину, проаналізовано одержані результати, написано статтю).

7. **Pavlovska M.**, Prekrasna Ie., Dykyi E., Zotov A., Dzhulai A., Frolova A., Stoica E. 2021. Niche partitioning of bacterial communities along the stratified water column in the Black Sea. *MicrobiologyOpen*. 10.1002/mbo3.1195 (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано експериментальну частину, проаналізовано одержані результати, написано статтю).

8. Prekrasna I, **Pavlovska M.**, Oleinik I, Dykyi E, Slobodnik J, Alygizakis N, Solomenko L, Stoica E. Bacterial communities of the Black Sea exhibit activity against persistent organic pollutants in the water column and sediments. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2022 Mar 7;234:113367. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113367 (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано експериментальну частину, проаналізовано одержані результати, частково написано статтю).

9. Prekrasna I, **Pavlovska M.**, Dzhulai A, Dykyi E, Alygizakis N and Slobodnik J (2022) Antibiotic Resistance in Black Sea Microbial Communities. *Front. Environ. Sci*. 10:823172. doi: 10.3389/fenvs.2022.823172 (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано експериментальну частину, проаналізовано одержані результати, написано статтю).

### Тези наукових доповідей

10. **Pavlovska M.**, Dykyi E., Stoica E. 2017. Preliminary on Black Sea 16S prokaryote diversity and vertical distribution. PROTECTION OF THE BLACK SEA ECOSYSTEM AND THE SUSTAINABLE MANAGEMENT OF MARITIME ACTIVITIES 8th edition (PROMARE 2017) [http://www.rmri.ro/Home/Downloads/Publications.Symposia/Promare2017\\_FinalProgramme.pdf](http://www.rmri.ro/Home/Downloads/Publications.Symposia/Promare2017_FinalProgramme.pdf) *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано експериментальну частину, проаналізовано одержані результати, написано тези).*
11. **Pavlovska M.O.**, Solomenko L.I., Prekrasna I.P. Microbial communities' taxonomic structure across the stratified water column of the Black sea. VII Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Екологія – філософія існування людства». 21.04.2021-23.04.2021, Київ (Україна) *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано експериментальну частину, проаналізовано одержані результати, написано тези).*
12. **Pavlovska M.**, Prekrasna Ie., Dzhulai A., Dykyi E. Antibiotic Resistance in Black Sea Microbial Communities. World Microbe Forum, American Society for Microbiology (ASM), Federation of European Microbiological Societies (FEMS). 20-24, 2021 <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/9286/presentation/10163> *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано експериментальну частину, проаналізовано одержані результати, написано тези).*

### Звіт з міжнародного проекту

13. **Pavlovska M.**, Prekrasna Ie., Dykyi E., Stoica E., Mosharova I., Dzhulai A. 2021. II.7. Microbial communities of the Black Sea. In Slobodnik J., Arabidze M., Mgeladze M., Korshenko A., Mikaelyan A., Komorin V., Minicheva G. (Eds.). EMBLAS Final Scientific Report (p.140 - 157) *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, виконано експериментальну частину, проаналізовано одержані результати, написано звіт та рекомендації).*

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ.....	24
ВСТУП.....	25
РОЗДІЛ 1. ЕКОЛОГІЧНІ ПРОБЛЕМИ ЧОРНОГО МОРЯ.....	34
1.1 Екологічні проблеми Чорного моря.....	34
1.2 Забруднення Чорного моря ксенобіотиками.....	35
1.3 Механізми стійкості мікроорганізмів до впливу ксенобіотиків .....	39
1.4 Проблема поширення генів антибіотикорезистентності мікроорганізмів ....	45
1.5 Використання даних метагеномного аналізу угруповань мікроорганізмів для оцінки екологічного стану водної товщі та донних осадів Чорного моря .....	49
1.6 Попередні дослідження угруповань мікроорганізмів Чорного моря .....	52
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	57
2.1 Відбір матеріалу для досліджень.....	57
2.3 Молекулярний аналіз.....	61
2.4 Біоінформатичний та статистичний аналіз.....	69
2.5 Розрахунок індексів екологічного стану Чорного моря на основі метагеномних даних.....	72
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ СТРУКТУРИ, РОЗПОДІЛУ ТА ЕКОЛОГІЧНОЇ ФУНКЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ ЧОРНОГО МОРЯ.....	75
3.1 Таксономічний та функціональний склад угруповань мікроорганізмів Чорного моря .....	75
3.1.1 Таксономічна структура угруповань бактеріопланктону Чорного моря ...	75
3.1.2 Функціональна структура угруповань бактеріопланктону Чорного моря.	90
3.1.3 Диференціація угруповань бактеріопланктону Чорного моря за таксономічною та функціональною структурою .....	100
3.2 Роль угруповань мікроорганізмів у процесі трансформації ксенобіотиків в екосистемі Чорного моря.....	104

3.2.1 Таксономічний склад угруповань прокаріотів, які було досліджено на предмет участі у процесі розкладу ксенобіотиків .....	105
3.2.2 Потенційна активність мікробних угруповань Чорного моря щодо розкладу ксенобіотиків .....	111
3.2.3 Реалізована активність мікробних угруповань Чорного моря щодо розкладу ксенобіотиків .....	118
3.3 Роль угруповань мікроорганізмів у поширенні генів антибіотикорезистентності в екосистемі Чорного моря .....	125
3.3.1 Копійність генів антибіотикорезистентності в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря .....	126
3.3.2 Поширеність маркерів фекального забруднення в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря .....	133
РОЗДІЛ 4. ВИКОРИСТАННЯ ДАНИХ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛІЗУ	
УГРУПОВАНЬ МІКРООРГАНІЗМІВ ЧОРНОГО МОРЯ .....	143
ДЛЯ ОЦІНКИ ЕКОЛОГІЧНОГО СТАНУ СЕРЕДОВИЩА .....	143
4.1 Розрахунок індексу тиску на навколишнє середовище ( $P_i$ ) для водної товщі та донних осадів Чорного моря .....	143
4.2 Розрахунок індексу $\text{microgAMBI}$ для угруповань мікроорганізмів водної товщі Чорного моря .....	147
4.3 Розрахунок індексу $\text{microgAMBI}$ для угруповань мікроорганізмів донних осадів Чорного моря .....	151
4.4 Порівняння значень індексу тиску на навколишнє середовище та індексу екологічного стану $\text{microgAMBI}$ .....	155
ВИСНОВКИ .....	160
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ .....	163
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	165

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

ANOSIM – Analysis of similarities (аналіз подібності)

ANOVA – Analysis of Variance (дисперсійний аналіз)

CTD – Conductivity-temperature-depth probe (зонд провідності-температури-глибини)

GES – Good Environmental Status (Добрий Екологічний Стан)

MSFD – Marine Strategy Framework Directive (Рамкова Директива Європейського Союзу про Морську стратегію)

Pi – pressure index (індекс екологічного тиску)

PICRUST – Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (Філогенетичне дослідження угруповань шляхом реконструкції неспостережуваних станів)

RHD – ring-hydroxylating dioxygenase (ароматична гідроксильююча диоксигеназа)

WFD – Water Framework Directive (Водна Рамкова Директива)

ГМХ – глибинний максимум хлорофілу

ГХЦГ – гексахлорциклогексан

ДМСП – диметилсульфопропієнат

ЕГ – Екологічна група

ЗКМ – зона кисневого мінімуму

ОТО – Операційна Таксономічна Одиниця

ПАВ – поліароматичні вуглеводні

ПЛР – Полімеразна ланцюгова реакція

ПХБ – поліхлорбіфеніли

ХОС – хлорорганічні сполуки



## ВСТУП

**Актуальність теми.** Водні екосистеми перебувають під постійним антропогенним тиском через експлуатацію ресурсів, транспортну активність, промислове забруднення, зростання попиту на офшорну енергетику тощо. Перераховані фактори призводять до надходження поллютантів, втрату біорізноманіття, інтродукцію інвазивних видів та руйнування оселищ. Чорне море є унікальним водним об'єктом напівзакритого типу, що перебуває під постійним потужним впливом річкового стоку з великих річок - Дунай, Дніпро та Дністер. До поверхневих вод Чорного моря надходить велика маса води з дренажного басейну, що включає регіони із сільськогосподарським та антропогенним впливом у континентальній Європі. Таке розташування та гідрологічні особливості визначають головні екологічні проблеми регіону - евтрофікація, надходження ксенобіотиків та сміття, втрата біорізноманіття, поширення антибіотикорезистентності та мікропластику. Повномасштабне воєнне вторгнення Російської Федерації на територію України зумовило поглиблення наведених екологічних проблем через надходження залишків токсичних вибухових речовин, нафтопродуктів, продуктів горіння та ракетного палива до річок чорноморського басейну.

Морська природоохоронна стратегія України, що була схвалена у відповідь на необхідність гармонізації національного моніторингу з практиками ЄС, визначає проведення регулярної екологічної оцінки вод Чорного моря, як пріоритет та базу для регулювання та планування природоохоронної діяльності в чорноморському регіоні. Проведення регулярної екологічної оцінки стану Чорного моря у відповідності до вимог Морської природоохоронної стратегії України, Водної Рамкової Директиви та Рамкової Директиви про морську стратегію ЄС дозволить отримати валідні дані для удосконалення моніторингу та природоохоронного менеджменту.

Екологічна оцінка стану морського середовища здійснюється з урахуванням дескрипторів, що включають хімічні, фізичні та біологічні компоненти.

Традиційно біологічний блок включає параметри еукаріотичних угруповань (фітопланктон та зоопланктон, фіто- та зообентос, риби, морські ссавці). Водночас угруповання мікроорганізмів не враховуються в екологічній оцінці стану навколишнього середовища, попри їх високе таксономічне та функціональне різноманіття, швидку відповідь на коливання середовища та повсюдну поширеність (Sun et al. 2013, Caruso et al. 2015, Lanzen et al. 2020). Це пов'язано із технічними проблемами детального обліку та оцінки мікроорганізмів морських вод та донних осадів. Однак, методи метагеномного секвенування відкривають нові можливості у дослідженні мікроорганізмів, що дає змогу розробляти методи оцінки екологічного стану навколишнього середовища з урахуванням цих даних.

Угруповання мікроорганізмів Чорного моря неодноразово ставали об'єктом досліджень, однак переважно вивчалися окремі таксономічні групи та їх функції в конкретних біогеохімічних циклах (Karl&Knauer 1991, Stoica & Herndl 2007, Michaelis et al. 2002, Fuchsman et al. 2011, Kirkpatrick et al. 2006, Lin et al. 2006, Oakley et al. 2007, Fuchsman et al. 2011, Kovalova et al. 2021).

Для розробки методів оцінки екологічного стану морського середовища з урахуванням мікробіологічних даних, необхідно, перш за все, провести детальне дослідження таксономічного різноманіття та функціональних особливостей угруповань мікроорганізмів, встановити закономірності їх розподілу та екосистемні функції. Подібні дані дають можливість планувати подальші специфічні дослідження екологічно важливих функцій, таких як біотрансформація ксенобіотиків.

Окремим важливим питанням оцінки екологічного стану є дослідження поширення антибіотикорезистентності в угрупованнях мікроорганізмів. Гени стійкості до антибіотиків визнані забрудниками середовища і становлять серйозну загрозу. Для чорноморського регіону дана проблема є особливо актуальною через гідрологічні особливості Чорного моря та через низький контроль призначення антибіотиків населенню (Prekrasna et al. 2022). Проведення скринінгу антибіотикорезистентності дозволить підтвердити

присутність даної проблеми у Чорному морі та виявити потенційні джерела надходження.

Таким чином, дані щодо таксономічної та функціональної структури мікроорганізмів дозволять доповнити традиційний моніторинг і виявити важливі екологічні проблеми. Однак, на даний момент існує гостра потреба у валідації методів метагеномного дослідження бактеріопланктону, як складової комплексного моніторингу стану екосистеми Чорного моря.

Саме тому є актуальним дослідження відповіді водної екосистеми Чорного моря на антропогенний вплив та вивчення механізмів його самовідновлення.

Актуальність даного дослідження полягає в наступному:

- можливості масштабного аналізу розподілу мікробних екологічних ніш та ролі мікроорганізмів у біогеохімічних циклах в унікальних умовах напівзакритої та постійно стратифікованої екосистеми Чорного моря;

- необхідності дослідити відповідь екосистеми Чорного моря на значний вплив забруднюючих речовин, що присутні у високих концентраціях та постійно надходять із річковим стоком;

- потребі провести скринінг поширення антибіотикорезистентості в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря з метою встановлення потенційних джерел надходження генів стійкості до антибіотиків, як одних із забрудників середовища;

- потребі проаналізувати доцільність використання метагеномних даних мікробіологічних досліджень в оцінці екологічного стану середовища та провести валідацію даного підходу.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дана робота була проведена здобувачем особисто під керівництвом кандидата біологічних наук Соломенко Л. І. та доктора біологічних наук Клепко А.В., у співпраці із Національним антарктичним науковим центром (Київ, Україна) та Українським науковим центром екології моря (Одеса, Україна). Дослідження проведено в рамках міжнародних проектів ЕМБЛАС-II (EMBLAS II – Environmental Monitoring in the Black Sea) та ЕМБЛАС+ (EMBLAS-Plus -

“Improving Environmental Monitoring in the Black Sea – Selected Measures”) за підтримки ПРООН, а також проекту “Екологічна оцінка впливу ксенобіотиків на біологічні системи водного середовища” (номер держреєстрації 0120U101299). На даний момент здобувач є Експертом з біорізноманіття (Biodiversity Expert) у проекті EU4EMBLAS (European Union for Improving Environmental Monitoring in the Black Sea), що присвячено вдосконалення моніторингу Чорного моря.

### **Мета і завдання дослідження.**

Метою даного дослідження є дослідити розподіл екологічних ніш мікроорганізмів, визначити їх роль у процесах самовідновлення морської екосистеми та оцінити можливості використання наведених даних у екологічній оцінці Чорного моря

### **Завдання:**

1. Вивчити таксономічне та функціональне різноманіття мікробоценозів водної екосистеми Чорного моря за даними метагеномного сиквенування
2. Дослідити закономірності розподілу угруповань мікроорганізмів в умовах унікальної напівзакритої стратифікованої екосистеми Чорного моря
3. Встановити екологічну роль мікроорганізмів в морських екосистемах, що піддаються впливу антропогенного навантаження на прикладі Чорного моря:
  - 3.1 Дослідити функціональну відповідь мікроорганізмів на надходження ксенобіотиків методом кількісної ПЛР
  - 3.2 Дослідити поширення генів антибіотикорезистентності у прибережних зонах та у відкритих водах методом кількісної ПЛР
4. Оцінити можливості використання метагеномних даних по таксономічному та функціональному різноманіттю мікроорганізмів в екологічній оцінці стану Чорного моря
5. Розробити та валідувати методологічні протоколи метагеномного аналізу для оцінки біорізноманіття екосистеми Чорного моря ...

**Об’єкт дослідження** – зміна структури угруповань мікроорганізмів Чорного моря під впливом градієнту фізико-хімічних умов та антропогенного навантаження.

**Предмет дослідження** – таксономічна та функціональна структура мікроорганізмів водної екосистеми Чорного моря та їх роль у процесах розкладу ксенобіотиків та перенесення генів антибіотикорезистентності.

**Методи дослідження.** Для виконання дослідження використовували загальнонаукові методи (аналіз, синтез тощо), а також методи екологічної метагеноміки, біоінформатичного та статистичного аналізу.

Відбір зразків здійснювався під час трьох дослідницьких рейсів в акваторії Чорного моря із застосуванням вакуумної фільтрації (Guevara Campoverde et al. 2018, Rodríguez-Gómez et al. 2021). Подальшу екстракцію ДНК та синтез комплементарної ДНК проводили із використанням комерційних наборів Qiagen (Німеччина) із дотриманням стандартних протоколів виробника. Для екстракції РНК було застосовано фенол-хлороформний метод (James E. McDonald 2000) із модифікаціями для покращення кількісних та якісних показників. Для встановлення таксономічного різноманіття угруповань мікроорганізмів використовували метагеномне секвенування ампліконів на платформах Illumina та IonTorrent.

Копійність та експресію генів розкладу ксенобіотиків та копійність генів антибіотикорезистентності визначали за допомогою ПЛР у реальному часі із використанням комерційного набору Qiagen (Німеччина) та системи для проведення ПЛР в реальному часі Qiagen QIAplex 5 (Німеччина).

Біоінформатичну обробку послідовностей проводили у програмному забезпеченні QIIME2 2019.1 (Caporaso et al. (2010), а статистичний аналіз - в R (R Core Development team) із використанням пакетів *vegan*, *corrplot* та *ggplot2*.

Індекси екологічного стану середовища (miroGAMBI) та екологічного тиску (Pi) розраховували аналогічно до Aylagas et al. (2017).

### **Наукова новизна одержаних результатів.**

*Встановлено:*

- В угрупованнях бактеріопланктону Чорного моря спостерігається вертикальна диференціація у відповідності до зміни фізико-хімічних умов середовища. В межах поверхні термоклину переважають таксономічні

групи, для яких властивий оксигенний фотосинтез та участь у розкладі ексудатів фітопланктону. Водночас із глибиною та зниженням концентрації кисню зростає роль дисиміляційної сульфат-редукції та дисиміляційного відновлення нітрату.

- У досліджуваних угрупованнях мікроорганізмів присутня вертикальна (географічна) диференціація, що, ймовірно, обумовлена регіональною різницею у видовому різноманітті та біомасі фітопланктону.

- Угруповання мікроорганізмів вод та донних осадів Чорного моря характеризуються потенційною та реалізованою активністю, спрямованою на розклад поллютантів, що сприяє зниженню концентрації менш стійких органічних забруднюючих речовин (біфеніл, нафтален,  $\alpha$ - та  $\gamma$ -ГХЦГ).

- У досліджуваних угрупованнях бактеріопланктону виявлено гени стійкості до антибіотиків, зокрема бета-лактамів, макролідів, глікопептидів та колістину. Показники копійності генів антибіотикорезистентності знаходяться в діапазоні, визначеному для мікробних угруповань р. Дунай і є вищими в районі північно-західного шельфу Чорного моря. Пропонується включити даний показник до екологічної оцінки стану Чорного моря.

- За індексом *microgAMBI* стан вод Чорного моря належить до категорії “добрий”. Винятком є 3 дослідні станції, для яких встановлено “задовільний”, “поганий” та “дуже поганий” стан. Екологічний стан донних осадів варіюється від “задовільного” до “поганого”, що узгоджується із вищими показниками активності мікробного угруповання у процесі розкладу поллютантів.

- Присутня кореляція між часткою *Actinomycetales*, *Halomonadaceae* та *Shewanella* в угрупованнях бактеріопланктону та гіршим екологічним станом вод. Аналогічно, вища частка *Anaerolineae* та *Dehalococcoidetes* корелює із погіршенням екологічного стану донних осадів. Частка даних таксонів в угрупованні може бути використана для індикації стану середовища, як додатковий показник.

*Уперше:*

- Проведено аналіз закономірностей вертикального та горизонтального розподілу угруповань мікроорганізмів в межах стратифікованого водного стовпа в різних ділянках акваторії Чорного моря
- Проведено дослідження копійності генів розкладу ксенобіотиків в мікробному угрупованні води та донних осадів Чорного моря
- Проведено аналіз експресії генів розкладу ксенобіотиків в мікробному угрупованні води та донних осадів Чорного моря
- Розраховано індекси microgAMBI та  $P_i$  для Чорного моря
- Розроблено методологічні рекомендації щодо метагеномного аналізу некультивованих мікроорганізмів Чорного моря

*Удосконалено:*

- Суттєво доповнено відомості щодо таксономічного та функціонального складу мікробних угруповань водної екосистеми Чорного моря
- Суттєво доповнено дані щодо поширення антибіотикорезистентності в угрупованнях мікроорганізмів акваторії Чорного моря

*Розроблено:*

- Методологічні протоколи метагеномного аналізу для оцінки біорізноманіття екосистеми Чорного моря в контексті оцінки екологічного стану водного середовища

**Практичне значення одержаних результатів**

Отримані результати значно розширили відомості щодо структури угруповань мікроорганізмів вод та донних осадів Чорного моря, що дає можливість для подальшої розробки методів оцінки стану навколишнього середовища з використання цих даних. Було виявлено проблему поширення антибіотикорезистентності в акваторії Чорного моря і запропоновано подальші шляхи моніторингу та дослідження джерел даного феномену. Копійність генів стійкості до антибіотиків є потенційним індикатором, що може бути

запропоновано для розширення національної програми моніторингу екологічного стану Чорного моря.

Було розраховано індекси екологічного стану вод та донних осадів Чорного моря на основі мікробних даних та проведено оцінку доцільності використання даних метагеномного аналізу мікроорганізмів у моніторингових дослідженнях.

Показано, що дані метагеномного аналізу мікроорганізмів можуть потенційно використовуватись для оцінки дескрипторів екологічного стану згідно вимог Рамкової Директиви про морську стратегію ЄС.

Запропоновано валідовані протоколи для оцінки різноманіття мікроорганізмів Чорного моря.

Результати дисертаційної роботи доцільно використовувати у ЗВО для підготовки екологів у навчальних курсах: «Моніторинг довкілля» (ОС «Бакалавр»),

#### **Особистий внесок здобувача.**

Дисертація є самостійною роботою автора. Здобувачем проведено метааналіз та опрацьовано 282 літературні джерела. Автором дисертації особисто здійснено планування роботи, розроблено протоколи польового відбору та аналізу, проведено польовий відбір матеріалу, молекулярно-генетичний аналіз (екстракцію ДНК, РНК, ПЛР у реальному часі, метагеномне секвенування), біоінформатичний та статистичний аналіз. Узагальнення даних та підготовка публікацій здійснено здобувачем особисто. Автором проведено обґрунтування, опрацювання висновків та написання тексту дисертації. Окремі факти та закономірності інтерпретувалися з урахуванням порад та консультацій наукового керівника. Друковані праці підготовлено особисто та у співавторстві.

**Апробація отриманих результатів досліджень.** Основні результати досліджень дисертації були представлені та обговорювалися на: Міжнародному симпозіумі The International Symposium on Protection of the Black Sea Ecosystem and Sustainable Management of Maritime Activities (PROMARE) - 7.09.2017 – 9.09.2017, Констанца (Румунія); VII Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих вчених "Екологія - філософія



існування людства", 21.04.2021-23.04.2021, Київ (Україна) та Міжнародному форумі World Microbe Forum, American Society for Microbiology (ASM), Federation of European Microbiological Societies (FEMS). 20.06.2021-24.06.2021.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано основні результати досліджень у 13 наукових працях. Зокрема, 3 статті у фахових виданнях України; 6 у наукових фахових виданнях інших країн, 5 з яких включено до міжнародних наукометричних баз даних; три тез та матеріалів конференції, 1 розділ у фінальному звіті міжнародного проекту ЕМБЛАС щодо екологічного стану Чорного моря.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається із анотації, вступу, чотирьох розділів, висновків, додатків, списку використаних джерел. Загальний обсяг роботи становить 202 сторінки. Дисертація містить 15 таблиць, 36 рисунків, 20 сторінок – додатки. У списку використаних джерел 287 найменувань, з них 286 – латиницею.

## РОЗДІЛ 1

### ЕКОЛОГІЧНІ ПРОБЛЕМИ ЧОРНОГО МОРЯ

#### 1.1 Екологічні проблеми Чорного моря

Чорне море є водоймою напівзакритого типу, що фактично ізольована від інших морських водойм і сполучена лише із Середземним морем через канал Босфор. 90% об'єму Чорного моря належить до безкисневої зони і лише поверхневий шар із глибинами до ~80 м містить кисень. До поверхневого шару надходить значна маса води із дренажного басейну, що включає регіони із сільськогосподарським та антропогенним впливом у континентальній Європі (Мее et al., 1992). Таким чином надходження річкового стоку привносить до морської екосистеми Чорного моря значну кількість алохтонного матеріалу, близько половини якого потрапляє з річки Дунай (Shimkus & Trimonis, 1974), а решта переважно з річок Дніпро та Дністер. Крім річкового стоку джерелами забруднення акваторії Чорного моря є аварії на танкерах, видобування нафти на морському шельфі та транспортування нафтопродуктів (Readman, 1999). Повномасштабні воєнні дії Російської Федерації, спрямовані проти України, зумовили появу низки нових ризиків для екосистеми Чорного моря. Так, суттєвий негативний вплив на екологічний стан Чорного моря справляє забруднення річок чорноморського басейну нафтопродуктами, залишками токсичних вибухових речовин, продуктами горіння, ракетного палива, що ймовірно матиме довгострокові наслідки (Афанасьєв 2023).

Зазначені фактори призводять до постійного забруднення Чорного моря, що загрожує біорізноманіттю через появу у морських організмів набутої та хронічної токсичності, акумуляцію в екосистемі, втрату оселищ і, в результаті, несе негативні наслідки для людського здоров'я. Особливу небезпеку становлять стійкі органічні забрудники (СОЗ), а саме такі речовини, як хлорорганічні пестициди, поліхлорбіфеніли, поліароматичні вуглеводні та ін. Використання

вказаних речовин заборонено у багатьох країнах через їх токсичність, стійкість та біоаккумуляцію. Проте, дані ксенобіотики досі становлять значну проблему через те, що залишаються у середовищі протягом тривалого часу після їх надходження (Dumoulin et al., 2013; Smith et al., 2009), спричиняючи негативний вплив на гідробіонтів та на харчові ланцюги в цілому (Sun et al., 2002).

Згідно останніх даних (Slobodnik et al. 2017) поточна екологічна та епідеміологічна ситуація в чорноморському регіоні є несприятливою, особливо у прибережних зонах (Slobodnik et al. 2017). Основними екологічними проблемами Чорного моря є: евтрофікація, забруднення ксенобіотиками, морське сміття та мікропластик, а також антибіотикорезистентність мікроорганізмів. Дані аспекти визначені, як одні з основних дескрипторів екологічного статусу морських водойм ЄС згідно Рамкової Директиви Морської Стратегії ЄС (Marine strategy Framework Directive).

## **1.2 Забруднення Чорного моря ксенобіотиками**

Стійкі органічні забрудники можуть вважатись постійними компонентами екосистеми Чорного моря, оскільки їх регулярно виявляли у зразках морської води протягом останніх 20 років. Так, аценафтен, пірилен, пірен, флуорантрен, фенанатрен, 1,2-бензопірен, 11,12- бензофлуорантрен та кризен, що відомі як канцерогенні ПАВ, було виявлено в Чорному морі Mee et al. (Mee et al. 1999). У 2002 році Readman et al. (Readman et al. 2002) було показано, що концентрація ПАВ у донних осадах Чорного моря є незначною, за винятком дослідних станцій розташованих у дельті Дунаю, Одеській бухті та дельті ріки Сочі, що пов'язують із вищим антропогенним навантаженням у цих ділянках акваторії.

У 1998 році Tunger et al. 1998 виявили, що з турецького узбережжя Чорного моря надходять хлоровані біфеніли та хлорорганічні пестициди. Ці дані було підтверджено дослідженнями Bakan et al. (Bakan et al. 2004), які показали наявність дихлордифенілтрихлоретану, олдріну, ліндану, а-гексахлоргексану, d-гексахлоргексану та гептахлор епоксиду у донних осадах вздовж турецького

узбережжя. Значні концентрації олдріну, діелдріну, гептахлор епоксиду, ліндану, сульфату ендосульфану та гексахлорбензолу було виявлено у зразках донних осадів, молюсків та морської води у дослідженні Ozkoc et al. (Ozkoc et al. 2007).

За даними, отриманими в рамках проекту ЕМБЛАС у 2017 році, органічні забруднюючі речовини, пестициди та ксенобіотики було виявлено, як у воді, так і в донних осадах в межах всього регіону досліджень. Так, концентрації важких металів в цілому не перевищували норму (EQS, встановлена Директивою ЄС 2013/39/EU), однак концентрація ртуті перевищувала норму на 63% станцій і становила 239 нг/л, 126 нг/л та 149 нг/л в межах північно-західного, східного шельфу та відкритих водах, відповідно (Slobodnik et al. 2017). Найвищі значення концентрацій важких металів спостерігались переважно в районі північно-західного шельфу і становили 90 нг/л для кадмію, 191 нг/л для свинцю, 1044 нг/л для нікелю, 1586 нг/л для арсену, 606 нг/л для хрому та 17235 нг/л для цинку. Забруднення важкими металами вважається однією з пріоритетних екологічних проблем, оскільки іони металів є стійкими до процесу мікробної деструкції (Bruins et al. 2000).

Загалом під час дослідницької експедиції ЕМБЛАС-2017 у зразках морської води було виявлено 80 різних видів забруднюючих речовин. Було виявлено тренд до зменшення, як кількості ксенобіотиків так і їх концентрації від шельфових зон до відкритих вод. Відповідно, найвищі концентрації та різноманітність ксенобіотиків було виявлено в районі дельти Дунаю (Slobodnik et al. 2017).

Під час дослідницького рейсу 2017 року у воді було виявлено 17 класів пестицидів. Так, пропазин та карбоксин було виявлено у всіх досліджених зразках у середній концентрації 3,8 та 4,0 нг/л, відповідно. Найбільш забрудненими виявились зразки зі станцій у дельті Дунаю та в Одеській бухті, в яких сумарна концентрація пестицидів становила 44 та 38 нг/л, і було виявлено 12 та 10 типів пестицидів відповідно. Більшість пестицидів було виявлено у зразках, відібраних в районі українського шельфу.

Високі значення концентрації ізомерів ПХБ спостерігались, як у прибережних, так і у відкритих водах і становили від 30,79 нг/л до 1079 нг/л (Slobodnik et al. 2017).

Сумарна концентрація ізомерів гексахлоргексану в морській воді перевищувала максимально допустимі концентрації на 29 із 33 досліджених станцій і становила від 0,13 нг/л до 46,83 нг/л. Тому було зроблено висновок, що присутність цих речовин в акваторії Чорного моря має підлягати регулярному моніторингу.

Беручи до уваги динаміку антропогенного навантаження на морське середовище було проведено скринінг на предмет пошуку нових пріоритетних забруднюючих речовин, концентрація яких раніше не підлягала моніторингу в чорноморському регіоні. Дане дослідження підтвердило, що дельта Дунаю є найбільш забрудненою ділянкою Чорного моря, оскільки ~50% виявлених там сполук були неприродного походження. Сумарна концентрація сполук промислового походження у дельті Дунаю була в 5 разів вищою (723 нг/л), ніж у відкритих водах (155 нг/л). Переважна більшість ксенобіотиків, як в прибережних районах, так і у відкритих водах, були індустріального та фармацевтичного походження (Рис. 1.1). У відкритих водах також було виявлено багато пестицидів.

Концентрація ксенобіотиків у зразках донних осадів була загалом вищою, ніж у морській воді (Slobodnik et al., 2017). Найбільш забрудненими виявились донні осади, відібрані на станціях в районі дельти Дунаю. В районі українського шельфу спостерігалось перевищення допустимих концентрацій хлорорганічних сполук, пірену, конгенерів поліхлорфбіфенілу. Сумарна концентрація хлорорганічних пестицидів варіювалась в межах від 0,34 мкг/кг (у відкритих водах) до 27 мкг/кг в районі дельти Дунаю. Діхлордіфенілдіхлоретілен (ДДЕ) зустрічався найчастіше і був присутній у 100% зразків донних осадів. Дихлордифенілтрихлорметилметан (ДДТ) характеризувався найвищою концентрацією, що становила 13 мкг/кг.

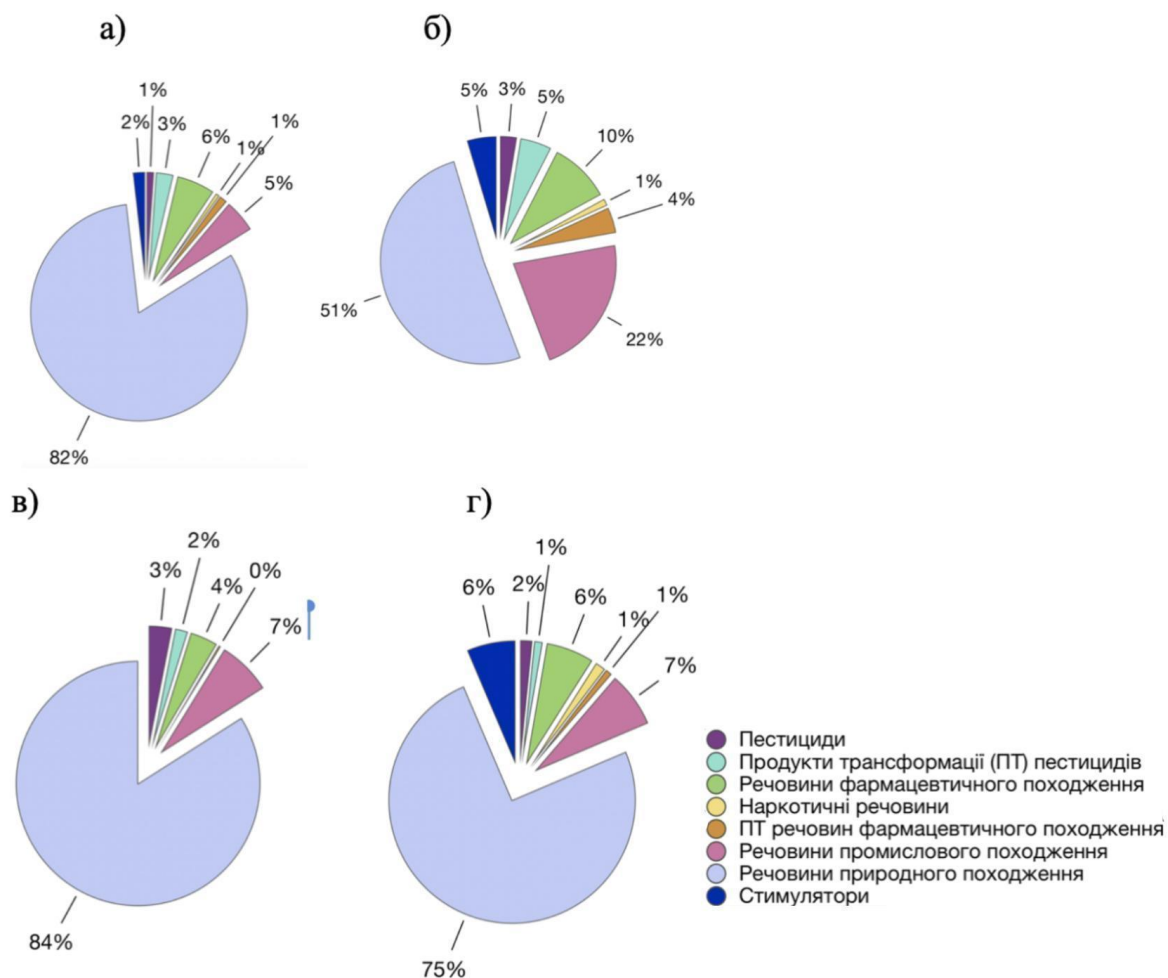


Рисунок 1.1 Розподіл класів забруднюючих речовин у зразках морської води Чорного моря: а) український шельф, б) дельта р. Дунай, в) відкриті води, г) східна частина Чорного моря

Серед ксенобіотиків, які раніше не підлягали моніторингу в акваторії Чорного моря, переважали пестициди (аметрин, дазомет, імазаметабенз-метил, нітенпірам та тебупірімфос). Найвищою виявилась концентрація в районі Одеської бухти. Аналогічно до морської води, концентрація та кількість ксенобіотиків зменшувалась від шельфу до відкритих вод.

У дослідженні донних осадів чорноморського шельфу Румунії було показано тенденцію до зростання концентрації важких металів у період з 2014 по 2020 рік. Так, концентрація свинцю підвищилась з 45,18 до 57,74 мкг/г, а ртуті з 3,29 до 5,88 мкг/г. Крім того станом на 2020 рік у донних осадах Чорного моря в районі м.Констанца (Румунія) було виявлено 11 небезпечних органічних сполук:

нафтален, аценафтен, флуорен, аценафтен, фенантрен, антрацен, флуорантен, пірен, бензо(а)антрацен і хризен. Найвищою була концектрація фенантену – 409,7 мкг/кг (Radulescu 2023).

З метою визначення джерел надходження стійких органічних поллютантів до акваторії Чорного моря було проведено розрахунки акумуляції поліхлориндibenзо-п-діоксинів та поліхлорованого дибензо-фурану (PCDD/F) у морській воді внаслідок надходження очищених та неочищених стічних вод. Було встановлено, що показник PCDD/F у очищених стічних водах, що скидаються до Одеської затоки, зріс від 0,104 до 5,604 (концентрацій токсичних еквівалентів), а у неочищених – від 0,768 до 2,414 г TEQ у період з 2007 по 2017 рік (Mykhailenko et al. 2023).

За сумарними значеннями ПХБ було проведено екологічну оцінку стану вод та донних осадів Чорного моря в окремих районах північно-західного шельфу. Сумарні значення ПХБ були в межах від 8,26 до 143,08 нг/дм<sup>3</sup> у воді, що свідчить про відповідність екологічного стану категоріям від “дуже доброго” до “задовільного”. Водночас у донних відкладах містилося від 11,8 – 75,0 нг/дм<sup>3</sup> ПХБ, що відповідає категоріям “добрий та “задовільний” (Denga et al. 2020).

### **1.3 Механізми стійкості мікроорганізмів до впливу ксенобіотиків**

Відомо, що постійне надходження ксенобіотиків до морського середовища призводить до зміни таксономічного та функціонального складу мікробних угруповань (Atlas & Hazen, 2011, Kostka et al., 2014). Мікробна деструкція та біологічний насос контролюють глобальні потоки поліароматичних вуглеводнів у морських екосистемах, за рахунок впливу на процеси седиментації частинок та вилучення через біоаккумуляцію (Duran & Laureau, 2016). У морському середовищі ПАВ зазвичай накопичуються та адсорбуються на розсіяній органічній речовині через свою гідрофобну планарну структуру з низькими розчинністю та летучістю (Duran & Laureau, 2016). Такі фізико-хімічні особливості продиктовані наявністю мінімум двох бензенових кілець.

Здатність до функціональної відповіді на забруднення середовища ксенобіотиками була показана для представників багатьох таксономічних груп, таких як  *$\alpha$ -Proteobacteria*,  *$\beta$ -Proteobacteria*,  *$\gamma$ -Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Clostridium* (Louvado et al 2015, Chakraborty & Das, 2016, Duran et al, 2016), які широко представлені у мікробних угрупованнях Чорного моря.

Прокаріоти, що здатні до деструкції органічних забруднюючих речовин можуть використовувати їх, як джерело вуглецю, або розкладати ксенобіотики без використання їх, як субстрату для росту, активуючі специфічні ферменти – ди- та монооксигенази (КФ 1.13) або дигідрохлорінази (КФ 4.5.1.1) (Habe & Omori, 2003, Muangchinda et al., 2014). Дані перетворення мають значну роль у процесі вилучення ксенобіотиків з харчових ланцюгів екосистеми, оскільки, утворені внаслідок мікробних трансформацій речовини, є часто менш токсичними, ніж вихідні сполуки (Fetzner, 2002, Muangchinda et al., 2014, Louvado et al., 2015, Isaac et al., 2015, Liu et al., 2015, Duran et al, 2016). Крім того, мікробне розщеплення довголанцюгових полімерних сполук на оліго- та мономери робить їх доступними для засвоєння іншими організмами.

В аеробних умовах першим кроком розкладу ПАВ є пряма інкорпорація кисню через дію моно- та диоксигеназ (КФ 1.14). Основними ферментами, що відіграють роль в цьому процесі, є диоксигенази, що включають гідроксильні групи до молекули субстрату (RHDs) (Pieper et al. 2004). Існують 2 групи ферментів RHD, які каталізують розклад ПАВ і відрізняються філогенетично – RHD грам-позитивних та грам-негативних бактерій (Kweon et al. 2008). Серед відомих генів RHD грам-негативних бактерій є *nagAc* від *Ralstonia sp. U2* та *nahAc* від *Pseudomonas sp. 9816-4*. До генів RHD грам-позитивних бактерій належить, зокрема *nidA* представників *Mycobacterium* (Wu et al. 2014). Механізм дії даної групи ферментів полягає у включенні двох молекул кисню до ароматичного кільця субстрату із подальшим формуванням цис-дигідродіолу, який перетворюється на катехол під дією дегідрогенази. Наступним кроком є розщеплення ароматичного кільця орто- та мета-шляхом, що супроводжується



утворенням аліфатичних продуктів, які включаються до основних метаболічних шляхів через цикл Кребса (Duran & Laureau 2016).

Монооксигенази, такі як цитохром P450 еукаріотів відіграють роль у детоксикації, а не в асиміляції ПАВ (Doyle et al. 2008). Механізм їх дії полягає у включенні одного атому кисню до ароматичного кільця субстрату, що призводить до формування оксиду арену. Подальшими модифікаціями є трансформація оксиду арену в дегідродіол за рахунок дії епоксидгідролази, або у фенол шляхом неензимного перегрупування (Haritash & Kaushik 2009).

Процес мікробної деструкції ПАВ в анаеробних умовах протікає значно повільніше і може проходити за двома механізмами: пряме карбоксилювання або метилювання із додаванням фумарату (Meckenstock et al. 2016). Процес карбоксилювання ароматичного кільця каталізується карбоксилазою (КФ 6.4.1), в той час, як метилювання проходить із залученням метилтрансферази (КФ 2.1.1) (Rabus et al. 2016, Meckenstock et al. 2016). Додавання фумарату каталізується нафтил-2-метил-сукцинат синтазою (КФ 4.1.99) (Meckenstock & Mouttaki 2011). Подальша мікробна деструкція проходить шляхом  $\beta$ -окиснення (Meckenstock et al. 2016).

Здатність до деструкції ПАВ була показана для багатьох бактерій, проте відомо, що в регіонах із хронічним забрудненням ксенобіотиками існують специфічні угруповання мікроорганізмів, що адаптовані до даних умов. Такі угруповання було ідентифіковано в донних осадах прибережних зон (Duran et al. 2015a; Misson et al. 2016), в осадах та воді зон ураження нафтовими розливами (Stauffert et al. 2013; Kimes et al. 2014). Нещодавнє масштабне дослідження виявило, що угруповання мікроорганізмів Середземного моря відрізняються між чистими та хронічно забрудненими локаціями (Bargiela et al. 2015). Серед таксономічних груп, представники яких здатні до розкладу ксенобіотиків і мають відповідні специфічні метаболічні шляхи: *Maribaculum*, *Novosphingobium*, *Oceanibaculum*, *Parvibaculum*, *Roseovarius* та *Stappia* у морському глибоководному середовищі та *Oceanicola*, *Parvibaculum*, *Nitrateductor*, *Celeribacter* та *Bowmanella* у донних осадах (Louvado et al. 2015).

Процес мікробної деструкції органічних забруднюючих речовин досліджувався переважно на таксономічних групах, які легко піддаються культивуванню, таких як *Pseudomonas* spp. та *Rhodococcus* spp (Habe & Omori, 2003; Isaac et al., 2015, Nwinyi et al., 2016, Ma et al., 2012). Проте відомо, що 95% морських мікроорганізмів, що потенційно мають механізми розщеплення ксенобіотиків, не ростуть в культурі і можуть бути досліджені лише молекулярно-генетичними методами (Berglund, 2015, Kim et al., 2018).

Окремим питанням є роль мікробних угруповань у розкладі поліхлорованих біфенілів (ПХБ), що характеризуються високою стабільністю. Типовим є розклад цих сполук з відщепленням мета та пара хлору та утворенням орто заміщених хлорбіфенілів, проте даний процес відрізняється у конгенерів ПХБ (Wiegel and Wu, 2000).

Здатність до розкладу ПХБ була показана для наступних анаеробних груп мікроорганізмів: *Desulfuromonas* (Krumholz, 1997), *Dehalobacter* (Holliger et al., 1998, Yoshida et al. 2009), *Dehalococcoides* (Maymo-Gatell et al., 1999, Ewald et al. 2020) та *Sulfospirillum* (Boyle et al., 1999). Так, *Desulfuromonas chloroethenica* sp. nov., ізольовані з прісноводних донних осадів були здатні до використання трихлоретилену та тетрахлоретилену, як акцепторів електронів (Krumholz, 1997). У дослідженні мікрокосму було виявлено, що анаеробний розклад бактеріями *Dehalococcoides* призвів до зниження концентрації ПХБ-118 на 70% за 430 днів. Водночас, було зафіксовано зростання копійності генів, що відповідають за відновне галогенування у *Dehalococcoides mccartyi* (Ewald et al. 2020). Дослідження на культурі *Dehalobacter* експериментально засвідчили здатність даних мікроорганізмів до розкладу 2,3,4,5-тетрахлорбіфенілу, 2,3,4-трихлорбіфенілу та 1,2,3-трихлордібензо-р-діоксину (Yoshida et al. 2009). Проте в цілому про відновне дегалогенування ПХБ, його молекулярні механізми та поширення генів, які відповідають за це, відомо недостатньо, оскільки мікроорганізми, залучені до цього процесу дуже важко піддаються культивуванню (Peeper&Seeger 2008).

До аеробних мікроорганізмів, здатних до розкладу ПХБ, належать представники *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Sphingomonas*, *Acidovorax*, *Rhodococcus* та *Bacillus* (Peeper & Seeger 2008). За процес аеробного розкладу ПХБ відповідають негемові залізовмісні оксигенази (КФ 1.13), які каталізують включення двох атомів кисню до ароматичного кільця з утворенням арен цис-діолу (Gibson & Parales, 2000).

Процес ефективного розкладу ПХБ автохтонним угрупованням морських мікроорганізмів був експериментально показаний у зразках донних осадів з Іонічного моря (Maturro et al. 2015), а також з Адріатичного моря (Rosato et al. 2019). У всіх анаеробних мікрокосмах з донними осадами Іонічного моря за 70 днів інкубації було виявлено зниження концентрації гепта-, гекса- та пентахлорованих біфенілів з одночасним зростанням концентрації три- та тетрахлорованих біфенілів. Водночас, на 83.62 % зросла копійність генів 16S рРНК *Dehalococcoides* (Maturro et al. 2015). У дослідженні Rosato et al. було експериментально показано зниження токсичності ПХБ за рахунок метаболізму угруповання мікроорганізмів асоційованих із часточками мікропластику. За період інкубації тривалістю 2 тижні середня кількість атомів хлору на молекулу біфенілу знизилась з 5,2 до 4,3 за рахунок відновного дехлорування, водночас зросла частка *Dehalococcoidia* (Rosato et al. 2019).

Гени розкладу ПХБ часто розташовані на мобільних генетичних елементах і можуть, таким чином, швидко поширюватись між мікробними геномами, забезпечуючи відповідь угруповання мікроорганізмів на зростання концентрації забруднення (Gibson & Parales, 2000).

На розклад пестицидів у морському середовищі впливає багато факторів, таких як: структура пестицидів (молекулярна маса, просторова структура, тип заміснювача) (Mahro et al. 2014) та параметри навколишнього середовища (температура, солоність, рН, концентрація кисню, вуглекислого газу та субстрату) (Sartoros et al. 2015, Huang et al. 2018), адже дія ферментів бактерій залежить перш за все від оптимальної температури, рН та концентрації субстрату.

У процесі мікробного розкладу пестицидів у першій фазі залучено 3 основні групи ферментів: гідролази (КФ 3), естерази (КФ 3.1) та оксидази зі змішаною функцією. У другій фазі ключову роль відіграє група глутатіон-S-трансфераз (КФ 2.5.1.18) (Ortiz-Hernández et al. 2013). Вказані групи ферментів каталізують такі метаболічні реакції, як гідроліз, окиснення, окиснення аміногрупи ( $\text{NH}_2$ ) до нітрогрупи, включення гідроксильної групи до бензенового кільця, дегалогенація, заміщення сульфуру киснем, розщеплення ароматичного кільця тощо.

В цілому процес розкладу пестицидів можна поділити на 3 фази. Під час першої фази молекули субстрату зазнають модифікацій через окиснення, відновлення чи гідроліз, внаслідок чого утворюється нова сполука, яка є зазвичай краще розчинною у воді та менш токсичною (Ortiz-Hernández et al. 2013). Друга фаза полягає у кон'югації сполуки пестициду чи його похідної з цукром чи амінокислотою, що покращує її розчинення у воді та знижує токсичність. Протягом третьої фази відбувається перетворення метаболітів на вторинні кон'югати, які не є токсичними. Роль мікроорганізмів у цих процесах полягає у продукуванні відповідних ферментів – гідролаз, оксигеназ, пероксидаз (КФ 1.11.1) тощо (Huang et al. 2018).

Згідно багатьох досліджень представники роду *Pseudomonas* є найефективнішими в плані мікробної деструкції органічних забруднюючих речовин, в тому числі пестицидів. Було показано, що *Pseudomonas* можуть розкладати гербіцид арохлор 1242 на 99,8% (Ortiz-Hernández et al. 2013). Здатність до розкладу хлорпірифосу, гліфосату, паратіон-метилу, монокротофосу, паратіону (Verma et al. 2014, Upadhyay et al. 2017), кумафосу (Upadhyay et al. 2017), ДДТ, діазінону, діедрину, ендосульфану та ендріну (Verma et al. 2014) була також експериментально показана для представників *Bacillus*. Представники *Alcaligenes* здатні до розкладу хлорпірифосу (Verma et al. 2014) та ендосульфану (Verma et al. 2014, Upadhyay et al. 2017), а *Flavobacterium* - діазінону, гліфосату, паратіон-метилу, паратіону (Verma et al. 2014). Проте, лише комбіновані консорції мікроорганізмів здатні до ефективного розкладу пестицидів за короткий проміжок часу (Verma et al. 2014).

На відміну від органічних забруднюючих речовин, важкі метали не підлягають деструкції за рахунок хімічних та біологічних процесів, лише трансформації у менш токсичну форму (Ayangbenro & Babalola 2017). Серед адаптаційних механізмів, які розвинулись у мікроорганізмів, що існують в забрудненому токсичними металами середовищі, здатність до біосорбції, біоаккумуляції, біотрансформації та біомінералізації.

Одним з механізмів детоксикації є зміна валентності металів шляхом ферментативного відновлення. Так, ртуть органічна ліаза (КФ 4.99.1.2) – фермент стійких до ртуті бактерій, трансформує метилртуть у двовалентну руть (Hg (II)), токсичність якої в сотню разів нижча (Wu 2009). Іншим механізмом є зв'язування токсичних металів з метал-тіонеїновими білками (Прекрасна 2016), похідними глутатіону, такими як фітохелатин. Ці хелатори зв'язуються з токсичними металами і сприяють мікробній адсорбції та транспорту іонів металів. Також, можливим механізмом є трансформація металів у леткий стан, що стосується лише селену Se та ртуті Hg. Бактеріальний фермент *MerA* забезпечує перехід Hg(II) до легкої форми Hg(0) (Wu 2009). Існує досвід застосування процесу мікробного відновлення Se(V) до Se(0) з метою ремедіації забруднених вод та ґрунтів (Siddiquee et al. 2015). Стійкість до токсичних металів була експериментально показана для представників роду *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*), а також для *Brevibacterium casei* (Прекрасна 2016). Авторами було встановлено, що мікроорганізми здатні рости за 1300–30000 мг/л Cu<sup>2+</sup>, 100–5000 мг/л Co<sup>2+</sup>, 300–2000 мг/л Cr(VI), 200–1500 мг/л Ni<sup>2+</sup> та 10–100 мг/л Hg<sup>2+</sup> (Прекрасна 2016).

#### **1.4 Проблема поширення генів антибіотикорезистентності мікроорганізмів**

Окремою екологічною проблемою чорноморського регіону є надходження антибіотиків до прибережних вод разом із річковим стоком (Slobodnik et al. 2017). Надходження антибіотиків до морського середовища сприяє поширенню

явища антибіотикорезистентності, через яка патогенні бактерії стають нечутливими до дії антимікробних засобів, що, в свою чергу, призводить до появи стійких, часто летальних інфекційних хвороб. Згідно даних Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я антибіотикорезистентність є однією з найбільших загроз глобальній системі охорони здоров'я, а тому гени стійкості до антибіотиків можуть самі вважатися забрудниками (WHO: Global action plan on antimicrobial resistance).

В контексті антибіотикорезистентності найбільшу небезпеку становить поширення генів стійкості до антибіотиків, оскільки вони можуть швидко передаватися між мікроорганізмами, навіть між філогенетично віддаленими групами, шляхом горизонтального перенесення, що призводить до змін фенотипу патогенних бактерій від не резистентного до резистентного (Pruden et al., 2006). Саме тому гени антибіотикорезистентності вважаються пріоритетними забрудниками, які виявляють, як в клінічному, так і в природному середовищі.

Механізми стійкості мікроорганізмів до антибіотиків залежать від класу речовин, тому доцільно їх розглядати саме з точки зору кожного типу антимікробних засобів. Основними класами антибіотиків, що широко використовуються на даний момент є пеніциліни, цефалоспорини, монобактами, макроліди, глікопептиди та колістин (WHO: Global action plan on antimicrobial resistance).

Беталактами, до яких належить пеніцилін, є антибіотиками широкого спектру, які використовують для лікування низки інфекцій, викликаних, як грам-негативними, так і грам-позитивними бактеріями (Lachmaur et al., 2009). Майже 2/3 усіх антимікробних препаратів, які застосовуються наразі, належить до беталактамів. Група бактеріальних генів *blaCMY*, *blaTEM* та *blaSHV* відповідають за інактивацію антибіотиків даного класу. Вказані гени кодують широкий спектр беталактамаз (КФ 3.5.2.6) – ферментів, які відповідають за інактивацію циклічної структури беталактаму (Lachmaur et al., 2009, Uyaguari et al., 2011), позбавляючи його таким чином антибактеріальних властивостей. Беталактамази було ідентифіковано у більшості досліджених таксонів бактерій,

за винятком деяких ентерококів та сальмонел (Hsieh, 2000). Першопочатково вважалося, що гени беталактамаз можуть знаходитись винятково в межах бактеріальних хромосом, однак нещодавно їх було ідентифіковано на плазмідах. Це означає, що гени стійкості до беталактамаз можуть швидко поширюватись в межах угруповань мікроорганізмів.

Макроліди – антибіотики, що пригнічують синтез білку в бактеріальній клітині за рахунок зв'язування з 50S субодиницею рибосоми. До цього класу належать еритроміцин, рокситроміцин, азитроміцин та кларитроміцин, які призначають для лікування респіраторних та атипових мікобактеріальних інфекцій. Поширеність резистентності *Streptococcus pneumoniae* до дії еритроміцину та інших макролідів постійно зростає по всьому світу (Syrogiannopoulos et al. 2001, Baquero et al. 1999, Doern et al. 1998, Song et al. 1999). Дія *erm(B)* метилази (КФ 2.1.1.184) лежить в основі стійкості бактерій до макролідів. Механізм резистентності до даного класу антимікробних речовин полягає у метилюванні залишків аденіну на 23S рРНК, що призводить до порушення зв'язування макролідів, лінкозамідів та стрептограміну В із їх цільовою ділянкою 50S субодиниці рибосом.

Глікопептиди, до яких належить ванкоміцин, пригнічують синтез клітинної стінки грам-позитивних бактерій шляхом зв'язування з С-кінцевою частиною прекурсорів пентапептиду пептидоглікану (Perichon & Courvalin, 2000, Reynolds et al., 1989). Цей клас антибіотиків активний проти грампозитивних аеробних та анаеробних бактерій, таких як: стафілококи, стрептококи, пневмококи, ентерококи, пептострептококи, корінебактерії та клостридії. Ванкоміцин використовували для лікування інфекцій, спричинених метицилін-резистентним *S. aureus*, однак це призвело до виникнення стійких до ванкоміцину штамів *S. aureus*. Механізм стійкості до ванкоміцину полягає у синтезі нової таргетної ділянки із обмеженою здатністю до зв'язування з глікопептидами. Специфічні оперони (*VanA, B, C, D, E, G, L*) кодують д-аланін-р-лактат лігазу (КФ 6.1.2.1), що змінює таргетну ділянку (пептидоглікан) ванкоміцину. Продукт цього ферменту, депсипептид д-аланін-р-лактат, може бути інкорпорований до

пентапептиду пептидоглікану, заміщуючи звичайний д-аланіл-д-аланін дипептид (Leclercq et al. 1988, Périchon & Courvalin, 2000, Uttley et al. 1988). Змінений таким чином пептидоглікан не зв'язується із глікопептидним антибіотиком ванкоміцином, що забезпечує резистентність мікроорганізмів.

Колістин – це антимікробний препарат, що вважається терапією проти полірезистентних мікроорганізмів, таких як *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* та *Klebsiella pneumonia* (Nation & Li, 2009). Дія колістину спрямована на зовнішню мембрану грам-негативних бактерій. Даний антибіотик зв'язується із ліпополісахаридами в зовнішній мембрані бактеріальної клітини, що призводить до збільшення її проникності і викликає витік внутрішньоклітинного вмісту, і, як результат, смерть (Nation & Li, 2009, Payne et al., 2007). Протягом останніх десятиліть постійно надходять повідомлення про стійкість окремих штамів бактерій до колістину (Antoniadou et al. 2007) через нецільове використання цього антимікробного препарату (Falagas & Kasiakou, 2006). Найпоширеніший механізм стійкості до колістину полягає у модифікуванні зовнішньої мембрани шляхом зміни ліпополісахаридів, зокрема через активніше продукування капсульних ліпополісахаридів. Аналогічно до генів стійкості до інших класів антибіотиків, проблемою є передача генів стійкості до колістину через плазмід.

Антропогенний тиск може значним чином сприяти поширенню генів стійкості до антибіотиків у навколишньому середовищі. Було показано, що набуття мікроорганізмами генів резистентності пов'язано із забрудненням середовища антибіотиками, біоцидами та токсичними металами (Baquero et al. 2008). Цей ефект посилюється через забруднення навколишнього середовища мікроорганізмами людського та тваринного походження (такими, як фекальна мікробіота) чи стічними водами (Baquero et al. 2008). Гени антибіотикорезистентності поширюються, як між патогенними, так і між непатогенними бактеріями і тривалий час існують у середовищі, навіть, коли антибіотик відсутній (Martinez et al. 2009). Водночас, багато бактерій, що присутні в певному середовищі і не викликають хвороби людини, можуть



містити гени стійкості до антибіотиків і передавати їх латерально потенційно патогенним мікроорганізмам, що призводить до непрогнозованих спалахів інфекцій (Uyaguari et al. 2011).

Водні екосистеми вважаються резервуарами антибіотикорезистентних мікроорганізмів (Xi et al. 2009). Забруднення морського середовища антибіотиками є причиною перетворення його на осередок поширення генів стійкості до антибіотиків (Lachmayr et al. 2007, Economou et al. 2015, Berglund et al. 2015).

За результатами проекту ЕМБЛАС у 2016 та 2017 році було виявлено присутність біоцидів у водній товщі Чорного моря (Slobodnik et al. 2017). Враховуючи ці дані, а також стрімке поширення антибіотикорезистентності у чорноморських країнах (Ears-net, 2014), оцінка поширення генів стійкості до антибіотиків серед угруповань мікроорганізмів Чорного моря є одним з пріоритетних напрямків досліджень та підлягає регулярному моніторингу.

### **1.5 Використання даних метагеномного аналізу угруповань мікроорганізмів для оцінки екологічного стану водної товщі та донних осадів Чорного моря**

Водна Рамкова Директива визначає *екологічний стан* водного об'єкта, як “вираження якості структури і функціонування водних екосистем, пов'язаних з поверхневими водами, класифікованими відповідно до біологічної складової якості, а також гідроморфологічної, хімічної та фізико-хімічної складових якості, які підтримують біологічну” (WFD).

За Рамковою Директивою про морську стратегію екологічний *стан* - це “загальний стан морського середовища з урахуванням структури, функції та процесів морських екосистем, включно з природними фізико-географічними, географічними, біологічними, геологічними та кліматичними факторами, а також з фізичними, акустичними та хімічними умовами, що виникають, зокрема, в результаті людської діяльності” (MFSD).

Водна Рамкова Директива про морську стратегію пропонує визначати екологічний стан поверхневих вод за шкалою з 5 категорій: відмінний, добрий, задовільний, поганий та дуже поганий. За Рамковою Директивою про морську стратегію межа між “гарним екологічним станом” (GES) та поганим екологічним станом (non-GES) проходять між категоріями “добрий” та “задовільний” (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

**Екологічний стан водної екосистеми за Водною Рамковою Директивою та за Рамковою Директивою про морську стратегію**

<b>Екологічний стан за Водною Рамковою Директивою</b>	<b>Екологічний стан за Рамковою Директивою про морську стратегію</b>
Відмінний	GES
Добрий	
Задовільний	non-GES
Поганий	
Дуже поганий	

Згідно Рамкової Директиви про морську стратегію оцінка екологічного стану морського середовища здійснюється з урахуванням 11 дискрипторів, що охоплюють біологічні, хімічні та фізичні параметри. Традиційно, оцінка біологічних дискрипторів ґрунтується на аналізі угруповань еукаріотичних організмів - фітопланктону та фітобентосу, зоопланктону та зообентосу, риб та морських ссавців. Однак таксономічні та функціональні параметри мікроорганізмів не враховуються у традиційній оцінці екологічного стану морських екосистем (Caruso et al., 2015, Aylagas et al. 2017). Водночас, бактерії водної товщі та донних осадів є чутливими до природних та антропогенних змін середовища і реагують на них швидко, модифікуючи таксономічне різноманіття, фізіологічні та функціональні особливості (Sun et al., 2013, Zhang et al., 2014, Stoeck & Pawlowski, 2018a). Так, за даними Laroche et al. (2018) бактерії є

чутливішим індикатором стану навколишнього середовища, ніж макробентос. Причиною обмеженого використання мікроорганізмів, як індикаторів стану навколишнього середовища є складність їх угруповань і проблематичність повноцінного таксономічного аналізу (Aygalas et al. 2017).

Розвиток технологій метагеномного аналізу дозволив його використання в оцінці та моніторингу угруповань мікроорганізмів, включно зі значною часткою некультивованих (Caruso et al. 2015). Екологічна геноміка дозволила розробку потенційних індикаторів стану навколишнього середовища на основі даних щодо поширеності, розподілу та функціональних характеристик угруповань мікроорганізмів, що виконують важливі екосистемні функції (Lanzen et al. 2020). Екологічна оцінка стану водних екосистем за параметрами мікробних угруповань ґрунтується на класифікації бактерій на окремі екологічні групи (ЕГ) на основі їх аутоекологічних особливостей (взаємодії окремих таксонів із навколишнім середовищем та антропогенним впливом) (Lanzen et al. 2020).

Індекси екологічного стану середовища на основі метагеномних мікробіологічних даних - *microgAMBI* було застосовано у дослідженні донних осадів Біскайської затоки Aygalas et al. 2017. Було показано, таксономічна структура угруповання мікроорганізмів різниться в залежності від екологічного стану середовища. Так, частка *Desulfobulbaceae* (7,3 - 21,6%), *Comamonadaceae* (8,1 - 27,4%), *Flavobacteraceae* (7,9 - 23,1%), та *Helicobacteraceae* (12,1 - 41,7%) була значно вищою у зразках з поганим та задовільним екологічним станом (Aygalas et al. 2017). Також, було показано позитивну кореляцію між *microgAMBI* та індексом антропогенного тиску на середовище, що розраховувався на основі даних хімічного забруднення. Значення *microgAMBI* корелювали із показниками *AMBI* - індексу якості середовища за таксономічним складом угруповань безхребетних (Aygalas et al. 2017).

Масштабну оцінку застосування ефективності *microgAMBI* для екологічної оцінки було проведено Vorja et al. (2018) із використанням зразків води та донних осадів з широким географічним охопленням, що включало регіони з полярним, тропічним і помірним кліматом на Алясці, в Антарктиді, Китаї, Кореї та Індії.

Було показано, що води Аляски характеризуються “відмінним” екологічним станом зі значеннями *microgAMBI* - 0,85 - 0,57 та високою часткою (86 - 91%) чутливих мікробних таксонів, а донний мул в районі скиду відходів нафтопереробної промисловості в Пекіні, Китай, мав “поганий” екологічний стан, *microgAMBI* - 4,0 - 4,8 із високою часткою опортуністичних таксонів мікроорганізмів (60 - 77%) (Borja et al. 2018). У Корей, в районі острова Чеджу, середовище характеризувалось екологічним станом від “доброго” (*microgAMBI* = 1,83) у відкритих водах Жовтого моря до “дуже поганого” у прибережних районах, в місцях інтенсивного надходження ґрунтових вод (*microgAMBI* = 6). У водах Антарктики спостерігався градієнт від “поганого” (*microgAMBI* = 5) екологічного стану у районі з високим ступенем евтрофікації до “доброго” (*microgAMBI* = 0,8) екологічного стану у бухті Атлас, що була найменш порушеним регіоном у дослідженні. Проміжні точки характеризувались “задовільним” екологічним станом. Таким чином, було показано, що індекс екологічного стану *microgAMBI* дає репрезентативні результати, що віддзеркалюють ступні порушення екосистеми.

Використання даних метагеномного аналізу щодо таксономічної та функціональної структури угруповань мікроорганізмів для моніторингу морських екосистем є перспективним напрямком, оскільки дозволяє суттєво доповнити традиційну морфо-таксономічну оцінку і не потребує такого рівня реплікації, як аналіз еукаріотичних бентосних угруповань (Muxika & Rodríguez-Ezpeleta, 2018). Водночас, розвиток та впровадження даної методології у регулярний моніторинг потребує додаткових досліджень та валідації існуючих індексів в оцінці регіональних водних екосистем.

## **1.6 Попередні дослідження угруповань мікроорганізмів Чорного моря**

Угруповання мікроорганізмів Чорного моря неодноразово ставали об’єктом досліджень, як культуральними, так і молекулярно-генетичними методами через

унікальні умови напівзакритої стратифікованої екосистеми Чорного моря. Значну увагу було приділено аналізу таксономічного та функціонального різноманіття прокаріот фотичної зони. Так, Карл та Кнауер (Karl & Knauer 1991) було досліджено роль мікроорганізмів у кругообігу вуглецю в межах Західного басейну Чорного моря. Було показано, що бактеріальна фотоавтотрофна продукція була зосереджена у верхньому шарі водного стовпа (до глибини 55 м). Гетеротрофна продукція значно перевищувала автотрофну і становила  $260 \text{ mg C m}^{-2} \text{ день}^{-1}$  в межах фотичного шару і  $6 \text{ mg C m}^{-2} \text{ день}^{-1}$  на межі кисневої та безкисневої зони.

У роботі Aytan et al. (Aytan et al. 2018) було досліджено склад біомаси та трофічні зв'язки угруповань планктону Південно-східної частини чорноморського узбережжя. Було виявлено сезонну динаміку ролі автотрофних та гетеротрофних представників планктону у циклі вуглецю. Так, у грудні гетеротрофи (бактеріопланктон) становили основне джерело вуглецю для консументів першого порядку (мікрозоопланктон), а у лютому - автотрофи, представлені переважно дінофлагелятовими та діатомовими водоростями.

Динаміку угруповань бактеріопланктону під час явища цвітіння фітопланктону було показано у дослідженні Stoica and Herndl у 2007 (Stoica & Herndl 2007). Було встановлено, що представники  $\alpha$ -протеобактерій (переважно *Roseobacter*) та  $\gamma$ -протеобактерій домінують в угрупованні прокаріот під час цвітіння кокколітофорових водоростей і тісно пов'язані із динамікою *Emiliania huxleyi* в Чорному морі.

У 2015 році Merkel et al. було проведено аналіз угруповань архей фотичної зони в районі континентального шельфу біля м. Геленджик. Найчисельнішими виявились представники філогенетичних кластерів Marine Group II (*Euryarchaeota*) та Marine Group I (*Thaumarchaeota*).

Оскільки Чорне море є одним з найбільших меромістичних басейнів світу багато досліджень було зосереджено на аналізі розподілу прокаріот зони кисневого мінімуму (ЗКМ) та сірководню, оскільки вони мають альтернативні метаболічні шляхи, що залучені до біогеохімічних колообігів вуглецю (Michaelis

et al. 2002, Fuchsman et al. 2011), азоту (Kuypers et al. 2003, Kirkpatrick et al. 2006, Lin et al. 2006, Oakley et al. 2007, Fuchsman et al. 2011, Fuchsman et al. 2012) та сульфур (Grote et al. 2008, Fuchsman et al. 2011).

У роботах Michaelis et al. (Michaelis et al. 2002), Wakeham et al. (Wakeham et al. 2003), Boetius et al. (Boetius et al. 2000) було досліджено процес анаеробного окиснення метану. Окиснення метану відбувається, як аеробним, так і анаеробним шляхом у водній товщі Чорного моря. Метанотрофи I та II типу беруть участь у аеробному окисненні метану в межах насичених киснем вод, в той час, як мікроорганізми, що належать до груп ANME-1 та ANME-2 здатні до анаеробного окиснення метану в консорції із сульфатредуючими бактеріями в безкисневій зоні та в донних осадах (Boetius et al. 2000; Michaelis et al. 2002; Edith Durisch-Kaiser et al. 2005).

Вивчення біогеохімічного кругообігу азоту в безкисневій зоні Чорного моря було основним напрямом досліджень мікробних угруповань даного водного об'єкту протягом останніх 10-15 років, оскільки нітрифікація та анаеробне окиснення амонію мають глобальне екосистемне значення. Одне з перших повідомлень про процес анаеробного окиснення амонію було зроблено в рамках досліджень Чорного моря (Kuypers et al. 2003) і показало широке поширення та важливе значення анамокс-бактерій у циклі азоту. У 2007 році масштабна робота Lam et al. показала, що, як археї, так і бактерії залучені до процесу анаеробного окиснення амонію в межах зони кисневого мінімуму в Чорному морі (Lam et al. 2007). Також було показано, що в межах безкисневої зони, за умови дуже низьких концентрацій кисню, археї можуть бути важливим джерелом нітриту для реакцій анаммокс (Coolen et al. 2007).

Роль представників *Epsilonproteobacteria* та *Gamma proteobacteria* у первинній продукції та циклі сульфур в безкисневій зоні Чорного моря було продемонстровано у роботах Grote et al (Grote et al. 2009) та Glaubitz et al. (Glaubitz et al. 2010).

Так, було показано, що представники *Sulfurimonas* та кластеру сульфур-окиснюючих гаммапротеобактерій (GSO) мають ключову роль в окисненні

сульфуру та фіксації вуглецю у зоні кисневого мінімуму (Grote et al. 2009 and Glaubitz et al. 2010). У дослідженні Wakeman et al. (Wakeman et al. 2003) було відмічено значне поширення представників архей, а саме *Crenarchaeota* та *Euryarchaeota*, у ЗКМ, що свідчить про їх важливу роль у хемоавтотрофних процесах.

Угруповання мікроорганізмів Чорного моря, що населяють зону між кисневою та ЗКМ, та їх різноманітний метаболізм було вперше систематично охарактеризовано у 2003 році у роботі Vetriani et al. Основними таксономічними групами були *Gamma*proteobacteria (з домінуванням представників *Pseudomonas*) та *Epsilon*proteobacteria. Також було встановлено присутність представників *Delta*proteobacteria, що належать до сульфат-редуючих бактерій, та архей з таксономічного кластеру ANME, які здатні до анаеробного окиснення метану. Однак, враховуючи недостатньо наповненість баз даних, більшість клонів залишилась неохарактеризованою (Vetriani et al. 2003).

Довгострокові зміни чисельності бактеріопланктону та зв'язок даного показника із трофічним статусом вод було досліджено у Дністровському лимані у період 2003 – 2018. Було показано присутність тенденції до зростання чисельності мікроорганізмів вод лиману з одночасною зміною трофності від політрофної до гіперполітрофної у літні місяці, і запропоновано використання співвідношення концентрації хлорофілу до чисельності бактерій (С/ЧБ) для опосередкованої оцінки надходження органічних речовин (Kovalova et al. 2020). Аналогічні довгострокові дослідження, проведені в межах північно-західного шельфу Чорного моря показали мезотрофний статус вод у відповідності до бактеріологічних показників (Kovalova et al. 2021).

Таким чином, угруповання мікроорганізмів Чорного моря залишаються недостатньо охарактеризованими. Більшість досліджень, які було проведено на даний момент стосувались окремих таксономічних груп, що займають певні екологічні ніші і залучені до окремих етапів біогеохімічних циклів. Однак, значна вертикальна стратифікація та горизонтальна гетерогенність умов навколишнього середовища Чорного моря вказує на необхідність проведення

масштабного скринінгу таксономічного та функціонального різноманіття прокаріот Чорного моря. Наявність подібних даних дасть змогу фокусуватись на подальшому детальному дослідженні найважливіших процесів, що відбуваються в екосистемі Чорного моря.

### **Висновки до Розділу 1**

1. Чорне море є одним з найбільш вразливих водних об'єктів, оскільки воно напівзакритого типу і отримує значний об'єм річкових стоків з таких річок, як Дунай, Дністер, Дніпро тощо. Це визначає актуальні екологічні проблеми даної водної екосистеми: забруднення поліароматичними вуглеводнями, хлорорганічними сполуками, пестицидами тощо. Окремою проблемою чорноморського регіону є поширення антибіотикорезистентності через забруднення акваторії фармацевтичними речовинами.

2. Моніторинг екологічного стану водних екосистем регулюється Водною Директивою ЄС та Рамковою Директивою морської стратегії ЄС. Оцінка екологічного стану ґрунтується на хімічних, фізичних та біологічних параметрах, останні з яких мають в основі дані аналізу угруповань еукаріотичних організмів. Водночас, угруповання мікроорганізмів не враховуються в оцінці екологічного стану попри важливу екосистемну роль у біотрансформації ксенобіотиків та поширенні антибіотикорезистентності.

3. Аналіз літературних джерел показав, що угруповання мікроорганізмів Чорного моря є недостатньо охарактеризованими. На даний момент дослідження сфокусовані на ролі окремих таксономічних груп у біогеохімічних циклах, що не дозволяє застосовувати дані в оцінці екологічного стану. Тому оцінка розподілу, структури та екосистемної ролі угруповань мікроорганізмів в унікальних умовах напівзакритої та постійно стратифікованої екосистеми Чорного моря є актуальними питаннями.



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Відбір матеріалу для досліджень

З метою відбору матеріалу було здійснено 3 дослідницькі рейси в акваторії Чорного моря в період 2016 – 2019 років (Рис. 2.1).

У травні-червні 2016 року було відібрано 68 зразків морського бактеріопланктону на 12 станціях дослідницького рейсу (№ 1, 3, 4, 7, 10, 12, 13, 16, 19, 21, 23, 24), які розташовувались, як в межах шельфової зони, так і у відкритих водах (Рис. 2.1, Додаток 1). З метою дослідження вертикального розподілу угруповань бактеріопланктону відбір здійснювали на 5 глибинах, що відповідали поверхні, термоклин, глибинному максимуму хлорофілу, зоні кисневого мінімуму та безкисневій (сірководневій) зоні. Розташування зазначених зон визначали за допомогою гідрофізичного зонду провідності, температури та тиску CTD-SBE 25 plus, Sea-Bird Scientific, US), обладнаному сенсорами флуоресценції та кисню.

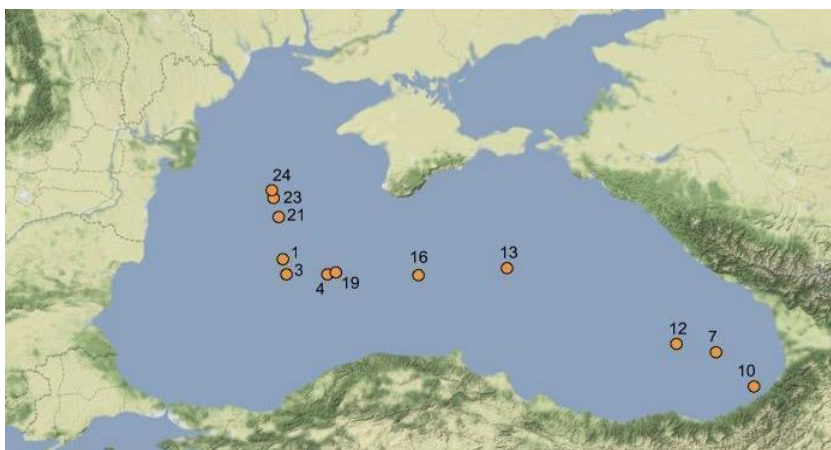


Рисунок 2.1 Розташування станцій в акваторії Чорного моря під час дослідницького рейсу в травні-червні 2016 року в рамках проекту EMBLAS-II.

Океанографічні профілі за вказаними параметрами було побудовано із використанням програмного забезпечення SBE Data Processing Software версія 7.18 (Sea-Bird Electronics, Bellevue, Washington, USA). Зону кисневого мінімуму визначали за концентрації  $O_2$ , що не перевищувала 2 мг/л.

З метою дослідження потенціалу мікробних угруповань Чорного моря до розкладу ксенобіотиків було проведено додатковий відбір матеріалу в рамках дослідницького рейсу у серпні-вересні 2017 року. 9 зразків морської води було відібрано на 3-х станціях (станції №5, 8 та 9) та 5 зразків донних осадів було відібрано на станції №1, 1Б, 1В, 4 та 8 (Рис. 2.2, Додаток 2). Зразки було відібрано з поверхні, глибинного максимуму хлорофілу та із зони кисневого мінімуму.



Рисунок 2.2 Розташування станцій в акваторії Чорного моря під час дослідницького рейсу в серпні-вересні 2017 року в рамках проекту EMBLAS-II

Дослідження реакції мікробних угруповань Чорного моря на надходження ксенобіотиків було продовжено у липні-серпні 2019 року під час дослідницького рейсу в рамках проекту ЕМБЛАС+. Було проведено відбір зразків морського бактеріопланктону з метою дослідження поширення генів стійкості до антибіотиків в акваторії Чорного моря. Було відібрано 12 зразків з поверхні на 12 станціях рейсу (станції № 1А, 2А, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12) (Рис. 2.3, Додаток 3).



Рисунок 2.3 Розташування станцій в акваторії Чорного моря під час дослідницького рейсу в липні-серпні 2019 року в рамках проекту EMBLAS-II

Зразки морської води для подальшого дослідження бактеріопланктону було відібрано у батометри (Hydro-Bios, Німеччина) ємністю 5 л, закріплені горизонтально у розетці обладнаній CTD-зондом Sea Bird 911 (Sea Bird Scientific, США). Після відбору зразки помістили у пластикові ємності, попередньо оброблені 0,1Н розчином соляної кислоти, і зберігали за температури  $+4^{\circ}\text{C}$  протягом години до подальшої обробки. Відбір клітин бактеріопланктону здійснювався шляхом перистальтичної фільтрації із використанням помпи Cole Palmer Masterflex (США). 5 л морської води було розділено на 2 зразки об'ємом по 2,5 л, що використовувались, як технічні повторності. Зразки було пропущено через стерильний капсульний фільтр Sterivex із полівініліденфторидною мембраною з діаметром пор 0,22 мкм. Після завершення фільтрації капсули із фільтрами було заповнено консервуючим розчином RNeasy (Thermo Fischer Scientific, США) з метою збереження зразків за температури  $-20^{\circ}\text{C}$  до моменту подальшої лабораторної обробки.

Загальну схему етапів проведення дослідження наведено на Рис. 2.4.

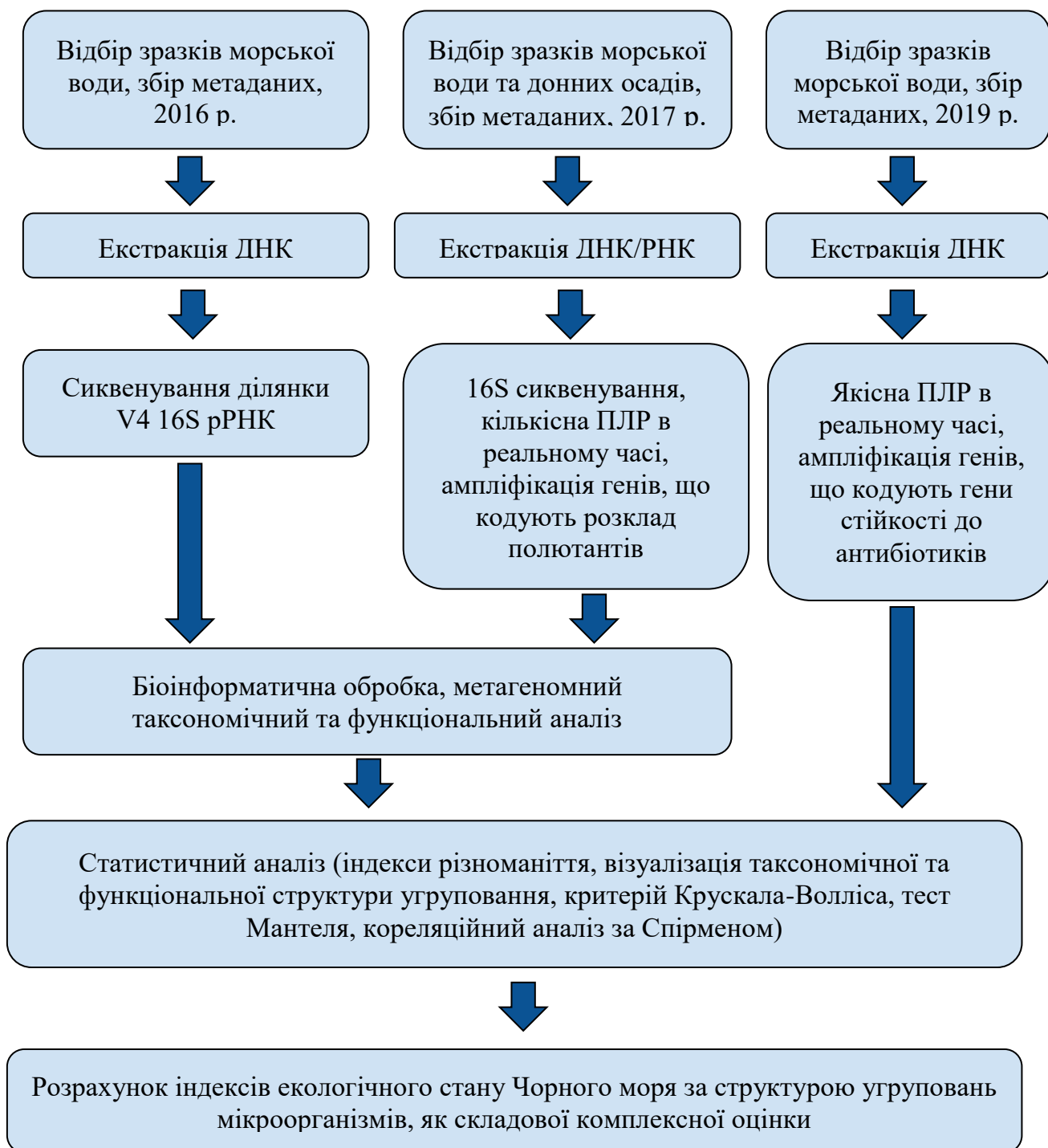


Рисунок 2.4 Схематичне зображення етапів проведення дослідження

Протокол відбору клітин бактеріопланктону було змінено у 2019 році у зв'язку з доступністю нового обладнання, що забезпечувала швидшу фільтрацію за рахунок паралельної обробки трьох зразків. 2 л морської води пропускали

через стерильні полікарбонатні фільтри Isopore PC з діаметром пор 0,22 мкм шляхом вакуумної фільтрації із застосуванням помпи Microsar e.jet (Sartorius Stedim, Німеччина). Протокол фіксації та збереження зразків залишився без змін.

Зразки донних осадів було відібрано за допомогою мультикорера у трубки з оргскла. Верхній шар донних осадів відбирали у стерильний шприц об'ємом 5 мл, після чого заморожували та зберігали за температури  $-80^{\circ}\text{C}$  до подальшої обробки. Всі зразки було відібрано у трьох повторностях.

Протоколи відбору зразків прокаріот морської води та донних осадів наведено у Додатках 4 та 5.

## 2.3 Молекулярний аналіз

### *Екстракція ДНК*

Молекулярно-генетичний аналіз проводили на базі Національного інституту морських досліджень та розвитку Грігорі Антіпа (м. Констанца, Румунія), Університету м. Нанькін (Китай) та Українського наукового центру екології моря (УкрНЦЕМ), із дотриманням ідентичних протоколів.

Екстракцію ДНК з клітин бактеріопланктону та мікроорганізмів донних осадів проводили із використанням комерційного набору DNeasy Powersoil kit (QIAGEN, Німеччина) із дотриманням стандартних протоколів виробника.

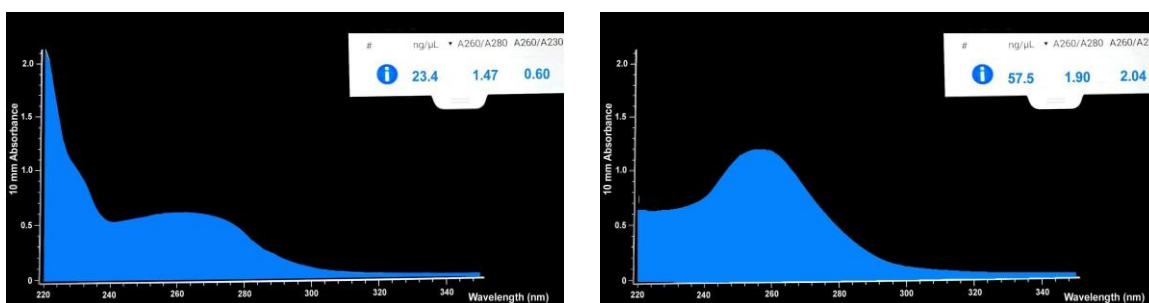


Рис. 2.6 Кількісні та якісні показники ДНК за умови екстракції а) зі стандартним часом осадження білків, б) з подовженим часом осадження білків

### *Екстракція РНК*

З метою подальшого аналізу функціональної активності мікроорганізмів у процесі розкладу ксенобіотиків було проведено екстракцію РНК зі зразків донних осадів та морської води. Було проведено пошук оптимального протоколу, який би призводив до достатнього виходу та якості РНК і передбачав використання найменш токсичних матеріалів.

На даний момент існують різні способи екстракції РНК для зразків різного походження: комерційні набори RNeasy kit, miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit, (QIAGEN), GenElute™ Total RNA Purification Kit (Sigma-Aldrich), а також методи із використанням фенол-хлороформ-ізоамілового спирту, гуанідин тіоціанату та інших речовин, що сприяють лізису клітинної стінки бактерій. Більшість дослідників сходяться на думці, що необхідно підбирати та валідувати протокол екстракції РНК для кожного конкретного типу зразку, особливо, якщо це стосується зразків з навколишнього середовища (Frias-Lopez et al. 2007).

Враховуючи вище сказане було протестовано 3 модифікації методу екстракції РНК із використанням фенол-хлороформу (McDonald, 2000). Результати екстракції кожним із зазначених протоколів оцінювали за показниками концентрації та чистоти отриманої РНК, що визначались спектрофотометрично із використанням прибору Nanodrop. Згідно обраного протоколу до зразку було додано 500 мкл фенолхлороформ ізоамілу, 500 мкл гуанідин тіоціанату та скляні гранули діаметром 0,7 мм, після чого було проведено гомогенізацію. Після центрифугування 750 мкл надосаду було перенесено до нової стерильної пробірки. До пробірки додавали 750 мкл хлороформ-ізоамілу з метою відділення та вилучення фенолу для запобігання контамінації РНК. Вміст пробірки було ретельно перемішано, що призвело до розділення його на різні фази: фенол та дебріс опинилися в осаді, білки – в інтерфазі, а нуклеїнові кислоти (ДНК і РНК) у надосаді. 600 мкл надосаду було перенесено до нової стерильної пробірки.

На наступному етапі 1000 мкл поліетиленгліколю було додано до пробірки з метою преципітації нуклеїнових кислот. Після 2-годинної інкубації суміш

центрифугували за температури 4°C протягом 10 хвилин. Рідину було максимально відібрано, а до осаду було додано 1000 мкл холодного 70% етанолу із подальшим центрифугуванням. Після центрифугування етанол було вилучено і пробірку з осадом було ретельно висушено за кімнатної температури для випаровування залишків етанолу. Осад, що містив РНК та ДНК було розчинено у 50 мкл води подвійної дистиляції (Milliq Water).

З метою отримання чистої від ДНК РНК було застосовано набір Turbo-DNA-free kit (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, США).

В такому вигляді РНК зберігали за температури -80°C до моменту синтезу комплементарної ДНК.

#### *Синтез комплементарної ДНК*

Перед дослідженням функціональної активності мікроорганізмів у процесі трансформації ксенобіотиків методом ПЛР, було проведено синтез комплементарної ДНК з отриманої РНК. Для синтезу використовували набір SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, США). *Сиквенування ділянки гену 16S. Платформа Illumina*

Як відомо на даний момент значна частка (~99%) біорізноманіття бактерій морського середовища не піддається ізоляції в культурі, що значно ускладнює дослідження її функціонального та таксономічного різноманіття (Edwards et al. 2010). Метагеномні дослідження, зокрема сиквенування ділянки консервативного гену 16S дає можливість отримати детальнішу картину біорізноманіття морських бактерій, як водної товщі, так і донних осадів. Наразі існують декілька платформ сиквенування нового покоління, що відрізняються за своїм принципом, перевагами та недоліками. Найпоширенішими є Illumina та IonTorrent. Нами було застосовано обидві платформи для отримання даних з приводу таксономічного різноманіття угруповань мікроорганізмів Чорного моря, і було проведено порівняльну оцінку результатів з метою визначення оптимального протоколу.

### *Сиквенування на платформі Illumina*

Сиквенування на платформі Illumina MiSeq було проведено в компанії MR DNA (Shallowater, TX, USA) за стандартним протоколом виробника (Dowd et al. 2008; Chiodini et al. 2015). Для ампліфікації ділянки V4 гену 16S було застосовано праймери: S-D-Bact-0341-b-S-17 та S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth et al. 2013).

ПЛР реакцію було проведено із застосуванням комерційного набору HotStarTaq Plus Master Mix Kit (QIAGEN, США). Всі реакції було проведено в трьох повторностях із трьома негативними контролюми. Наявність відповідних ПЛР продуктів було перевірено за допомогою 2% агарозного гелю. Зразки було об'єднано у ідентичних пропорціях, вирахованих з їх початкових концентрацій. Очистку об'єднаних зразків проводили із використанням відкаліброваних гранул Ampure XP (Beckman Coulter, США). Очищені зразки використовували для підготовки бібліотеки сиквенування Illumina.

### *Сиквенування на платформі IonTorrent*

Сиквенування на платформі IonTorrent було проведено у співпраці з університетом міста Нанькін (Китай). Для ампліфікацію ділянки V3 гену 16S було використано праймери 341F та 518R (Klindworth 2013).

Наявність відповідних ПЛР-продуктів було перевірено на 2% агарозному гелі, після чого ПЛР продукти було очищено за допомогою набору E-Z 96 Cycle Pure Kit (Omega, США). Всі амплікони було об'єднано у відповідних пропорціях згідно їх концентрацій.

Реакцію приєднання адапторів було проведено із застосуванням набору Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, США) згідно стандартних протоколів виробника, після чого зразки розвели до концентрації 100пМ. Матрицю для сиквенування було підготовлено із застосуванням набору Ion OneTouch 2 (Thermo Fisher Scientific, США).

*Дослідження активності генів мікробного розкладу ксенобіотиків методом кількісної ПЛР*



Кількісну ПЛР за таргетними генами було проведено з метою оцінки функціональної участі угруповань мікроорганізмів в процесі розкладу ксенобіотиків в межах екосистеми Чорного моря.

Першим етапом було проведення мета-аналізу літературних джерел та даних хімічного забруднення акваторії Чорного моря з метою підбору праймерів, що відповідають генам, які кодують ферменти різних етапів розкладу органічних забрудників. Враховуючи попередні дані з поширеності та концентрації різних типів ксенобіотиків у водній товщі та в донних осадах Чорного моря, нами було обрано наступні гени для кількісного аналізу:

1. Група генів *rhD* – диоксигенази (КФ 1.14.12.-), які каталізують реакції гідроксилювання поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ: антрацену, пірену, бензапірену, флуорену, кризену та ін.). Диоксигенази каталізують перший етап аеробного розкладу ПАВ, що відбувається шляхом інкорпорації молекулярного кисню до ароматичного ядра. Цей механізм властивий наступним групам мікроорганізмів - *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Terrabacter* (Vila et al. 2015, Cébron et al. 2008). Ампліфікацію генів *rhD* було проведено із застосуванням праймерів PАН-RHD F / PАН-RHD R для грам-позитивних бактерій та PАН-RHD GN F / PАН-RHD GN R для грам-негативних бактерій (Cébron et al. 2008, Shahsavari et al. 2016).

2. Група генів *NaH* кодує систему нафталендіоксигенази, яка є одним з найпоширеніших ферментів у мікроорганізмів, здатних до окиснення ПАВ. Нафталендіоксигеназа регулює перший етап окиснення нафталену, фенантрену та інших низькомолекулярних поліароматичних вуглеводнів (Isaac et al. 2015, Chakraborty et al. 2016). Реакція полягає у інкорпорації молекулярного кисню до ароматичного ядра з утворенням цис-дигідродіолу. На наступному етапі ароматичне кільце руйнується під дією цис-дегідрогенази. Серед мікроорганізмів із експериментально доведеною здатністю до розкладу цис-дегідродіолу: *Pseudomonas* sp., *Comamonas testosteroni*, *Burkholderia* sp., *Sphingomonas* spp., *Rhodococcus* sp., *Nocardioides* sp. та інші (Isaac et al. 2015,

Chakraborty et al. 2016). З метою ампліфікації генів *NaH* було використано праймери NAH-F / NAH-R (Baldwin et al. 2003).

3. Група генів *Bph* кодує 2,3-діоксигеназу (КФ 1.14.12.18) – основний фермент верхнього шляху розкладу біфенілу. Даний фермент відповідає за окиснення ароматичного кільця біфенілу та поліхлорованих біфенілів (ПХБ). Він каталізує інкорпорацію двох гідроксильних груп до ароматичного кільця конгенерів ПХБ, сприяючи його розриву (Bruhlmann & Chen 1999). Зазвичай продуктом розкладу ПХБ є хлоробензоат, для розкладу якого необхідна участь певних катаболічних плазмід інших мікроорганізмів. Здатність до розкладу ПХБ була показана для таких груп мікроорганізмів, як *Acidovorax*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, and *Sphingomonas* (Furukawa & Fujihara 2008, Seeger et al. 2009, Agulló et al. 2017). Для ампліфікації генів *Bph* було застосовано праймери: BPH1-F / BPH1-R (Baldwin et al. 2003).

4. Гени груп *LinA* та *LinB* кодують, відповідно, гексахлоргександегідрохлореназу (КФ 4.5.1.-) та галідогідролазу (КФ ЕС 3.8.1.2). Дегалогенази – ключові ферменти розкладу галогеновмісних сполук (Laquitaine et al. 2016). В рамках культуральних досліджень було попередньо показано, що *Sphingobium japonicum*, *Sphingomonas* sp. NM05, *Sphingobium baderi*, *Pandoraea* sp. LIN-3, *Xanthomonas* sp., *Arthrobacter citreus* BI-100, *Arthrobacter fluorescens*, *Microbacterium* ITRC1, *Streptomyces* та *Micromonospora* володіють здатністю толерувати та вилучати/розкласти гексахлорциклогексан з ґрунтів (Saez et al. 2017). Для проведення ПЛР з генами *LinA* було застосовано праймери linART-F / linART-R, а з генами *LinB* - linBRT-F / linBRT-R (Lal et al. 2013).

Для розрахунку відносної активності генів розкладу ксенобіотиків у мікробному угрупованні було також проведено ампліфікацію гену 16S (ділянка V3) із використанням праймерів 341F та 518R.

Процес дослідження функціональної активності генів розкладу ксенобіотиків складався з двох етапів:

1. Проведення якісної ПЛР з метою генерування стандартів на кожен ген для подальшого кількісного аналізу
2. Власне кількісна ПЛР для визначення експресії обраних генів

ПЛР було проведено із використанням набору QuantiFast SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно стандартного протоколу виробника на інструменті DT-Prime-96 (DNA Technology). Для напрацювання стандартів використовували ДНК, виділене зі зразків мікроорганізмів, відібраних під час дослідницького рейсу ЕМБЛАС-II у 2017 році.

Всі реакції було проведено в трьох повторностях та з використанням негативного контролю. Після кожної ПЛР було проведено аналіз кривої плавлення з метою оцінки специфічності праймерів. Термічні умови реакції були відмінними для різних генів і наведені у Додатку 6.

Після проведення ПЛР амплікони було очищено за допомогою QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Німеччина) із дотриманням стандартних протоколів виробника.

Концентрацію очищених ампліконів визначали за допомогою спектрофотометру NanoDrop One. На основі отриманих даних було розраховано концентрації стандартів для кількісної ПЛР і підготовлено серійні розведення.

У подальшій кількісній ПЛР для побудови стандартної кривої використовували концентрації від  $10^{-7}$  до  $10^{-3}$  нг/мкл. ДНК зразків було розведено до однакової концентрації 5 нг/мкл. Термічні умови та склад реакційної суміші для кількісної ПЛР відповідали термічним умовам та складу якісних реакцій. Копійність генів визначали на основі значення критичного циклу ПЛР (Ct).

З метою оцінки експресії генів, що кодують ферменти, відповідальні за розклад ксенобіотиків було проведено ПЛР, як з ДНК, так і з комплементарною ДНК у якості зразків.

## Дослідження поширеності генів антибіотикорезистентності методом кількісної ПЛР

Для дослідження поширеності генів антибіотикорезистентності в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря було обрано гени, що кодують різні механізми стійкості до найпоширеніших та найбільш вживаних груп антибіотиків.

1. *blaTEM* та *blaSHV* відповідають за інактивацію антибіотиків групи бета-лактамів, що зазвичай використовуються для лікування широкого спектру інфекцій, викликаних, як грам-негативними, так і грам-позитивними бактеріями (Lachmayr et al., 2009). *blaTEM* та *blaSHV* кодують ферменти  $\beta$ -лактамази, що інактивують циклічну структуру  $\beta$ -лактамів (Lachmayr et al. 2009, Uyaguari et al. 2011) і, таким чином, деактивують антибактеріальні властивості цих речовин. Ампліфікацію *blaTEM* було проведено із використанням праймерів RT*blaTEM*FX / RT*blaTEM*FR, а *blaSHV* - із застосуванням SHV\_fwd. / CMY\_rev. (Fischer et al. 2014).

2. *erm(B)* гени кодують *erm(B)* метилазу, що забезпечує стійкість бактерій до антибіотиків групи макролідів (Syrogiannopoulos et al. 2001 Baquero et al. 1999, Doern, 1998, Song et al. 1999). Механізм стійкості полягає у метилюванні залишків аденіну у 23S рРНК, що призводить до погіршення здатності макролідів, лінкозамідів та стрептограміну В до зв'язування із ділянкою 50S рибосоми. Для ПЛР із геном *erm(B)* було застосовано праймери *erm(B)*-91f / *erm(B)*-454r (Rodríguez-Mozaz et al. 2014).

3. Гени групи *VanA* та *VanB* кодують д-аланін-(p)-лактат лігазу, що забезпечує стійкість мікроорганізмів до ванкоміцину, який інгібує синтез клітинної стінки бактерій. Резистентність забезпечується зміною цільової ділянки ванкоміцину за рахунок інкорпорації депсипептиду д-аланін-(p)-лактату замість д-аланіл-(p)-аланіну до пептидоглікану клітинної стінки (Leclercq et al. 1988, Périchon & Courvalin, 2000, Uttley et al. 1988). Для ампліфікації *VanA* було використано праймери *vanAF* / *vanAR*, а для *VanB* - *vanBF* / *vanBR* (Zhu et al. 2015).

4. Гени *mcr-1* кодують резистентність мікроорганізмів до колістину за рахунок зменшення проникності мембрани бактеріальної клітини через зміну синтезу ліпополісахаридів та вищу експресію ефлюксних pomp (Nation & Li 2009,

Payne et al. 2007). ПЛР із геном *mcr-1* було проведено із застосуванням праймерів mcr1FP / mcr1RP (Hembach et al. 2017).

Як і у випадку дослідження функціональної активності мікроорганізмів у процесі розкладу ксенобіотиків, було проведено якісну ПЛР з метою генерування стандартів для подальшої кількісної ПЛР. Всі реакції було проведено із застосуванням набору QuantiFast SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) згідно стандартного протоколу виробника на інструменті Rotor Gene Q 5plex (QIAGEN, Німеччина).

Стандарти для створення кривої розрахунку було напрацьовано на основі зразків ДНК мікроорганізмів відібраних у дослідницькій експедиції ЕМБЛАС+ у 2019 році.

Всі реакції було проведено в трьох повторностях із використанням негативного контролю. Аналіз кривої плавлення проводили після кожної ПЛР з метою оцінки специфічності праймера. Термічні умови реакцій наведено у Додатку 7.

Після якісної ПЛР було проведено очистку стандартів із застосуванням набору QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Німеччина) із дотриманням стандартних протоколів виробника. Концентрацію очищених ампліконів визначали за допомогою прибору NanoDrop.

Безпосередньо перед проведенням кількісної ПЛР було підготовлено серійне розведення стандартів у концентраціях від  $10^{-7}$  до  $10^{-3}$  нг/мкл. Робоча концентрація зразків ДНК становила 5 нг/мкл.

Копійність генів визначали на основі значення критичного циклу ПЛР (Ct), аналогічно до генів розкладу ксенобіотиків.

## 2.4 Біоінформатичний та статистичний аналіз

### *Аналіз даних сиквенування на платформі Illumina MiSeq*

Біоінформатичну обробку даних сиквенування було проведено в кілька етапів: об'єднання послідовностей, аналіз їх якості та фільтрація; визначення Операційних Таксономічних Одиниць та таксономічний аналіз.

По-перше послідовності було об'єднано та переорієнтовано у напрямку 5'-3' за допомогою програмного забезпечення MR DNA ([www.mrdnalab.com](http://www.mrdnalab.com),

Shallowater, TX, USA). Послідовності було опрацьовано у програмному забезпеченні QIIME1 (Caporaso et al. 2010) – баркоди, гомополімери, химерні та короткі (<150 пн) послідовності було усунуто.

На наступному етапі було визначено Операційні Таксономічні Одиниці у кожному зі зразків шляхом *de novo* кластерингу за 97% подібністю. Таксономічну приналежність Операційних Таксономічних Одиниць було визначено за допомогою бази 16S GreenGenes, версія 13.8 (Desantis et al. 2006). З метою визначення еволюційної відстані між Операційними Таксономічними Одиницями було проведено філогенетичний аналіз.

#### *Аналіз даних сиквенування на платформі IonTorrent*

Послідовності, отримані шляхом сиквенування на платформі IonTorrent було попередньо оброблено програмним забезпеченням серверу ION (версія 3.6.2). Було усунуто послідовності, що відповідали 3' адаптору PGM і згенеровано файли fastq. Подальший аналіз було проведено за допомогою програмного забезпечення QIIME1 (Caporaso et al. 2010) за схемою, ідентичною до аналізу послідовностей Illumina.

#### *Статистичний аналіз даних сиквенування*

Аналіз різноманіття було здійснено за допомогою програмного забезпечення QIIME2 2019.1(<https://qiime2.org/>, (Caporaso et al. (2010))). Індекс альфа-різноманіття Шенона та матрицю Брей-Кертис було розраховано із застосуванням плагіну “diversity core metrics”. Візуалізацію таксономічної та функціональної диференціації угруповань було проведено за допомогою програмного забезпечення *vegan* R (R Core Development team).

Статистичну різницю між угрупованням мікроорганізмів поверхні, термоклину, глибинного максимум хлорофілу, кисневого мінімуму та сірководневої зони (вертикальний розподіл), а також між українським шельфом, грузинськими водами та відкритими водами (горизонтальний розподіл) оцінювали за тестом Крускал-Уолліса ( $p < 0.05$ ) у R (R Core Development team).

Програму DeSeq (Love et al. 2014) було використано для визначення таксонів, різниця розподілу яких є найбільшою на різних глибинах та в різних регіонах Чорного моря.

Аналіз впливу факторів навколишнього середовища на мікробні угруповання Чорного моря було здійснено за допомогою теста Мантеля у *vegan* R. У тесті Мантеля було використано наступні матриці: матриця чисельності Брей-Кертис, матриця параметрів навколишнього середовища (глибина, концентрація кисню, сірководню, нітратів, нітритів, фосфатів, загального азоту, загального фосфору та оксиду кремнію) на основі матриці Евклідових відстаней та матриця географічних відстаней на основі матриці відстаней Гаверсінуса.

#### *Статистична обробка даних кількісної ПЛР*

Отримані дані з поширеності та експресії таргетних генів (генів, що відповідають за розклад ксенобіотиків та стійкість до антибіотиків) було проаналізовано за допомогою програмного забезпечення R (версія 3.6.0). Було проведено тест Шапіро-Уїлка на нормальність розподілу ( $p < 0.05$ ), за результатами якого різницю поширеності та експресії генів на різних станціях оцінювали із застосуванням непараметричного тесту Крускал-Уолліса або параметричного дисперсійного аналізу (ANOVA). З метою попарного порівняння поширеності генів в межах різних глибин було застосовано t-критерій та критерій Вілкоксона. Кореляцію між параметрами було оцінено за допомогою тесту рангової кореляції Спірмена. З метою візуалізації даних аналізу у програмному забезпеченні *vegan* R було проведено неметричне багатовимірне шкалювання на основі матриці Брей-Кертис.

З метою встановлення зв'язку між таксономічним та функціональним складом угруповань мікроорганізмів Чорного моря та параметрами навколишнього середовища, а також з метою оцінки ролі мікробних угруповань у процесі розкладу ксенобіотиків та перенесення генів антибіотикорезистентності, було використано дані хімічного аналізу, отримані в рамках проєкту ЕМБЛАС - II та ЕМБЛАС+ (<http://blackseadb.org/>).

## 2.5 Розрахунок індексів екологічного стану Чорного моря на основі метагеномних даних

З метою оцінки потенціалу використання даних метагеномного аналізу в оцінці екологічного стану середовища Чорного моря було розраховано індекси на основі таксономічної структури угруповань мікроорганізмів та результатів хімічного аналізу вод та донних осадів, і проведено порівняння між ними.

### *Розрахунок індексу тиску на навколишнє середовище ( $P_i$ )*

Індекс екологічного тиску ( $P_i$ ) було розраховано аналогічно до Aylagas et al. (2017) на основі даних хімічного аналізу, проведеного в рамках проєкту ЕМБЛАС-II (Slobodnik et al. 2017). Шкала значень  $P_i$  мала діапазон від 0 до 5, де 0 - повна відсутність забруднюючої речовини, а 5 - максимальне значення екологічного тиску. Максимальне значення екологічного тиску розраховувалось за пороговими показниками, визначеними Директивою ЄС (2013/39/EU AA-EQS Marine, ER-UA). У шкалі  $P_i$  порогові показники екологічного тиску (межа між прийнятним та неприйнятним рівнем забруднення) відповідали значенню 2.

$P_i$  було розраховано для окремих забруднюючих речовин, в середньому для класу ксенобіотиків - металів, поліхлорбіфенілів, хлороорганічних сполук - і загалом для кожної станції, на якій проводився відбір зразків.

### *Розрахунок індексу microgAMBI*

Для оцінки екологічного стану на основі даних таксономічної структури мікроорганізмів було розраховано індекс microgAMBI за методикою, описаною у Aylagas et al. (Aylagas et al. 2017). Даний індекс було розроблено на основі AMBI (AZTI's Marine Biotic Index, Borja et al., 2000), за яким проводять оцінку водного середовища з урахуванням різноманіття угруповань зообентосу.

MicrogAMBI базується на розрахунку співвідношення таксономічних груп, які чутливі до забруднення середовища (екологічна група I - EG I) та опортуністичних/толерантних до надходження ксенобіотиків (екологічна



група III - ЕГ III). Критеріями для віднесення мікробного таксону до ЕГ III є: (i) домінування у середовищі із високим вмістом органічних речовин, (ii) експериментально показана відповідь на присутність органічного забруднення, (iii) домінування у безкисневому середовищі з високим вмістом метану, (iv) здатність до окиснення нітриту і попередньо зафіксована реакція на надходження сполук азоту, (v) присутність у стічних водах з високим вмістом сульфідів, (vi) участь у метаногенному розкладі алканів, (vii) здатність до розкладу поліароматичних вуглеводнів, (viii) приналежність до потенційних патогенів (Aylagas et al. (2017)). Решта таксономічних груп - аероби, мікроорганізми, що зазвичай зустрічаються у незабруднених донних осадах та водах - належать до ЕГ I. У випадку відсутності даних з приводу функціональних особливостей певного таксону у попередніх дослідженнях, таксономічна група потрапляє у “невизначену” категорію.

Таксономічна структура мікробного угруповання оцінюється за даними секвенування 16S рРНК і порівнюється із базою даних, створеною на основі метааналізу даних попередніх досліджень з приводу функціональної ролі та поширення мікроорганізмів (Aylagas et al. (2017), Borja, 2018)). На момент даного аналізу база даних охоплювала 693 таксономічні групи різного ієрархічного рівня (порядок, клас, родина, рід та вид), з яких 373 належали до ЕГ I, а 297 - до ЕГ III.

microgAMBI розраховували за наступною формулою:

$$\text{microgAMBI} = [(\% \text{ЕГ I} \times 0) + (\% \text{ЕГ III} \times 6)] \div 100 \quad (2.1)$$

Діапазон даного індексу від 0 до 6, де 0 відповідає 100% мікробних послідовностей у ЕГ I, а 6 - 100% послідовностей у ЕГ III. Aylagas et al. було запропоновано співвідношення між індексом microgAMBI та екологічною оцінкою водного середовища за критеріями Водної Рамкової Директиви (WFD). Так, межею між “добрим” та “задовільним” екологічним станом вважається значення  $\text{microgAMBI} = 2,4$ , що відповідає 60% таксонів у групі ЕГ I і 40% у групі ЕГ III (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

**Співвідношення між microgAMBI та екологічним станом  
навколишнього середовища за Водною Рамковою Директивою**

<b>Межа класу за microgAMBI</b>	<b>Внесок екологічної групи</b>	<b>Екологічний стан (WFD)</b>
$0 < \text{microgAMBI} \leq 1,2$	$> 80\%$ ЕГ I	“відмінний”
$1,3 < \text{microgAMBI} \leq 2,4$	60% ЕГ I, 40% ЕГ III	“добрий”
$2,5 < \text{microgAMBI} \leq 3,6$	40% ЕГ I, 60% ЕГ III	“задовільний”
$3,7 < \text{microgAMBI} \leq 4,8$	20% ЕГ I, 80% ЕГ III	“поганий”
$4,9 < \text{microgAMBI} \leq 6$	$> 80\%$ ЕГ III	“дуже поганий”

### РОЗДІЛ 3

## АНАЛІЗ СТРУКТУРИ, РОЗПОДІЛУ ТА ЕКОЛОГІЧНОЇ ФУНКЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ ЧОРНОГО МОРЯ

### 3.1 Таксономічний та функціональний склад угруповань мікроорганізмів Чорного моря

#### 3.1.1 Таксономічна структура угруповань бактеріопланктону Чорного моря

З метою аналізу таксономічного різноманіття угруповань мікроорганізмів було застосовано сиквенування ділянки гену 16S рРНК. Такий підхід дозволяє отримати значно повнішу інформацію щодо таксономії у порівнянні із культуральними методами, оскільки більшість морських мікроорганізмів не піддаються культивуванню (Edwards et al. 2010). Було отримано від 44349 до 165791 послідовностей на зразок із середньою довжиною фрагментів 431.5 пн [175.0 - 545.0].

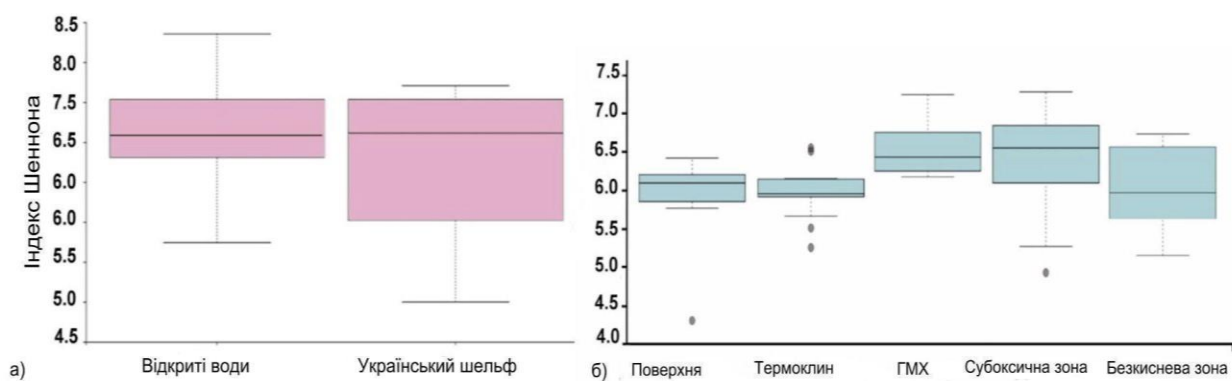


Рисунок 3.1 Таксономічне різноманіття угруповань мікроорганізмів а) в межах шельфової зони та відкритих вод та б) в межах зон із відмінними фізико-хімічними параметрами

Кількість Операційних Таксономічних Одиниць (ОТО) становила 203 – 368 у різних зразках (Додаток 8). Індекс альфа-різноманіття Шеннона показав високе таксономічне різноманіття досліджуваних угруповань мікроорганізмів (Рис. 3.1а, Рис. 3.1б) і рівномірний розподіл кількості та частоти ОТО між ними.

Статистично достовірної різниці між показниками таксономічного різноманіття мікробних угруповань шельфових зон та відкритих вод зафіксовано не було. Аналогічним чином, угруповання поверхні, термоклину, глибинного максимуму хлорофілу (ГМХ), субоксичної та безкисневої зони не відрізнялись за показниками альфа-різноманіття (Рис. 3.2 а, б).

Аналіз подібності угруповань (Analysis Of Similarities, ANOSIM) на основі матриць Брей-Кертис показав присутність, як регіональної диференціації між шельфовою зоною та відкритими водами ( $R=0,89$ ,  $p=0,0001$ ), так і вертикальної диференціації між зонами в межах різних глибин ( $R=0,64$ ,  $p=0,0001$ ) (Рис. 3.2а). Зразки з поверхні, термоклина та глибинного максимуму хлорофілу утворювали 1 кластер за таксономічною структурою. Переважна кількість зразків із субоксичної зони кластеризувались з мікробними угрупованнями безкисневої зони. Водночас, 6 зразків із субоксичної зони, відібрані у відкритих водах, належали до кластеру глибинного максимуму хлорофілу, що прогнозовано для екотонного середовища. Окремий кластер утворювали зразки мікробного угруповання донних осадов. Оскільки, зразки відібрані в межах територіальних вод Грузії кластеризувалися разом зі зразками з центральної частини Чорного моря, подальші регіональні порівняння проводили між українським шельфом та відкритими водами. Аналогічно, зразки з поверхні та термоклину в подальшому обговорюються разом.

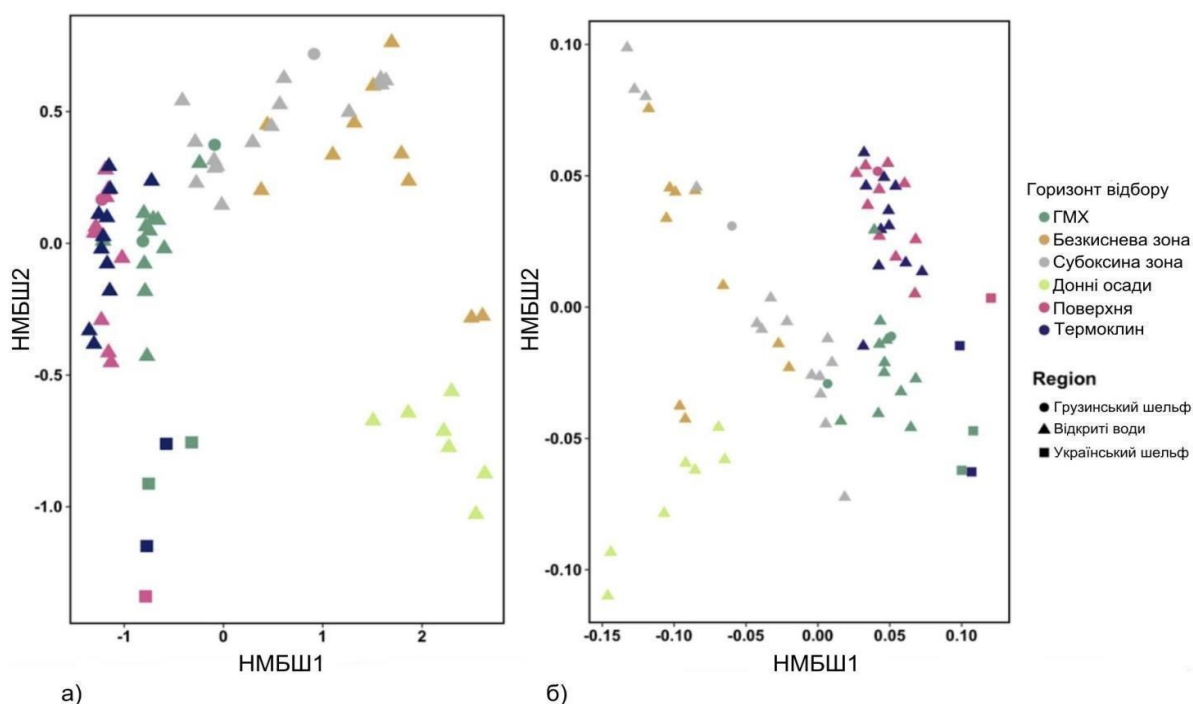


Рис. 3.2 Матриця а) таксономічної та б) функціональної диференціації мікробних угруповань Чорного моря

Варто зазначити, що функціональна структура мікробних угруповань Чорного моря відрізнялась від таксономічної (Рис. 3.2б). Угрупування мікроорганізмів українського та грузинського шельфів, а також відкритих вод не утворювали окремих кластерів. Статистично достовірною виявилась лише вертикальна диференціація, що відповідала розподілу за таксономічним складом угруповань. Так зразки, відібрані в межах безкисневої зони та субоксичної зони утворювали один кластер. Аналогічно кластеризувались поверхня та термоклин. Глибинний максимум хлорофілу утворював окремий кластер, до якого потрапили деякі зразки з кисневого мінімуму. Окремо кластеризувались зразки донних осадів (Рис. 3.2б).

Таксономічна структура угруповань мікроорганізмів Чорного моря відповідала розподілу фізико-хімічних параметрів навколишнього середовища (Додаток 9).

### *Таксономічна структура угруповань бактеріопланктону поверхні та термоклину*

Більшість таксономічних груп, ідентифікованих в межах поверхні та термоклину, була представлена гетеротрофами, що виконують функцію розкладу органічних речовин, які надходять внаслідок життєдіяльності фітопланктону. Відмічене нами значне різноманіття гетеротрофних груп може бути результатом спеціалізації до різних джерел вуглецю. Відбір зразків фітопланктону було проведено наприкінці травня в час, коли коколітофори (Coccolithaceae) домінують в Чорному морі (Stoica & Herndl 2007, Mikaelyan et al. 2011). За даними проекту ЕМБЛАС-II поширеність коколітофори *Emiliana huxleyi* (індекс Бротської-Зінкевич (Slobodnik et al. 2017), BZI = 116,1) в угрупованні фітопланктону становила 30% в межах поверхневої зони по всій акваторії Чорного моря, що ймовірно сприяло створенню специфічної екологічної ніші для гетеротрофних мікроорганізмів. Представники діатомових водоростей, такі, як *Dactyliosolen fragilissimus* (BZI = 1111,5), *Pseudo-nitzschia delicatissima* (BZI = 521), *Pseudosolenia calcar-avis* (BZI = 469,7), *Proboscia alata* (BZI = 300,2) були також масово поширені під час відбору матеріалу. Лабільні екsudати представників фітопланктону, а також розсіяна органічна речовина, стають ресурсом для різних гетеротрофних груп бактеріопланктону, що пояснює визначене нами високе таксономічне різноманіття мікроорганізмів (Williams et al. 2013, Landa et al. 2016).

Було виявлено, що переважна більшість мікроорганізмів в межах поверхневого шару та термоклину належить до класів *Alphaproteobacteria* (32 – 37%), *Gammaproteobacteria* (14%) та *Flavobacteriia* (14%), які зазвичай кількісно домінують в морському середовищі (Williams et al. 2013) (Рис. 3.3). Численними були також представники *Synechococcophycidae*, що становили 10% та 14% в межах поверхні та термоклину, відповідно.

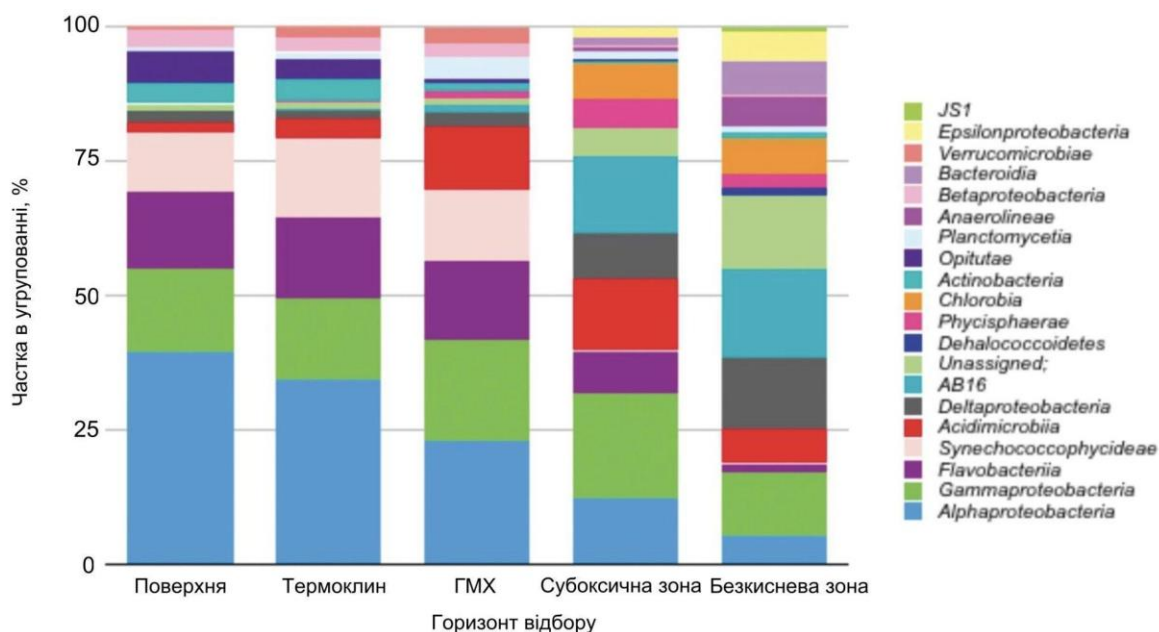


Рисунок 3.3 Таксономічний склад угруповань мікроорганізмів Чорного моря на рівні класів

Детальніший аналіз було проведено на рівні родин.

Згідно отриманих нами даних, найпоширенішими родинами бактеріопланктону в межах зон з високою концентрацією кисню були *Flavobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Synechococcaceae*, що становили 11%, 11% та 10 - 13%, відповідно (Рис. 3.4). Така висока чисельність *Flavobacteriaceae* та *Rhodobacteraceae* є наслідком доступності ресурсів, а саме субстрату росту, який надходить від фітопланктону під час активного цвітіння. Раніше аеробних хемогетеротрофних представників *Flavobacteriaceae* було ізольовано зі зразків прибережних вод північно-західного шельфу Чорного моря. Авторами було експериментально показано здатність даних ізолятів до розщеплення ексудатів фітопланктону через скринінг гідролітичної активності специфічних ферментів - протеаз, ліпаз, ксиланаз тощо (Ruginescu et al. 2022).

Показана нами висока частка *Rhodobacteraceae* може пояснюватись асоціацією даних мікроорганізмів із цвітіннями тих видів фітопланктону, що здатні до продукування диметилсульфопропієнату (ДМСП). Це узгоджується із попередніми даними Stoica & Herndl 2007 та Bakenhus et al. 2017, згідно яких

значна поширеність роду *Roseobacter*, що належить до родини *Rhodobacteraceae*, пов'язана із масовим розвитком кокколітофорид в Північно-західній частині Чорного моря. У дослідженнях, що охоплювали інші географічні регіони, було показано, що морські представники родини *Rhodobacteraceae* складають значну частину угруповання бактеріопланктону під час цвітіння фітопланктону і є основними постачальниками вітамінів для еукаріотичних первинних продуцентів (діатомових, динофітових та бурих водоростей) (Zhang et al. 2018).

Відносна поширеність представників родини *Halomonadaceae*, що належить до *Gammaproteobacteria*, становила 6-7% в межах поверхні та термоклину. Мікроорганізмам, що належать до цієї родини, властивий аеробний або факультативно анаеробний хемоорганотрофний тип живлення (de la Haba et al. 2014). *Halomonadaceae* перебувають у тісному зв'язку із первинними продуцентами і відіграють значну роль у циклі азоту через здатність до нітрифікації та/або денітрифікації (Wilson et al. 2017).

#### *Таксономічна структура угруповань бактеріопланктону глибинного максимуму хлорофілу*

Згідно отриманих нами даних, мікробні угруповання зони глибинного максимуму хлорофілу характеризувались нижчою відносною поширеністю *Alphaproteobacteria* (22%) порівняно із термоклинном (Рис. 3.3). Другою за поширеністю таксономічною групою були *Gammaproteobacteria*, що становили 18%. Відносна поширеність *Flavobacteriia* та *Synechococcophycidae* складала 15% та 13% відповідно. Водночас, поширеність *Acidimicrobiia* зросла до 11%, що узгоджується із попередніми дослідженнями інших стратифікованих водних об'єктів (Середземного моря), в яких високу чисельність даної таксономічної групи фіксували саме в зоні глибинного максимум хлорофілу (Mizuno et al. 2015).

Мікроорганізми, що потенційно залучені до розкладу полімерів фітопланктону, становили значну частку угруповання бактеріопланктону глибинного максимуму хлорофілу. Так, нами було виявлено, що



представники родини *Flavobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae* та *Halomonadaceae* складали, відповідно, 8%, 8% та 7% досліджуваного угруповання. Значна частка угруповання була представлена родиною *OCS155* та *ZA3409c* – 6% та 2% від загальної чисельності, відповідно. Родина *OCS155* включає фото-гетеротрофних вільноживучих прокариот (Angly et al. 2016), які часто є поширеними в зонах глибинного максимуму хлорофілу (West et al. 2016) і тісно пов'язані із високою концентрацією фітопланктону (Morris et al. 2012, Mizuno et al. 2015), зокрема діатомових водоростей (Nelson et al. 2013).

У зоні глибинного максимуму хлорофілу було встановлено зростання поширеності родин *NS9* (3%), *Plactomycetaceae* (3%), та *Verrucomicrobiaceae* (3%) порівняно із верхніми шарами водного стовпа (Рис. 3.4). *NS9* належать до *Flavobacteria*, що асоційовані із цвітінням фітопланктону (Liu et al. 2019) і відомі своєю здатністю до розкладу високомолекулярних органічних сполук та до колонізації різних субстратів (Buchan et al. 2014). Аналогічно представники *Plactomycetaceae* можуть бути залучені у процес аеробного розкладу складних органічних речовин до простіших в зоні глибинного максимуму хлорофілу а (Glockner et al. 2003). У попередніх дослідженнях мікробних угруповань Чорного моря відмічали поширеність, як вільноживучих, так і прикріплених, представників *Plactomycetaceae* в межах кисневого шару та субоксичної зони (Kirkpatrick et al. 2006, Fuchsman et al. 2012).

#### *Таксономічна структура угруповань бактеріопланктону субоксичної зони*

В результаті проведених нами досліджень було показано, що у субоксичній зоні з концентрацією кисню  $< 2$  мг/мл домінували гетеротрофні та хемоавтотрофні мікроорганізми, яким сприяє присутність залишкового світла та відновлених сполук сульфуру.

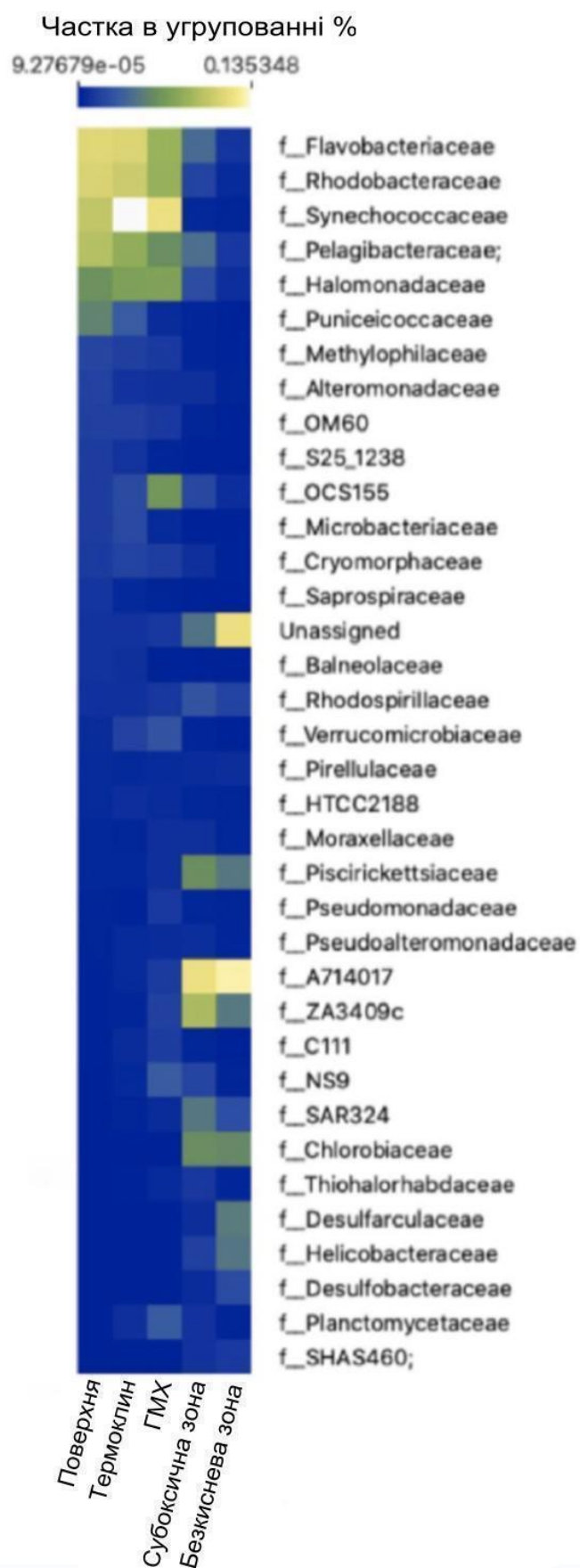


Рисунок 3.4 Таксономічний склад угруповань мікроорганізмів  
Чорного моря на рівні родин

Згідно отриманих нами даних, представники класів *Alphaproteobacteria* (12%) та *Flavobacteria* (8%) характеризувались нижчими показниками відносної поширеності, ніж в межах кисневої зони. Натомість переважали *Gammaproteobacteria* (20%), *AB16* (15%) та *Acidimicrobia* (13%) (Рис. 3.3). Значну частку мікробного угруповання субоксичної зони становили *Deltaproteobacteria* (8%), *Chlorobia* (7%), *Phycisphaerae* (5%). Водночас, кількість прокаріот із невизначеною таксономічною приналежністю зросла з 0,9% до 4,5% порівняно з верхніми шарами водного стовпа.

Згідно отриманих даних родина *A714017*, яка належить до класу *AB16*, кількісно переважала у субоксичній зоні Чорного моря і становила 12% (Рис. 3.4). Таксономічна група *AB16* належить до *Marinimicrobia*, представників якої знаходили в зонах кисневого мінімуму різних водних екосистем (Allers et al. 2012, Thrash et al. 2017, Cui et al. 2019), включно з Чорним морем (Fuchsman et al. 2011, Suominen et al. 2019). Хоча, дана таксономічна група переважно поширена у зонах кисневого мінімуму, у попередніх метагеномних дослідженнях було показано наявність потенціалу до аеробного дихання. Водночас, спостерігалась експресія генів, що відповідають за дисиміляційне відновлення нітрату, відновлення оксиду азоту та відновлення сульфуру (Suominen et al. 2019). Таким чином дані попередніх досліджень вказують на наявність потенційної здатності до перемикання між анаеробним та аеробним метаболізмом у *Marinimicrobia*, що може давати перевагу у екотонному середовищі субоксичних.

Згідно отриманих нами даних другою за відотною поширеністю у субоксичній зоні була родина *ZA3409c* (*Acidimicrobia*), що складала 9% (Рис. 3.4). У попередніх дослідженнях інших авторів фотогетеротрофні представники *Acidimicrobia* становили значну частку мікробних угруповань глибинного максимуму хлорофілу а та нижньої межі фотичного шару, де їх життєдіяльність підтримувалась за рахунок наявності решток органічної речовини та залишкового світла (Mizuno et al. 2015).

Нами було виявлено, що частка *Synechococcophycidae*, що становили до 13,5% досліджуваного угруповання мікроорганізмів у кисневій зоні, знизилась до 0,3% у субоксичній. Це пояснюється потребою даних бактерій в інтенсивнішому освітленні для забезпечення росту (Carey et al. 2012). Таким чином, нами було показано, що в межах субоксичної зони Чорного моря нішу автотрофних мікроорганізмів займають представники зелених сірчаних (*Chlorobia* (7%)) та несірчаних (*Anaerolineae* (1%)) бактерій, що здатні до росту в умовах безкисневого середовища з низькою інтенсивністю освітлення (Olson, 1998). На рівні родини зелені сірчані бактерії були представлені *Chlorobiaceae* і становили 6% в межах субоксичної зони (Рис. 3.5). Наші результати узгоджуються із дослідженнями інших авторів. Так, раніше у роботі Manske et al. (2005) було показано, що фототрофні зелені сірчані бактерії здатні до існування в межах редоксклину Чорного моря на глибині >100 м та за інтенсивності світла <0,001% від освітленості на поверхні. У попередніх дослідженнях у зразках, відібраних на глибині 150 м в центральній частині Чорного моря, було виявлено метаболічно активні мікроорганізми *Chlorobium* BS-1, в той час, як у зразках з периферійної частини Чорного моря такої активності не спостерігалось. (Marschall et al. 2010).

За даними нашого аналізу, *Gammaproteobacteria* були представлені родинами *Piscirickettsiaceae* (6%) та *Thiohalorhabdaceae* (1%), відносна поширеність яких значно зросла у порівнянні із зонами з високою концентрацією кисню, та *Halomonadaceae* (2%) (Рис. 3.4). Присутність даних таксономічних груп у субоксичній зоні Чорного моря узгоджується із даними попередніх досліджень, які засвідчили, що *Piscirickettsiaceae* мають специфічні адаптації до умов субоксичної зони і здатні до окиснення сульфідів (Kappler et al. 2016, Borin et al. 2009). Аналогічно *Thiohalorhabdaceae* використовують відновлені сполуки сульфору, як джерело енергії, а кисень та нітрат у якості акцепторів електронів (Sorokin et al. 2020).

*Deltaproteobacteria*, відносна поширеність яких виросла до 8% у субоксичній зоні, були переважно представлені родиною SAR 324 (5%). У попередніх дослідженнях було показано здатність SAR 324 до відновлення

нітрату та дисиміляційного відновлення сульфату (Sheik et al. 2014) та значну роль даних бактерій у циклах сульфуру та азоту в зоні кисневого мінімуму та безкисневому середовищі (Sheik et al. 2014, Cao et al. 2016), зокрема у субоксичній зоні Чорного моря (Fuchsman et al. 2011).

Згідно отриманих нами даних, частка *Alphaproteobacteria* скоротилась у порівнянні із поверхнею, термоклинном та зоною глибинного максимуму хлорофілу і склала 12%. У даному класі нами було переважно виявлено представників *Pelagibacteraceae* (4%) та *Rhodospirillaceae* (3%) (Рис. 3.4). Раніше було показано, що пурпурні сульфур-бактерії *Rhodospirillaceae* здатні, як до фотогетеротрофного метаболізму в безкисневих умовах за присутності світла, так і до хемогетеротрофного метаболізму в темряві (Baldani et al. 2014). Імовірно, здатність до хемогетеротрофного живлення забезпечує існування даної таксономічної групи у субоксичній зоні Чорного моря.

*Epsilonproteobacteria* характеризувались значно вищою відносною поширеністю у порівнянні із верхніми, насиченими киснем шарами водного стовпа, становили до 2% мікробного угруповання субоксичної зони і були представлені однією родиною - *Helicobacteraceae* (Рис. 3.4). За попередніми оцінками на *Epsilonproteobacteria* припадає від 75 до 100% асиміляції CO<sub>2</sub> в Чорному морі і представники даного класу є основними фіксаторами CO<sub>2</sub> в досліджуваній екосистемі (Grote et al., 2007). Загалом відомо, що і *Epsilon*-, і *Gammaproteobacteria* відіграють роль у процесі фіксації CO<sub>2</sub> в Чорному та Балтійському морях в зоні редоксклину (Grote et al. 2007, Glaubitz et al. 2010). Проте, раніше було продемонстровано, що *Epsilonproteobacteria* характеризуються вищою активністю в цьому процесі, маючи нижче таксономічне різноманіття (Glaubitz et al. 2010, Kirkpatrick et al. 2018). Згідно отриманих нами даних *Gammaproteobacteria* значно чисельно переважають над *Epsilonproteobacteria*, однак це не дозволяє зробити висновки щодо різниці у хемоавтотрофній активності цих класів.

На момент відбору на більшості станцій в межах субоксичної зони був відсутній сірководень (Додаток 9). Таким чином, значна кількість таксономічних

груп, що здатні до окиснення сполук сульфуру, у отриманих нами даних може бути пояснена феноменом криптичного циклу сульфуру, у якому процеси окиснення та відновлення пов'язані між собою та із денитрифікацією та анаеробним окисненням амонію - анамоксом (Canfield et al. 2010). Присутність криптичного циклу сульфуру підтверджується встановленим нами поширенням представників *Deltaproteobacteria*: *SAR324* (5%), *Desulfarculaceae* (0,6%) and *Desulfobacteraceae* (0,6%) (Рис. 3.4), які здатні займати анаеробні ніші утворені нерозчиненою органічною речовиною. Можна припустити, що дані таксономічні групи, а також зелені сірчані та несірчані бактерії здатні постачати сірководень для сірко-окислюючих бактерій у субоксичній зоні Чорного моря.

*Таксономічна структура угруповань бактеріопланктону безкисневої (сірководневої) зони*

Згідно отриманих нами даних, представники *AB16* (17%) та *Deltaproteobacteria* (13%) кількісно переважали над представниками *Gammaproteobacteria* (12%) у безкисневій зоні Чорного моря (Рис. 3.4), що відповідає домінуванню процесу відновлення над процесами окиснення сполук сульфуру в анаеробних умовах. Відносна поширеність *Epsilonproteobacteria* зросла у порівнянні з верхніми шарами водного стовпа і становила 5%.

Нами було показано, що таксономічна структура мікробного угруповання зазнає поступових змін під час переходу від субоксичної до безкисневої зони. Так, безкиснева зона, що лежить в межах глибин 83 – 159 м є екотонним середовищем між зоною із низьким вмістом кисню та глибокою сірководневою зоною і, відповідно, населена угрупованнями мікроорганізмів, що таксономічно подібні до субоксичних. Водночас, таксономічна структура угруповання мікроорганізмів глибокої сірководневої зони характеризується значним поширенням груп, здатних до ферментації, таких як клас *MSBL2* (*Spirochaetes*) (Daffonchio et al. 2006, Dong et al. 2018), що згідно отриманих даних становлять 15% від досліджуваного угруповання (Рис. 3.3). Внаслідок процесу ферментації утворюється ацетат, водень та етанол, які сприяють поширенню сульфат-редуючих бактерій, таких, як *Deltaproteobacteria*, які використовують водень,

як відновник у глибокій безкисневій зоні Чорного моря (Dong et al. 2018). Крім того, водень використовується як донор електронів у процесі органогалідного дихання бактеріями роду *Dehalococcoides* (Röling et al. 2007), відносна поширеність яких склала 5% (Рис. 3.4). Представники *Anaerolineae* (*Chloroflexi*), що, згідно отриманих нами даних, складала до 14% у мікробних угрупованнях глибокої безкисневої зони (Рис. 3.3), також використовують водень та сірководень, як донори електронів, а різноманітні органічні субстрати (цукри, амінокислоти), як джерело вуглецю. За рахунок цього механізму в умовах відсутності світла забезпечується життєдіяльність *Chloroflexi*, яким зазвичай властиве фотогетеротрофне та фотоавтотрофне живлення (Vuillemin et al. 2020).

Нами було показано, що *Chlorobiaceae* характеризувались високою відносною поширеністю в межах верхньої безкисневої зони і досягали 22% (Рис. 3.4), чому сприяють характерні умови середовища, такі як залишкове світло на глибині 80 - 110 м, дефіцит кисню та присутність сірководню. Масимальні значення відносної поширеності *Chlorobiaceae* спостерігались в межах глибин 82 - 99 м, як у субоксичній, так і в безкисневій зоні, в той час, як на інших глибинах дані показники були суттєво нижчими. Так, відносна поширеність знизилась до 0,08% в глибокій безкисневій зоні (750 - 1000 м) (Рис. 3.4).

Варто зазначити, що деякі таксономічні групи прокаріот, що були ідентифіковані в межах субоксичної зони, були поширені і в сірководневій зоні, хоча безкисневе середовище є для них несприятливим. Так, згідно отриманих даних, представники *Piscirickettsiaceae* та *Helicobacteraceae*, складала в середньому 6% від угруповання в межах верхніх шарів безкисневої зони (Рис. 3.4). Очікувано, відносна поширеність даних таксономічних груп значно знизилась із глибиною і становила, відповідно 0,05% та 0,2% на 1000 м.

Сульфатвідновлювальні бактерії, що відіграють важливу роль у процесі розкладу органічної речовини в анаеробних умовах (Jørgensen 1982, Muyzer&Stams 2008), характеризувались високим різноманіттям та поширеністю в безкисневій зоні (Рис. 3.4). В межах цієї групи нами було ідентифіковано *Desulfarculaceae* (6%), *SAR324* (3%) та *Desulfobacteraceae* (2%). *Desulfarculaceae*

та *Desulfobacteraceae* були серед домінуючих таксономічних груп у глибокій безкисневій зоні і становили 6% та 4% відповідно. Водночас, поширеність *SAR324* знизилась із зростанням глибини і скоротилась до 0,02% на 1000 м.

Гетеротрофна складова мікробного угруповання безкисневої зони була представлена родинами *A714017* (16%) та *SHAS460* (2%), що належать до монофілетичної групи *SAR406* і потенційно здатні до відновлення сполук сірки (Рис. 3.4).

Важливо зазначити, що 7% мікробного угруповання верхніх шарів безкисневої зони лишилось таксономічно неідентифікованим на рівні родини, в той час, як у глибокій сірководневій зоні цей показник становив до 30%. Очевидно, що значна частка мікроорганізмів, які населяють глибоку безкисневу зону є наразі недослідженими (а отже відсутніми у референсних базах даних), що вказує на актуальність майбутніх культуральних досліджень, спрямованих на вивчення їх таксономії, фізіології та генетики (Suominen et al. 2019).

З метою встановлення взаємозв'язків між таксономічними групами мікроорганізмів водного стовпа Чорного моря було проведено кореляційний аналіз за Спірменом. Згідно результатів аналізу, досліджувані мікробні угруповання Чорного моря ієрархічно кластеризуються у 6 груп, що ілюструє їх співіснування та може бути екстрапольовано на їх спільні вимоги до середовища та спільну екологічну нішу (Рис. 3.5).

1. Таксономічні групи прокариот, які пристосовані до життєдіяльності в умовах присутності сірководню: *Desulfobacteraceae*, *Helicobacteraceae*, *Chlorobiaceae*, *Piscirickettsiaceae*, *Desulfarculaceae*, *SHAS460*, *A714017*.

2. Мікроорганізми, які здатні до росту в анаеробних чи субоксичних умовах, однак потребують світла - фотогетеротрофи *ZA3409c* та *Rhodospirillaceae*, а також представники *Thiohalorhabdaceae*.

3. Таксономічні групи, представники яких ведуть прикріплений спосіб життя, часто зустрічаються в угрупованнях асоційованих з цвітінням фітопланктону, в яких активно залучені до розкладу полісахаридів: *Alteromonadaceae*, *Microbacteraceae*, *Rhodobacteraceae* та *Saprospiraceae*.



4. Вільноживучі та прикріплені форми гетеротрофних та автотрофних мікроорганізмів, переважно аеробів: *Synechococcaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Pelagibacteriaceae*, *Balneolaceae*.

5. Копіторофні бактерії, що пристосовані до високих концентрацій фітопланктону та до розкладу високомолекулярних сполук - *OSC155*, *Planctomycetacea* та *Verrucomicrobiaceae*.

6. Представники *Pseudomonadaceae* and *Pseudoalteromonadaceae*.

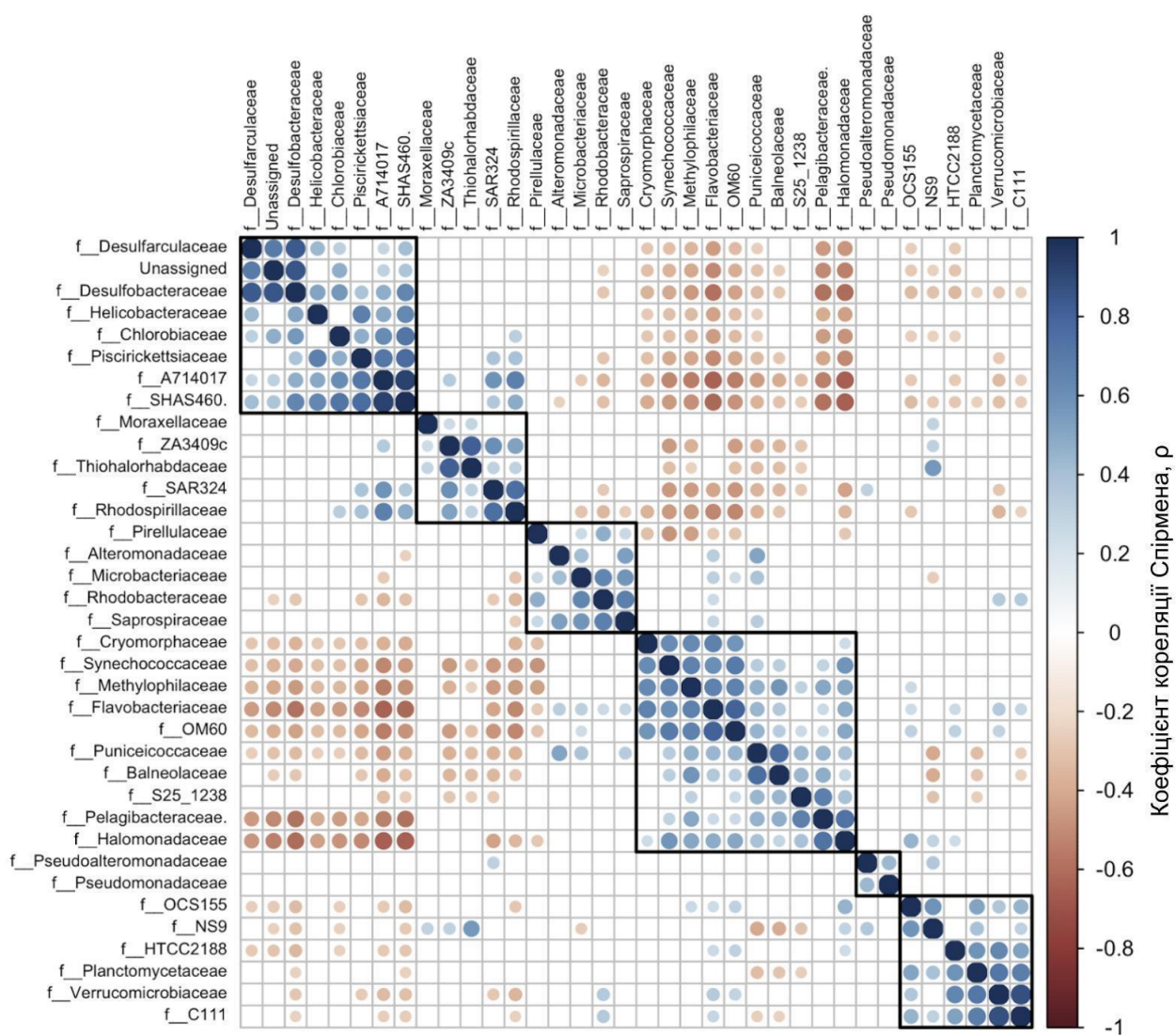


Рисунок 3.5 Кластеризація таксономічних груп угруповання бактеріопланктону Чорного моря на рівні родин

Варто звернути увагу на диференціацію таксономічних груп мікроорганізмів, які є поширеними у поверхневих водах, зокрема під час цвітіння фітопланктону, що віддзеркалює їх спеціалізацію до різних субстратів, які надходять від фітопланктону. Так, було встановлено присутність позитивної кореляції між поширеністю представників третьої та четвертої групи та чисельністю діатомових водоростей у поверхневих водах ( $r=0,67$ ,  $p = 0,034$  та  $r=0,75$ ,  $p = 0,001$  відповідно).

### **3.1.2 Функціональна структура угруповань бактеріопланктону Чорного моря**

Понад 50% функціональної структури угруповань бактеріопланктону Чорного моря було представлено компонентами метаболічних шляхів, що відповідають за фундаментальні функції, такі, як метаболізм нуклеотидів і амінокислот та процесинг генетичної інформації. З метою встановлення ролі досліджуваного угруповання мікроорганізмів в екосистемі Чорного моря було проведено детальніший аналіз із набором ортологів, які відповідають за найважливіші специфічні функції мікроорганізмів морського середовища, пов'язані із перетвореннями в циклах карбону, азоту та сульфуру. Для встановлення потенційної функціональної активності було застосовано біоінформаційний аналіз PICRUST (Douglas et al. 2019), що дозволяє передбачити функції за даними 16S-сиквенування.

Розподіл функціональних компонентів мікробного угруповання відповідав градієнту хімічних параметрів морського середовища та таксономічній структурі бактеріопланктону (Додаток 9, Рис. 3.4). Згідно отриманих нами результатів аналізу PICRUST найпоширенішими функціями угруповання бактеріопланктону поверхні та термоклинну були асиміляційне відновлення сульфатів (40 – 47%) та окиснений фотосинтез (19%) (Рис. 3.6). Відомо, що компоненти метаболічного шляху асиміляційного відновлення сульфатів присутні у переважній більшості

аеробних мікроорганізмів морського середовища, оскільки саме цей процес відповідає за біосинтез сульфуровмісних амінокислот (Tripp et al. 2008).

Зі збільшенням глибини спостерігалось відповідне зменшення частки функціональних компонентів окисного фотосинтезу, визначеною за PICRUST, водночас аноксигенний фотосинтез набував поширеності і досягав 7% в субоксичній та безкисневій зоні Чорного моря (Рис. 3.6). У попередніх дослідженнях в субоксичній зоні Чорного моря було виявлено зелені сірчані бактерії, що пристосовані до існування в умовах низького освітлення та анаеробного середовища за рахунок специфічних адаптацій таких, як наявність великих фотосинтетичних антен та толерантність до високих концентрацій сульфідів (Manske et al. 2005, Overmann et al. 2006). Крім того, раніше у субоксичній та безкисневій зоні було встановлено високі концентрації бактеріохлорофілу-*c* (Ediger et al. 2019). Отже, отримані нами дані щодо зростання ролі аноксигенного фотосинтезу із глибиною узгоджуються із попередніми дослідженнями.

Також, згідно отриманих нами даних, значну частку становили компоненти метаболічних шляхів, що залучені до трансформацій в межах циклу азоту. Так, асиміляційне та дисиміляційне відновлення нітратів складало 9% та 8% відповідно в межах поверхневих вод та 8% та 7% в межах термоклин (Рис. 3.6). Було відмічено тенденцію до зниження потенційної асиміляційної нітратредуктазної активності з глибиною, водночас частка дисиміляційного процесу зростає в субоксичній та безкисневій зонах. Відомо, що відновлення нітратів є енергозалежним процесом, що вимагає утворення достатньої кількості АТФ внаслідок фотосинтезу (Shapleigh 2009). Таким чином зниження інтенсивності фотосинтезу з глибиною опосередковано призводить до дефіциту джерела азоту для асиміляційного відновлення нітратів, внаслідок чого спостерігається домінування дисиміляційного процесу у субоксичній та сірководневій зонах Чорного моря.

Проведений нами PICRUST аналіз показав, що частка дисиміляційного відновлення нітрату становила 7 - 8% в межах насиченої киснем частини водного

стовпа і зростала до 11 - 12% у безкисневій зоні (Рис. 3.6). Достатньо високу потенційну активність нітрифікаційного та дисиміляційного нітратредуктазного процесів у поверхневих водах, зонах термоклину та максимуму хлорофілу можна пояснити наявністю мікроаерофільного середовища, що утворюється внаслідок надходження частинок від розкладу клітин фітопланктону. Варто зазначити, що згідно попередніх досліджень активність дисиміляційного відновлення нітрату була доволі низькою в субоксичній зоні Балтійського моря, яка має багато спільних із Чорним морем характеристик (Bonaglia et al., 2016). Потенційною причиною даної неузгодженості є різниця у методології, оскільки у Балтійському морі було застосовано винятково культуральний метод.

Аналогічно до DNRA роль процесу денітрифікації у досліджуваному мікробному угрупованні зростала з глибиною. Так, згідно отриманих нами даних, на денітрифікацію припадало 5 - 7% у насичених киснем водах і до 12% у безкисневій зоні (Рис. 3.6). Нами було виявлено всі компоненти процесу повної денітрифікації: ортологи *narG*, *narZ*, *nxrA* (нітрат-редуктаза), *nirK* (нітрит-редуктаза), *norB* (редуктаза оксиду азота (цитохром c)) та *nosZ* (N<sub>2</sub>O-редуктаза). Водночас, аналіз PICRUST не виявив ортологів гену *nirS*, що узгоджується з даними щодо процесу денітрифікації в мікробних угрупованнях субоксичних зон інших морських екосистем, у яких *nirK* значно кількісно переважав над *nirS* (Fuchsman et al. 2017, Pajares et al. 2019). Проте, за даними попередніх досліджень мікробних угруповань екосистеми Чорного моря, процес денітрифікації відбувається, із залученням і гену *nirK*, і гену *nirS* (Oakley et al. 2007, Kirkpatrick et al. 2012). Тому відсутність ортологу *nirS* може бути технічним недоліком PICRUST, що є непрямим методом оцінки і покладається на 16S послідовності, що наявні у базах даних. 16S послідовності бактерій, що відповідають за денітрифікацію в екосистемі Чорного моря, можуть бути відсутніми у базах, оскільки у попередніх дослідженнях даних таксономічних груп використовувались винятково послідовності відповідних функціональних генів (Oakley et al. 2007 та Kirkpatrick et al. 2012).

За даними проведеного нами аналізу PICRUST нитрифікація досягала свого максимуму в межах зони глибинного максимуму хлорофілу і становила 27% (Рис. 3.6). Відомо, що процес нитрифікації є зазвичай аеробним і включає окиснення амонію до гідроксиламіну ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), окиснення  $\text{NH}_2\text{OH}$  до  $\text{NO}_2^-$  та окиснення  $\text{NO}_2^-$  до  $\text{NO}_3^-$ . Нами було виявлено ортологи генів, що кодують ферменти, залучені на кожному із зазначених етапів нитрифікації, отже досліджуване мікробне угруповання може потенційно містити представників, що відповідають як за окремі етапи процесу нитрифікації, так і за повну трансформацію  $\text{NH}_4$  у  $\text{NO}_3^-$  (комамокс, повне окиснення амонію).

Встановлені нами максимальні значення нитрифікації в зоні глибинного максимуму хлорофілу можуть бути результатом доступності продуктів лізису клітин фітопланктону. Отримані результати узгоджуються із попередніми дослідженнями, згідно яких у субоксичній зоні Чорного моря відбувається процес мікроаерофільної нитрифікації, внаслідок якого утворюється локальне джерело нітриту для анамоксу (Lam et al. 2007). Крім того, отримані дані щодо присутності функціональних компонентів нитрифікації в межах субоксичної та безкисневої зони Чорного моря узгоджуються із дослідженнями інших зон кисневого мінімуму, для яких було показано нитрифікаційну активність (Bristow et al. 2016, 2017, Sun et al. 2017).

Варто відмітити, що згідно отриманих даних, нитрифікація було значно менш поширена в поверхневих водах Чорного моря. Цей феномен пояснюється процесом фотоінгібування (Peng et al. 2016, Horak et al. 2018), через який фітопланктон отримує конкурентну перевагу над нитрифікуючим бактеріопланктоном, який характеризується низькими темпами росту (Smith et al. 2014).

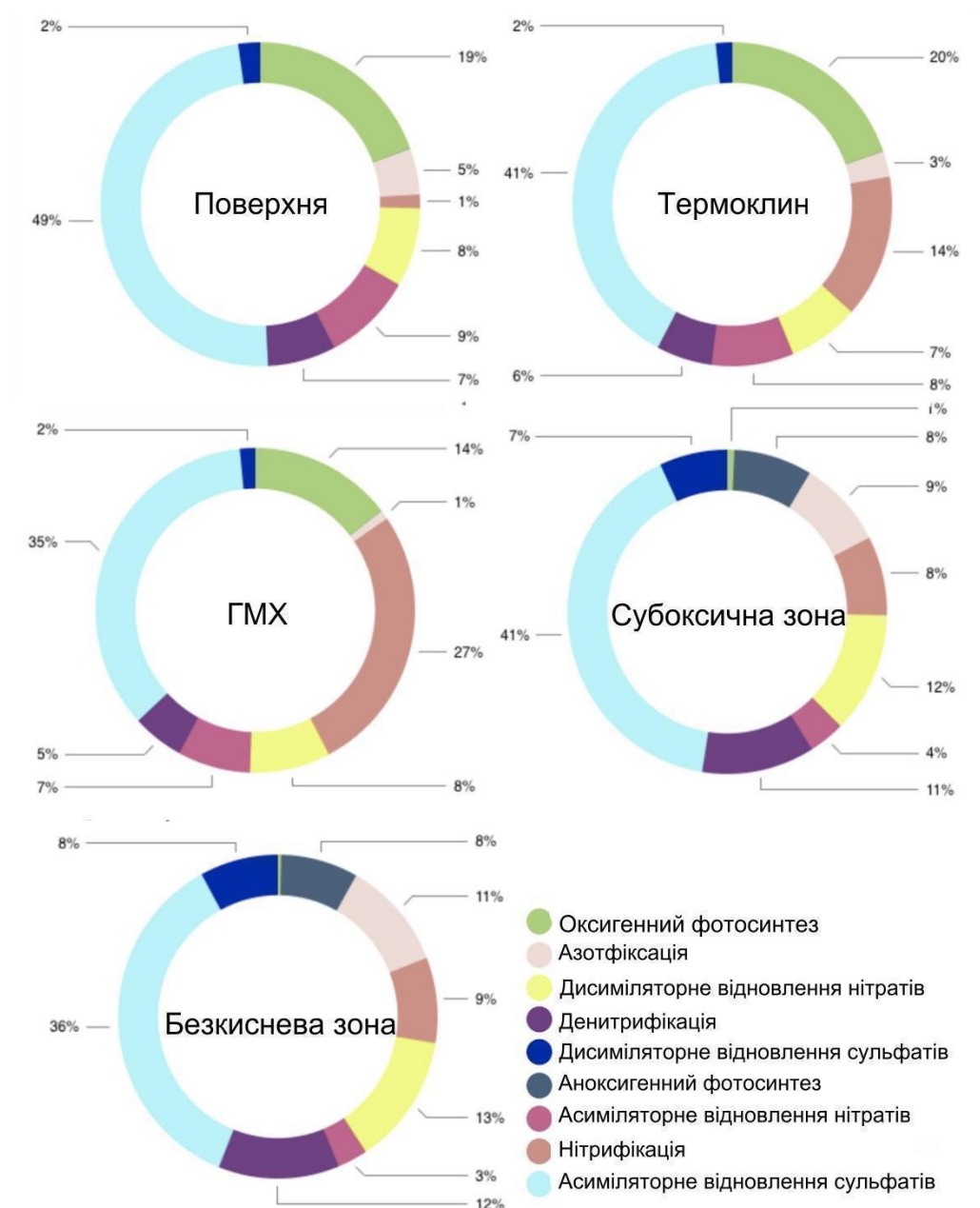


Рисунок 3.6 Розподіл компонентів функціональної структури угруповання бактеріопланктону Чорного моря за глибинами відбору

Згідно отриманих нами даних потенційна активність азотфіксації зростала з глибиною і досягала максимальних 11% в межах сірководневої зони Чорного моря (Рис. 3.6). Потенційною причиною встановленого переважання процесу азотфіксації у безкисневій зоні Чорного моря у порівнянні з поверхневими водами, є чутливість нітрогеназного комплексу до  $O_2$  (Pajares & Ramos 2019).

Крім того, даний процес підтримує висока денитрифікаційна активність в межах субоксичної та сірководневої зони (Deutsch et al. 2007). Отримані нами дані аналізу PICRUST узгоджуються із попередніми спостереженнями щодо активної азотфіксації у субоксичній та безкисневій зоні Чорного моря (Kirkpatrick et al. 2018).

Нами не було виявлено компоненти анаеробного окиснення амонію (анамоксу) у функціональній структурі досліджуваного угруповання мікроорганізмів. Подібну ситуацію було виявлено в інших зонах кисневого мінімуму, для яких характерне значне переважання денитрифікації над анамоксом (Bulow et al. 2010, Dalsgaard et al. 2012). Однак, за попередніми дослідженнями у водах Чорного моря, анаеробне окиснення амонію превалює над процесом денітрифікації і, відповідно, вважається основним механізмом асиміляції фіксованого азоту у центральній глибоководній частині Чорного моря (Kuypers et al. 2003, Jensen et al. 2008). Також, присутність анамокс-бактерій роду *Candidatus Scalindua* було раніше встановлено, як у верхній, так і в нижній частині субоксичної зони (Fuchsman et al. 2012).

Згідно отриманих нами даних *Candidatus Scalindua* були присутні у таксономічній структурі мікробного угруповання субоксичної зони Чорного моря (Sigma-theta 15,8 - 16,0), проте їх частка була достатньо низькою і становила до 0,5%. Такі низькі показники є нетиповими для досліджуваної екосистеми і можуть бути викликані специфічними характеристиками обраних універсальних 16S праймерів, що є неоптимальними для детекції конкретно цього роду (Harhangi et al. 2012, Fuchsman et al. 2012, Yang et al. 2019). В результаті цього дані щодо поширеності *Candidatus Scalindua* можуть бути недостатніми для ефективного картування 16S послідовностей у програмі PICRUST (Lincy & Manohar 2020).

Проведений нами аналіз PICRUST дозволив виявити функціональні компоненти дисиміляційної сульфат-редукції: ортологи генів аденілілсульфатредуктази (*AprAB*: відновлення аденозинфосфосульфату (АФС) до сульфіту) та альфа-субодиниці дисиміляційної сульфітредуктази

(*DsrAB*: відновлення сульфїду до сульфїту), що разом складали від 2% (у насичених киснем водах) до 7 – 8% у функціональній структурі мікробного угруповання субоксичної та безкисневої зони (Рис. 3.6). За попередніми дослідженнями *AprAB* та *DsrAB* є основними ферментами, що каталізують дисиміляційну сульфат-редукцію у мікробних угрупованнях Чорного моря (Basen et al. 2011). Згідно отриманих нами даних зростання ролі дисиміляційної сульфатредукції співпадає із збільшенням частки DNRA та денітрифікації у функціональній структурі угруповання мікроорганізмів безкисневої зони. Подібна взаємопов'язаність біогеохімічних циклів сульфору та азоту раніше реєструвалась у Чорному морі (Fuchsman et al. 2012) та в районі Готландської западини Балтійського моря (Hannig et al. 2007).

Варто зазначити, що нами було зафіксовано функціональні компоненти дисиміляційної сульфат-редукції у функціональній структурі мікробного угруповання поверхневих вод Чорного моря, хоча даний процес зазвичай носить облігатно анаеробний характер (Jorgensen 2019). Однак, оскільки дані ортологи складали до 2%, можна припустити, що дисиміляційна сульфат-редукція є обмеженою у насичених киснем водах Чорного моря і відбувається в межах анаеробних еконіш утворених нерозчиненою органічною речовиною (Rabus et al. 2006, Fuchsman, et al. 2012).

З метою встановлення факторів впливу морського середовища на функціональний профіль досліджуваного угруповання мікроорганізмів було проведено кореляційний аналіз за Спїрменом між гідрофізичними/гідрохімічними показниками Чорного моря та функціональними компонентами, визначеними за PICRUST.



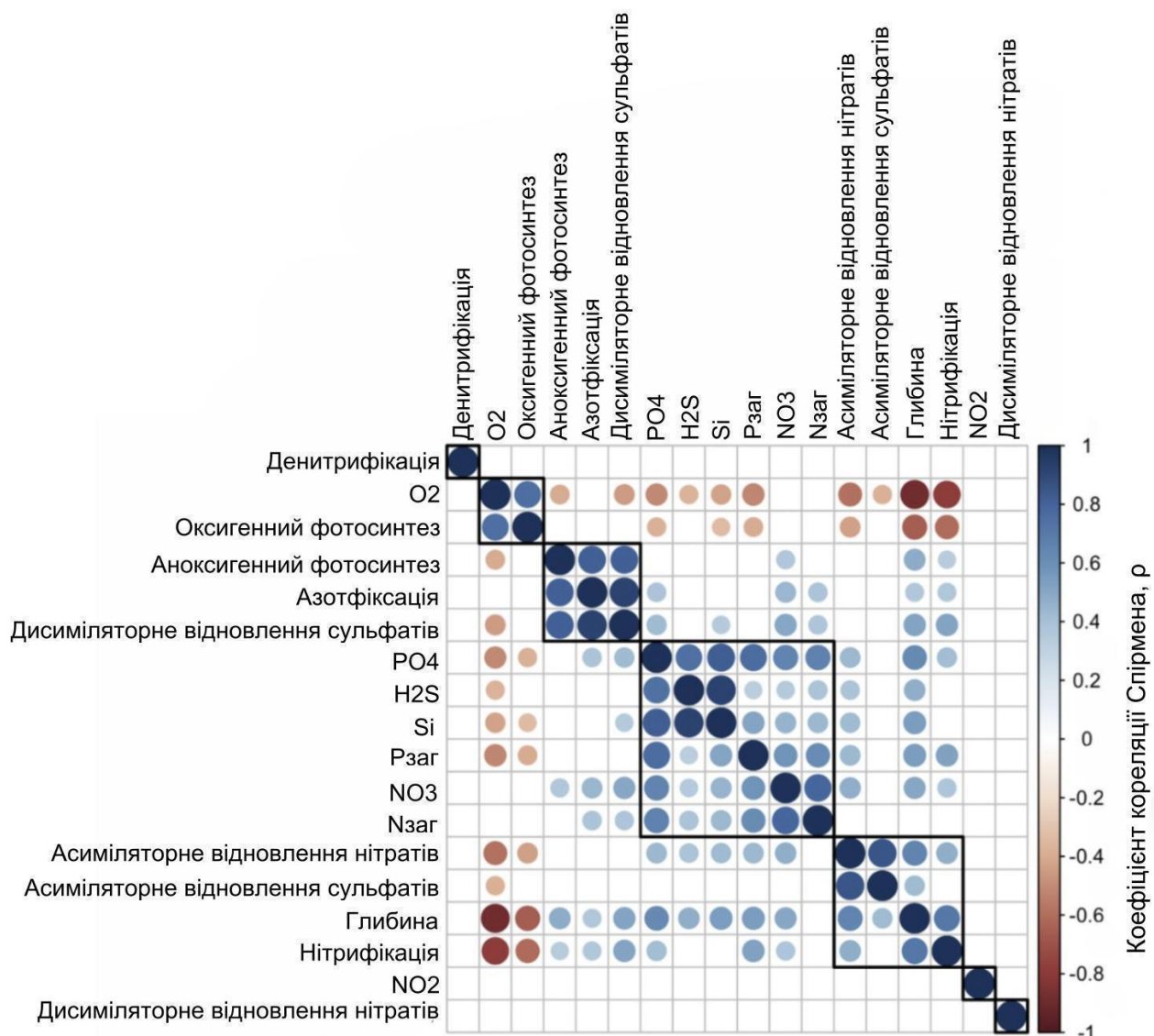


Рисунок 3.7 Кластеризація компонентів функціональної структури угруповання бактеріопланктону Чорного моря згідно кореляції із параметрами навколишнього середовища

За даними кореляційного аналізу за Спірменом глибина та концентрація O<sub>2</sub>, PO<sub>4</sub> та NO<sub>3</sub> є найважливішими факторами формування функціональної структури досліджуваного угруповання (Рис. 3.7). Аноксигенний фотосинтез, азотфіксація та дисимільаційна сульфатредукція утворюють спільний кластер, який характеризувався найбільшою поширеністю в межах субоксичної та безкисневої зон. Відомо, що процес аноксигенного фотосинтезу потребує

присутності донорів електронів неорганічного походження, таких як сірководень, що є саме продуктом дисиміляційної сульфатредукції. Згідно попередніх досліджень, відновлення сульфату відбувається паралельно із окисненням сульфідів у зонах кисневого мінімуму морських екосистем, як частина криптичного циклу сульфуру (Lavik et al. 2009, Canfield et al. 2010, Carolan et al. 2015). У свою чергу, процес окиснення сульфідів пов'язаний із нітратредукцією, результатом якої є утворення  $N_2$ , що сприяє високій активності азотфіксації у субоксичних та безкисневих водах.

Окремий кластер утворюють асиміляційна нітратредукція, нітрифікація та асиміляційна сульфатредукція (Рис. 3.7). Гетеротрофна нітрифікація органічних решток, утворених внаслідок лізису клітин фітопланктону, призводить до утворення нітрату, який відновлюється до амонію шляхом асиміляційної нітратредукції. Дане твердження підтверджується високою концентрацією  $NO_3^-$  в межах зони глибинного максимуму хлорофілу чорного моря (Додаток 9).

Аналогічно, з метою ілюстрації зв'язку між таксономічним складом досліджуваного угруповання та розподілом його функціональних компонентів було проведено кореляційний аналіз за Спірменом.

Нами було встановлено присутність позитивної кореляції між поширеністю окисного фотосинтезу та дисиміляційного відновлення нітратів та часткою *Flavobacteriaceae*, *Synechococcaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Planctomycetaceae*, *Pelagibacteraceae* та *Microbacteraceae* (Рис. 3.8). Аноксигенний фотосинтез, денитрифікація та дисиміляційне відновлення сульфатів характеризувалися позитивною кореляцією із часткою *A714017*, *Piscirickettsiaceae*, *Chlorobiaceae*, *Helicobacteraceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfarculaceae*, які за даними нашого аналізу переважали на значних глибинах, з низькою концентрацією кисню та освітленістю (Рис. 3.8).

Таким чином, кореляційний аналіз за Спірменом показав присутність зв'язку між таксономічним, функціональним складом досліджуваного мікробного угруповання та градієнтом фізико-хімічних параметрів середовища, обумовленим вертикальною стратифікацією.

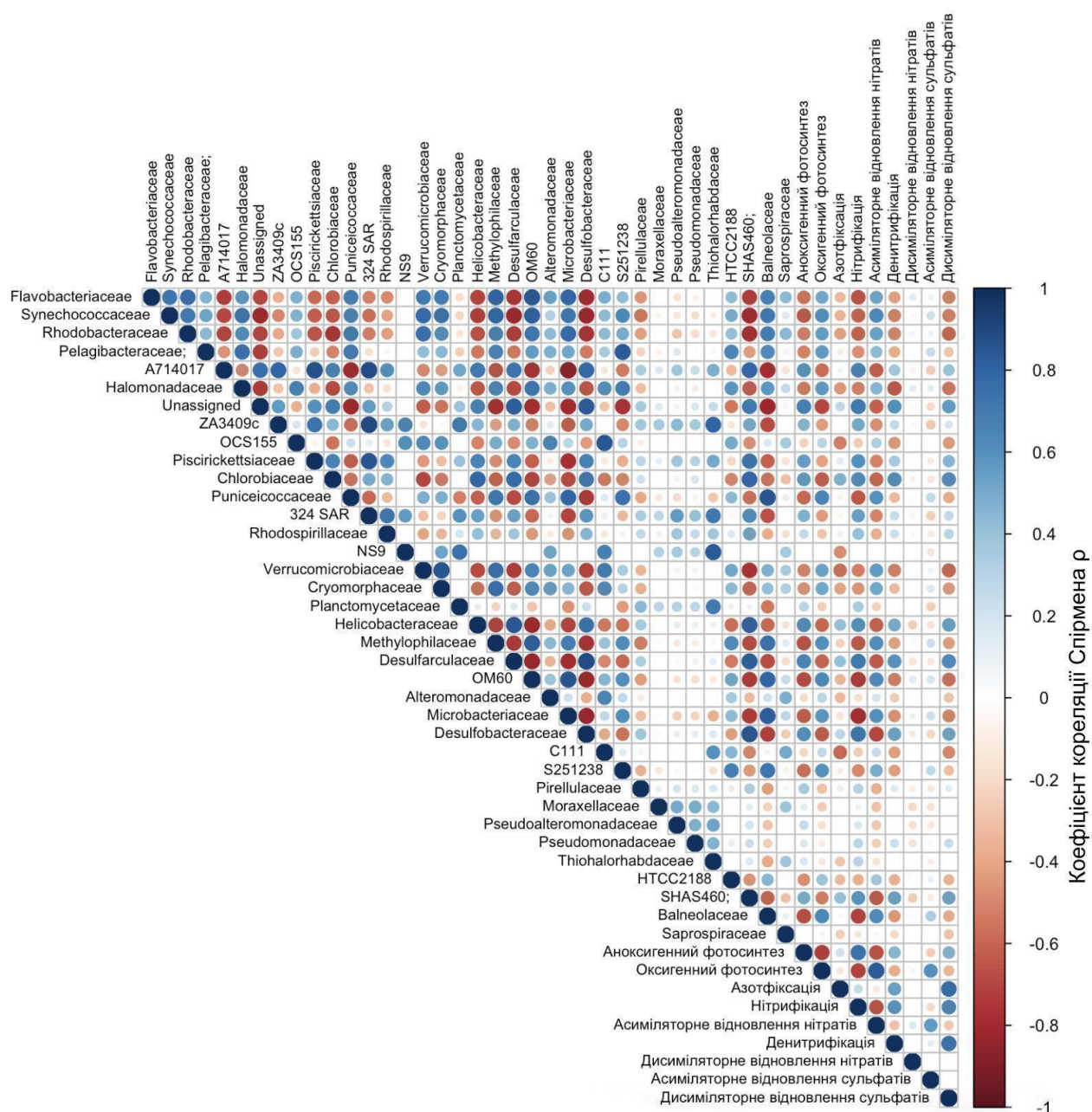


Рисунок 3.8. Кореляція між таксономічним складом та функціональним профілем угруповання мікроорганізмів Чорного моря

### 3.1.3 Диференціація угруповань бактеріопланктону Чорного моря за таксономічною та функціональною структурою

З метою оцінки факторів, що впливають на формування таксономічної та функціональної структури угруповань мікроорганізмів Чорного моря було проведено аналіз регіональної (порівняння українського шельфу та відкритих вод) та вертикальної (порівняння насиченої киснем, субоксичної та безкисневої зон водного стовпа) диференціації угруповань.

#### *Регіональна диференціація угруповань бактеріопланктону*

За даними аналізу подібності (ANOSIM) зразки, відібрані в зоні українського шельфу та відкритих вод кластеризувались окремо (Рис. 3.2). Оскільки шельф обмежений 100 м ізобатою, і не містить субоксичної та сірководневої зони регіональне порівняння мікробного угруповання було проведено в межах поверхні, термоклинну та зони глибинного максимум хлорофілу. Диференціацію таксономічної структури було оцінено на рівні класу та родини.

В межах поверхневих вод було виявлено 14 класів прокариот, поширеність яких статистично достовірно відрізнялась між шельфом та центральною частиною Чорного моря (тест Краскела-Уоліса ( $p < 0,05$ )). Так, *Saprospirae*, *Spartobacteria* та *Mollicutes* були більш поширені в шельфовій зоні, а *Betaproteobacteria* - у відкритих водах. 6 класів було статистично відмінними в межах зони термоклинну, зокрема представники *BME43* переважали в шельфових водах, а *Oscillatoriothysceae* - у центральній частині. Поширеність 12 класів бактеріопланктону статистично відрізнялась в межах глибинного максимум хлорофілу. Так, більше *Verrucomicrobiae* та *Cytophagia* було виявлено у шельфовій зоні, а представники *Bacilli*, *SAR202* та *Epsilonproteobacteria* частіше зустрічались у зразках з відкритих вод.

Загалом статистично відмінні таксономічні групи прокариот характеризувались низькими значеннями відносної поширеності і становили до

5% мікробних угруповань. Водночас, частка домінуючих класів була подібною в обох проаналізованих регіонах.

Значно більше відмінностей таксономічної структури було виявлено на рівні родини. В межах поверхневих вод статистично відрізнялась поширеність 43 родин прокаріот, з-поміж яких *Rhodobacteraceae*, *Saprospiraceae*, *Microbacteriaceae* та *Caulobacteraceae* переважали в шельфових водах України, а *Rhodospirillaceae*, *Piscirickettsiaceae* та *Cyanobacteriaceae* - у центральній частині Чорного моря. Представники 38 родин характеризувались різною поширеністю в межах термоклину. У зразках з шельфових вод було виявлено більше *Saprospiraceae*, *Caulobacteraceae*, *Comamonadaceae* та *Actinomycetaceae*, а у відкритих водах - *Marine Group II*, *Geobacteraceae* та *Microbacteriaceae*. Аналогічно 38 родин кількісно відрізнялись в межах зони глибинного максимуму хлорофілу. Так, частка *Rhodobacteraceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Sphingomonadaceae* та *Microbacteriaceae* була вищою в районі шельфу. Суттєвою відмінністю між двома порівнюваними регіонами була поширеність *Rhodobacteraceae*, що є однією з домінуючих родин у структурі досліджуваних мікробних угруповань і статистично достовірно відрізняється в межах поверхні та зони глибинного максимуму хлорофілу в районі шельфу та відкритих вод.

За даними аналізу ANOSIM у функціональній структурі досліджуваних мікробних угруповань не було зареєстровано статистично достовірних відмінностей між двома регіонами (тест Краскела-Уоліса ( $p < 0,05$ )). Однак, 106 статистично відмінних функціональних компонентів було виявлено під час окремого аналізу мікробних угруповань поверхневих вод шельфу та центральної частини Чорного моря. Дані функціональні компоненти стосувалися прокаріотичної фіксації карбону, метаболізму порфірину та хлорофілу а, біосинтезу амінокислот, метаболізму сполук азоту, фотосинтезу, біосинтезу каротеноїдів та метаболізму сполук сульфуру.

Відмінності у таксономічній та функціональній структурі угруповань мікроорганізмів двох досліджуваних регіонів можуть бути викликані більшим видовим різноманіттям та вищою біомасою фітопланктону в районі українського

шельфу у порівнянні із відкритими водами, що впливає на тип та доступність субстрату для розвитку бактеріопланктону (Slobodnik et al. 2017).

### *Вертикальна диференціація угруповань бактеріопланктону*

Аналіз вертикальної диференціації угруповань мікроорганізмів було проведено для відкритих вод центральної частини Чорного моря. За даними аналізу ANOSIM нами було виявлено 132 класи і 292 родини із статистично відмінною поширеністю на різних глибинах. Детальний опис відмінностей між таксономічною структурою угруповань бактеріопланктону поверхні, термоклин, глибинного максимуму хлорофілу, субоксичної та безкисневої зони наведено вище (Розділ 3.2).

У функціональній структурі досліджуваних угруповань на основі отриманих нами даних PICRUST було виявлено 288 компонентів метаболічних шляхів, частка яких була достовірно відмінною (тест Краскела-Воліса ( $p < 0,05$ ) на різних глибинах водного стовпа (Додаток 10). Очікувано, жодних відмінностей функціональної структури не було зареєстровано між поверхневими водами та термоклин. Натомість, найбільше відрізнявся набір ортологів виявлених у зразках з поверхні та у зразках з субоксичної та безкисневої зони. Серед компонентів метаболічних шляхів із достовірно різною поширеністю були як ті, що стосуються загального метаболізму (метаболізм амінокислот та нуклеотидів), так і такі, що відповідають за специфічніші функції (фотосинтез, метаболізм сполук сульфуру та азоту, розклад ксенобіотиків тощо).

З метою порівняння впливу факторів навколишнього середовища та географічної відстані на диференціацію таксономічної та функціональної структури досліджуваного угруповання бактеріопланктону було застосовано тест Мантеля. Глибина, концентрація кисню, сірководню та нутрієнтів ( $\text{PO}_4$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{P}_{\text{заг}}$ ,  $\text{N}_{\text{заг}}$  та Si) були визначені значущими для формування таксономічної структури угруповання (табл. 3.1). Залежності між факторами навколишнього середовища та загальною функціональною

структурою були менш очевидними, однак достовірний вплив глибини, концентрації кисню, сірководню та нутрієнтів було показано для функціональних компонентів метаболізму сполук сульфуру та азоту та фотосинтезу (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Вплив факторів навколишнього середовища на диференціацію  
таксономічної та функціональної структури угруповань  
бактеріопланктону Чорного моря (\* $p < 0,05$ )**

Фактор	Таксономія, клас	Таксономія, родина	Загальні функції	Специфічні функції
Географічна відстань	0,0065	0,19	0,11	0,01
Глибина	0,66*	0,66*	0,14*	0,48*
O <sub>2</sub>	0,5*	0,54*	0,16*	0,41*
H <sub>2</sub> S	0,23*	0,22*	0,55*	0,54*
PO <sub>4</sub>	0,29*	0,3*	0,06	0,25*
NO <sub>3</sub>	0,0023*	0,19*	-0,02	-0,09
P <sub>заг</sub>	0,4*	0,41*	0,007	0,083
N <sub>заг</sub>	0,13*	0,11*	0,05	0,38*
Si	0,41*	0,44*	0,11*	0,22*

Відсутність статистично достовірної кореляції матриці географічних відстаней з таксономічною та функціональною структурою досліджуваного угруповання мікроорганізмів свідчить про провідну роль факторів середовища у формуванні угруповань бактеріопланктону Чорного моря. Розподіл факторів навколишнього середовища, в свою чергу, формуються під впливом потужної вертикальної стратифікації водного стовпа.

### 3.2 Роль угруповань мікроорганізмів у процесі трансформації ксенобіотиків в екосистемі Чорного моря

Прокаріоти мають високу метаболічну пластичність і, відповідно, здатні адаптуватись до несприятливих умов навколишнього середовища, включно із високою концентрацією стійких органічних забруднюючих речовин. Здатність бактерій до розкладу ксенобіотиків безпосередньо впливає на темпи акумуляції цих речовин у навколишньому середовищі, запобігаючи їх накопиченню у харчових ланцюгах (C. Muangchinda et al 2014; P. Isaac et al., 2015; Q. Liu et al 2015, R.Duran et al, 2016). Тому, активність мікроорганізмів щодо розкладу забруднюючих речовин може вважатися індикатором ремедіації морського середовища і є важливою з точки зору комплексної оцінки його екологічного стану.

У даному дослідженні було проаналізовано поширеність та активність бактеріальних генів, що кодують ферменти-каталізатори трансформації ксенобіотиків:

1) група генів *rhD* – диоксигенази, які відповідають за гідроксилювання поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ: антрацену, пірену, бензапірену, флуорену, кризену та ін.)

2) група генів *NaH* - системи нафталендіоксигенази, що каталізує окиснення ПАВ і є одним з найпоширеніших ферментів, що відповідають за розклад ксенобіотиків

3) група генів *Bph* - 2,3-діоксигеназа – основний фермент верхнього шляху розкладу біфенілу

4) гени груп *LinA* та *LinB* кодують гексахлоргександегідрхлореназу та галідогідролазу, що є ключовими ферментами у процесі розкладу галогеновмісних сполук.



### 3.2.1 Таксономічний склад угруповань прокаріотів, які було досліджено на предмет участі у процесі розкладу ксенобіотиків

Таксономічний склад угруповань мікроорганізмів було проаналізовано на рівні класу та родини.

Згідно отриманих нами даних, в межах поверхневих вод та максимуму хлорофілу а найпоширенішими були представники *Synechococcophycidae* (6,1 – 46,4 %), *Flavobacteria* (5,8– 20,9%), *Actinobacteria* (3,0 – 26,2%), *Alphaproteobacteria* (7,6 – 25,2%), *γ-proteobacteria* (3,0– 12,9%), *Bacilli* (0,1 – 27,5%) та *Acidimicrobia* (2,4–25,1%) (Рис. 3.9). *Verrucomicrobiae* (0,4 – 8,8%), *Betaproteobacteria* (0,4 – 2,0%), *Plancomycetia* (0,4 –13,3%) були менш чисельними, однак зустрічались у всіх без винятку зразках. Представників *Sphingobacteria* (0,03 – 3,7%) та *Rhodotermi* (0,2 – 5,8%) було виявлено винятково в поверхневих водах.

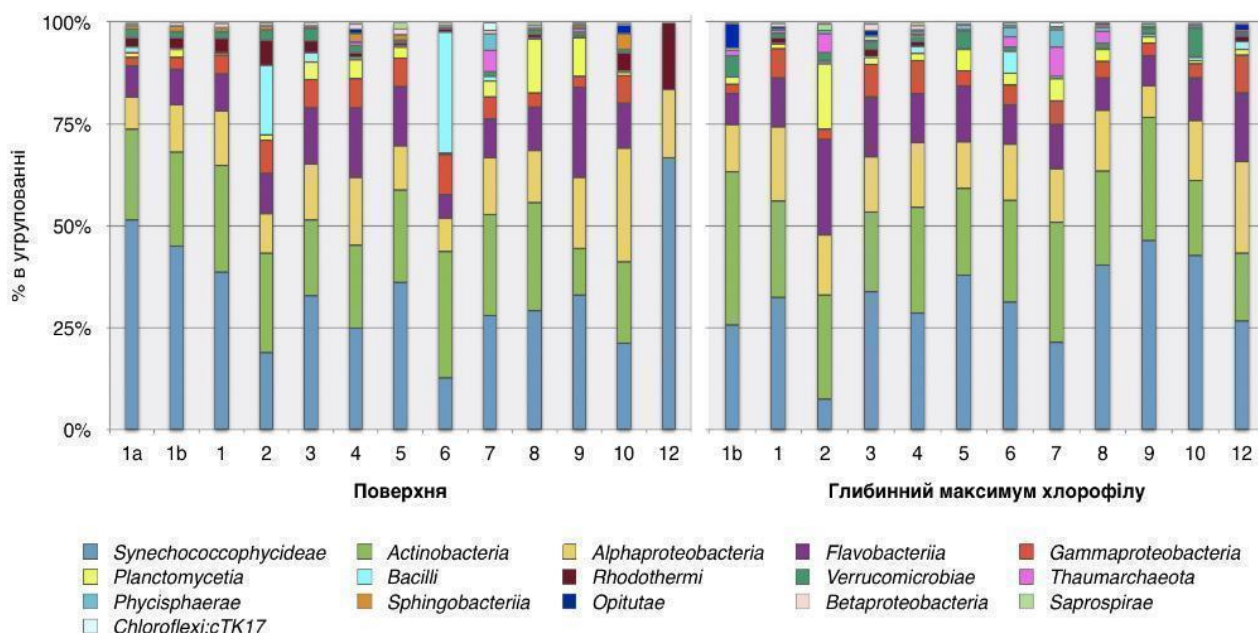


Рисунок 3.9 Таксономічний склад угруповань мікроорганізмів водної товщі Чорного моря на рівні класу

В межах класів *Synechocophycideae*, *Rhodotermi*, *Bacilli*, *Betaproteobacteria*, *Sphingobacteria* та *Verrucomicrobiae* нами було виявлено по одній родині, відповідно: *Synechococcaceae*, *Balneolaceae* (роди *Balneola* та *KSA1*), *Bacillaceae*, *Methylophilaceae*, *NS11-12*, *Verrucomicrobiaceae* (під *Verrucomicrobium*). *Planctomycetia* були представлені двома родинами *Planctomycetaceae* та *Pirellulaceae* (Табл. 3.2).

Таблиця 3.2

**Найпоширеніші родини мікроорганізмів водної товщі Чорного моря**

Клас	Родина	Відносна поширеність, %	Стандартне відхилення
<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	1,8	0,4
	<i>Micrococcaceae</i>	0,5	0,4
	<i>Unassigned</i>	5,1	1,7
<i>Acidimicrobia</i>	<i>OCS155</i>	11,1	1,2
	<i>C111</i>	2,4	0,01
	<i>ZA3409c</i>	0,3	0,1
	<i>SC3-41</i>	0,4	0,2
<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	8,2	1,1
	<i>Cryomorphaceae</i>	0,8	0,4
	<i>NS9</i>	0,8	0,5
	<i>Cryomorphaceae</i>	0,3	0,1
<i><math>\alpha</math>-proteobacteria</i>	<i>Pelagibacteraceae</i>	7,6	1,4
	<i>Rhodobacteraceae</i>	2,9	0,2
	<i>Rhodospirillaceae</i>	0,4	0,2
	<i>Unassigned</i>	2,9	0,1
	<i>Halomonadaceae</i>	3,1	0,6
<i><math>\gamma</math>-proteobacteria</i>	<i>OM60</i>	0,3	0,1
	<i>HTCC2089</i>	0,3	0,1
	<i>Piscirickettsiaceae</i>	0,3	0,1

Було показано, що мікробні угруповання донних осадів характеризуються більшим таксономічним різноманіттям. Найпоширенішими були представники *Deltaproteobacteria* (13,3 – 20,1%), до яких належить більшість відомих сульфат- (*Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus* тощо) та сульфурредукуючих (*Desulfuromonas* spp.) бактерій, а також інші бактерії із фізіологією різного типу (наприклад *Geobacter*, що здатні до відновлення заліза). Згідно отриманих даних, наступними за поширеністю були представники *Gammaproteobacteria* (6,0 – 13,6%), *Flavobacteriia* (1,3 – 15,9%), *Anaerolineae* (1,6 – 8,7%) та *Dehalococcoidetes* (0,3–5,6%). Крім того, у донних осадах було ідентифіковано 24 класи прокаріот, серед яких *Bacteroidia*, *Nitrospira*, *Phycisphaerae*, *Alphaproteobacteria*, *Spirochaetes* та *Verruco-5*, що зустрічалися у всіх зразках і становили до 5%. Частка решти класів не перевищувала 3% (Рис. 3.10).

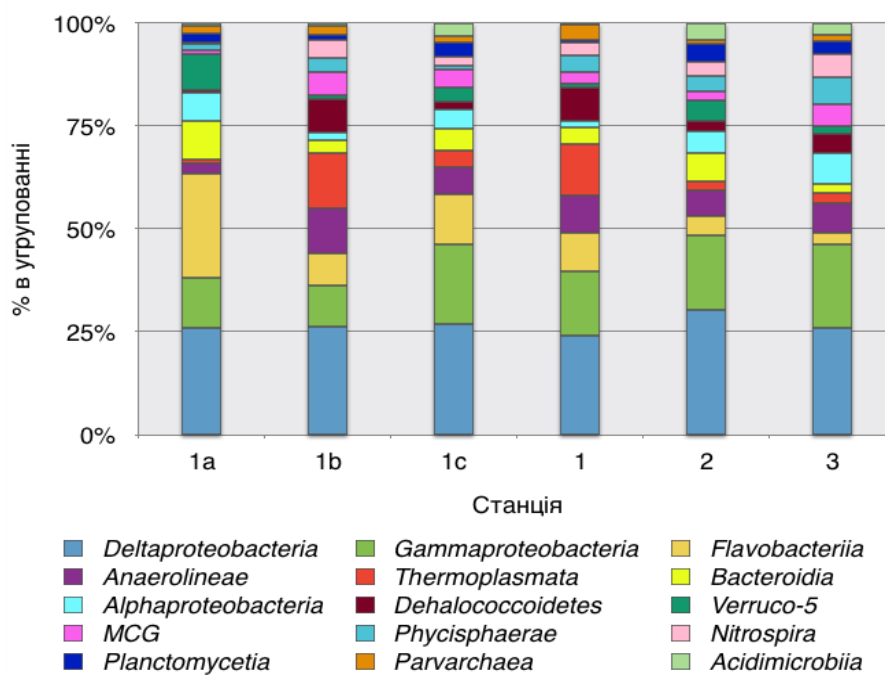


Рисунок 3.10 Таксономічний склад угруповань мікроорганізмів донних осадів Чорного моря на рівні класу (розташування станцій наведено на Рисунок 2.2)

У зразках донних осадів *Deltaproteobacteria* були представлені родинami: *Desulfobacteraceae*, *Syntrophobacteraceae*, *Desulfobulbaceae* та *Desulphuromonadaceae* (Рис. 3.10). В межах *Gamma proteobacteria* було виявлено представників родин *Piscirickettsiaceae* and *Marinicellaceae*. *Flavobacteriia* були представлені родиною *Flavobacteriaceae*, *Dehalococcoidetes* - *Dehalococcoidaceae*, *Planctomycetia* - *Pirellulaceae*, *Ignavibacteria* - *Ignavibacteriaceae*, а *Nitrospira* - *Thermodesulfovibrionaceae*. 23% Операційних таксономічних одиниць залишилось неідентифікованими.

Згідно даних проекту ПРООН ЕМБЛАС у 2017 у водах Чорного моря було виявлено високу концентрацію ксенобіотиків: поліхлорбіфенілів (ПХБ), хлорорганічних сполук (ГХЦГ) та ПАВ (хризену, флуорантену, фенафтилену, фенантреноу). Тому нами було зосереджено увагу на аналізі поширеності мікроорганізмів із попередньо експериментально показаною здатністю до розкладу зазначених забруднюючих речовин.

Експериментально здатність до розкладу органічних забруднюючих речовин, таких як ПАВ, була показана неодноразово для представників *Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp., *Micrococcus* spp (H. Habe and T. Omori, 2003; P. Isaac et al., 2015; Obinna C. Nwinyi et al, 2016; Ma J et al, 2012). Водночас, набагато більше мікроорганізмів мають потенційну здатність до трансформації ксенобіотиків, проте їх специфічні вимоги до умов середовища не дають можливість дослідити цей процес в умовах культурального експерименту. Так, бактерії роду *Cycloclasticus* (*Piscirickettsiaceae*,  $\gamma$ -*proteobacteria*) вважаються найпоширенішими прокаріотами, що здатні до розкладу ПАВ (нафталену, фенантреноу, антрацену, пірену та флуорену) у морській воді та донних осадах (Cui et al., 2008; Wang et al., 2008).

Більшість бактерій із потенціалом до розкладу ПАВ належать до *Alphaproteobacteria* (Kim & Kwon 2008), *Gamma proteobacteria* (Dong et al. 2015), *Actinobacteria* (Dong et al. 2015), *Acidobacteria* (Song et al. 2016) та *Bacillus* (Dong et al. 2015). Згідно отриманих даних представники цих класів складають значну частку мікробних угруповань як у воді, так і в донних осадах Чорного моря (Рис.

3.9, 3.10). В угрупованні мікроорганізмів водної товщі переважали представники *Actinobacteria*, *Acidimicrobia* та  $\alpha$ -*proteobacteria*, а в донних осадах домінували  $\gamma$ -*proteobacteria* та *Bacterioides*. Також згідно отриманих даних у досліджуваному угрупованні мікроорганізмів було виявлено родини, для представників яких попередньо було експериментально показано здатність до розкладу поліароматичних сполук. Дані таксони наведено у Таблиці 3.3 і виділено блакитним (присутність у водній товщі) та зеленим (присутність у донних осадах).

Таблиця 3.3

**Мікробні таксони, що мають експериментально показану здатність до біотрансформації поліароматичних вуглеводнів**

Клас	Порядок	Родина	Рід
<i><math>\alpha</math>-proteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacter</i> , <i>Citricella</i> , <i>Roseovarius</i> , <i>Salipiger</i> , <i>Stappia</i>
	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Tistrella</i> , <i>Thalassospira</i>
<i><math>\gamma</math>-proteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Colwelliaceae</i>	<i>Colwellia</i>
		<i>Shewanellaceae</i>	<i>Shewanella</i>
		<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>
		<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Marinobacter</i>
		<i>Idiomarinaceae</i>	<i>Idiomarinaceae</i> , <i>Pseudidiomarina</i>
	<i>Thiotrichales</i>	<i>Piscirickettsiaceae</i>	<i>Cycloclasticus</i>
	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Halomonadaceae</i>	<i>Halomonas</i>
		<i>Oceanospirillaceae</i>	<i>Marinomonas</i>
		<i>Alcanivoracaceae</i>	<i>Alcanivorax</i>
<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteriales</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Dietzia</i>
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriales</i>	<i>Acidobacteriaceae</i>	

Крім таксонів, здатних до розкладу ПАВ, у досліджуваному мікробному угрупованні нами було виявлено мікроорганізми із потенціалом до біотрансформації хлорорганічних сполук таких, як хлорбензоат, хлорфенол, гексахлоргексан, фенілацетат та пентахлорфенол - *Rhodobacteraceae* (Loredana et al. 2017), *Desulfuromonadaceae*, *Desulfobacteraceae* (Boyle et al. 1999), *Syntrophaceae*, *Peptococcaceae* (Holliger et al. 1998), *Dehalococcoideaceae* (Seshadri et al. 2005), *Micrococcaceae* (Abramowitch, 1990). Згідно отриманих даних поширеність бактерій із потенціалом до розкладу хлорорганічних сполук була вищою у донних осадах (позначено коричневим) порівняно із водною товщею (позначено блакитним) (табл. 3.4). Це узгоджується із відомостями щодо переважання анаеробних метаболічних процесів у біотрансформації хлорорганічних сполук (орто-, мета- та пара-дехлорування, відновне дехлорування та анаеробне дихання), що в основному відбуваються у донних осадах (Bunge et al. 2003, Seshadri et al. 2005).

Таблиця 3.4

**Мікробні таксони, що мають експериментально показану здатність до біотрансформації хлорорганічних сполук**

Клас	Порядок	Родина	Рід
<i>a-proteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Mameliella phaeodactyli</i>
			<i>Pseudovibrioascidiacei-cola</i>
			<i>Ruegeria atlantica</i>
<i>D-proteobacteria</i>	<i>Desulfuromonadales</i>	<i>Desulfuromonadaceae</i>	<i>Desulfuromonas chloroethenica</i>
	<i>Desulfobacterales</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfococcus multivorans</i> ATCC 33890
	<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Centrophyceae</i>	<i>Desulfomonile tiedjei</i>
<i>ε-proteobacteria</i>			<i>Dehalospirillum multivorans</i>

Продовження Таблиці 3.4

Клас	Порядок	Родина	Рід
<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Peptococcaceae</i>	<i>Dehalobacter restrictus</i>
			<i>Clostridium spp.</i>
<i>Dehalococcoidia</i>	<i>Dehalococcoidiales</i>	<i>Dehalococcoideaceae</i>	<i>Dehalococcoides ethenogenes strain</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter</i>

Отже, аналіз таксономічного складу мікробних угруповань водної товщі та донних осади́в Чорного моря свідчить про потенційну здатність мікроорганізмів до біотрансформації ксенобіотиків. Однак визначення реального функціонального потенціалу даних угруповань потребує дослідження реалізації конкретних молекулярних механізмів, залучених у процесі розкладу забруднюючих речовин.

### 3.2.2 Потенційна активність мікробних угруповань Чорного моря щодо розкладу ксенобіотиків

З метою оцінки катаболічного потенціалу мікробних угруповань Чорного моря, нами було проведено аналіз копійності генів, що кодують різні етапи аеробного розкладу ПАВ, ПХБ та гексахлоргексан. Копійність функціональних генів є стандартним індикатором потенційної здатності мікроорганізмів до розкладу ксенобіотиків. Крім того, даний показник використовується в оцінці та прогнозуванні успіху біоремедіації (Shahsavari et al. 2016).

Так, ген *ephA1*, було використано, як індикатор катаболізму біфенілу та ПХБ (Baldwin et al. 2003). Для біотрансформації ПАВ ключовими є  $\alpha$ -субодиниці кільцево-гідроксилувальної діоксигенази (RHD) (Cébron et al.

2008, Shahsuvar et al. 2016), які кодуються геном *PAH-RHD $\alpha$* . Грамнегативні та грампозитивні бактерії характеризуються різними алелями генів *PAH-RHD $\alpha$* , тому у даному дослідженні було застосовано окремі набори праймерів для цих двох груп (Sebron et. al. 2008). *PAH-RHD $\alpha$ -P* праймери є достатньо універсальними і охоплюють наступні гени грампозитивних бактерій: *narAa*, *nidA3/fadA1*, *phdA/pdoA2* та *nidA/pdoA1*. Водночас, гени, присутні у грамнегативних бактерій, здатних до деструкції ПАВ - *nahAc*, *nahA3*, *nagAc*, *ndoB*, *ndoC2*, *pahAc*, *pahA3*, *phnAc*, *phnA1*, *dntAc* та *arhA1* - охоплені *PAH-RHD $\alpha$ -N* праймерами (Sebron et al. 2008). Оскільки нафтален був одним із найпоширеніших та пріоритетних ксенобіотиків у водах Чорного моря у 2016 році (Slobodnik et al. 2016), ген нафтален-діоксигенази було проаналізовано окремо від решти *PAH-RHD $\alpha$* . Аналіз мікробного катаболізму ізомерів ГХЦГ у зразках води та донних осадах було проведено шляхом оцінки поширеності та активності дегідрохлорінази та галідогідролази, які кодуються генами *linA* та *linB*, відповідно (Lal et al. 2013).

Згідно отриманих нами даних, копійність функціональних генів, що кодують процеси біотрансформації ксенобіотиків, була високою, як у водній товщі, так і в донних осадах (Рис. 3.11).

Було показано, що найвищим за кількістю виявлених копій був ген *bphA1* - в середньому  $1.4 \times 10^5$  копій/мл у зразках з водної товщі та  $1.4 \times 10^6 \pm 3.3 \times 10^5$  копій/мг у донних осадах. Другим за поширеністю був ген *linB*, копійність якого коливалась в межах від  $6.2 \times 10^3$  до  $2.6 \times 10^4$  копій/мл у воді і становила в середньому  $1.2 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^4$  копій/мг у донних осадах. Водночас, кількість копій гену *linA*, що кодує перший етап дегалогенізації ізомерів ГХЦГ, була значно нижчою у порівнянні із *linB* (Рис. 3.11).



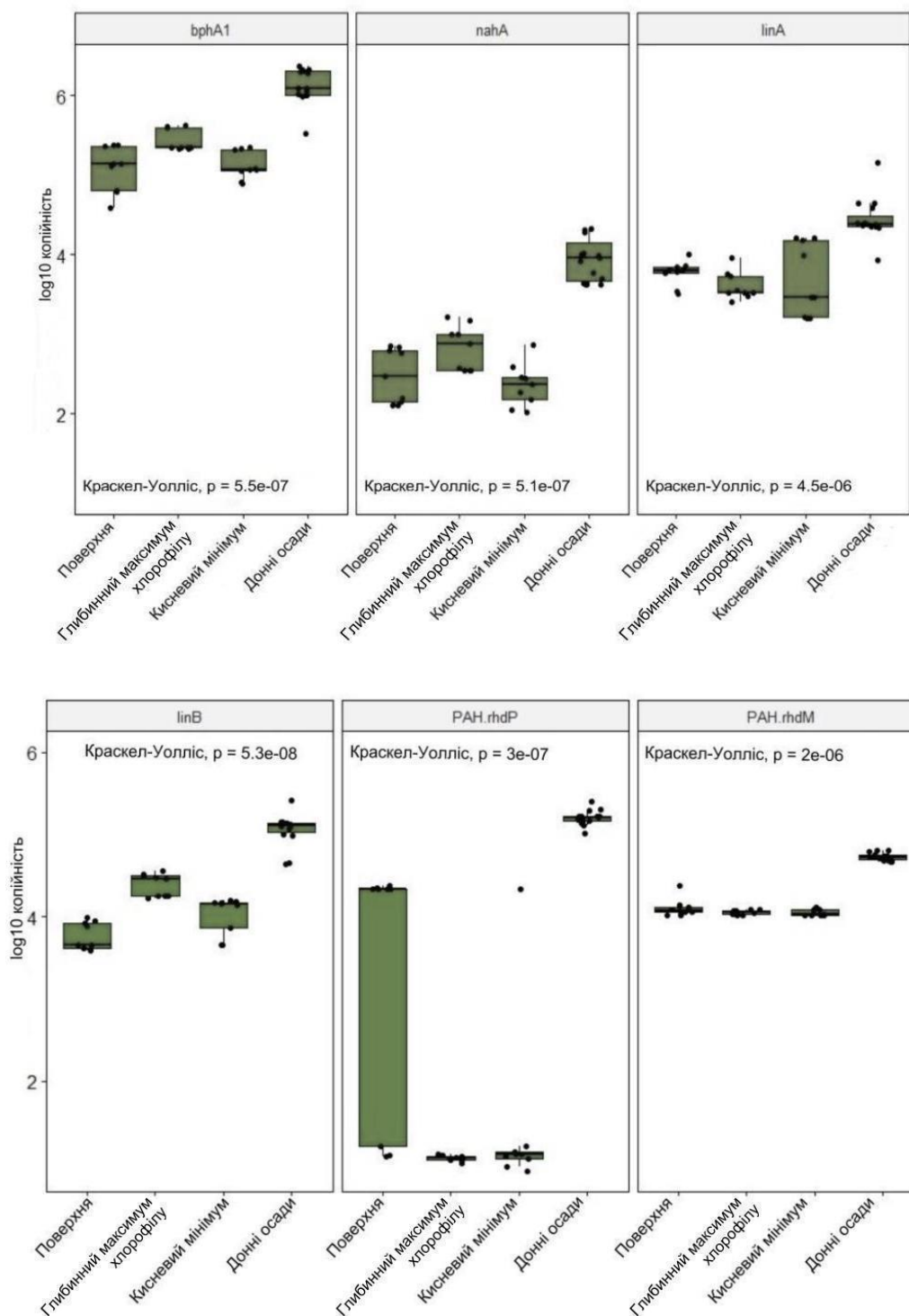


Рисунок 3.11 Копійність досліджуваних генів (log<sub>10</sub>) біотрансформації ксенобіотиків у водній товщі та донних осадах Чорного моря

Було показано, що гени кільцево-гідроксилувальної діоксигенази грамнегативних (*PAH-RHD $\alpha$ -N*) та грампозитивних бактерій (*PAH-RHD $\alpha$ -P*)

мали найвищу копійність у зразках донних осадів - в середньому  $5.4 \times 10^4 \pm 3.2 \times 10^3$  та  $1.6 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^4$  копій/мг відповідно. У зразках морської води копійність генів PAH-RHD $\alpha$ -N була нижчою, ніж в донних осадах і становила в середньому  $1.2 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^3$  копій/мл. Копійність генів PAH-RHD $\alpha$ -P була найнижчою в зоні глибинного максимуму хлорофілу, на відміну від інших досліджуваних генів, і складала  $1.2 \times 10^1 \pm 6.6 \times 10^{-1}$  копій/мл. Варто відмітити, що в цілому найнижчими показниками копійності характеризувався ген *nahAc* - від  $2.7 \times 10^2 \pm 1.5 \times 10^2$  в зоні кисневого мінімуму до  $1.0 \times 10^4 \pm 3.7 \times 10^3$  у зразках донних осадів (Рис. 3.11).

За результатами неметричного багатовимірного шкалювання на основі матриці Брей-Кертис кількісні дані копійності генів розкладу ксенобіотиків розподілились на 2 кластери (Рис. 3.12). До першого кластеру належали зразки донних осадів, а зразки морської води з глибинного максимуму хлорофілу та із зони кисневого мінімуму утворили другий кластер. Зразки з поверхні були присутні в обох кластерах, що свідчить про динамічний вплив середовища на мікробне угруповання цієї зони.

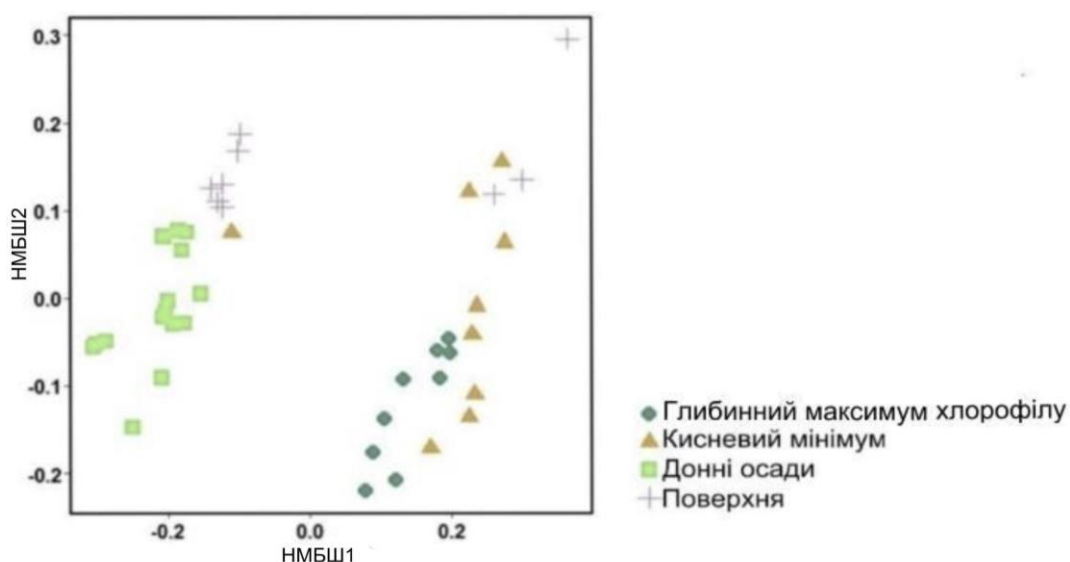


Рисунок 3.12 Результати неметричного багатовимірного шкалювання на основі матриці Брей-Кертис для копійності досліджуваних катаболічних генів

Аналіз Краскела-Воліса та порівняльний тест Вілкоксона підтвердили присутність статистично значущої різниці у копійності генів у воді та донних осадах Чорного моря. Аналогічно, копійність досліджуваних генів достовірно відрізнялась в межах різних шарів водної товщі, які заселені таксономічно та функціонально різними мікробними угрупованнями (Pavlovska et al. 2021). Так, за критерієм Краскела-Уолліса було виявлено статистично значущі відмінності між копійністю генів *bphA1* ( $p = 0,0066$ ), *nahAc* ( $p = 0,011$ ), *linB* ( $p = 4,1 \times 10^{-5}$ ) та *PAH-RDH $\alpha$ -P* ( $p = 0,0033$ ) на поверхні, в зонах глибинного максимуму хлорофілу та кисневого мінімуму. Гени *PAH-RDH $\alpha$ -N* та *linA* були однаково поширені в межах водного стовпа.

Копійність *nahAc* та *bphA1* була найвищою у донних осадах та в зоні глибинного максимуму хлорофілу і найнижчою у зоні кисневого мінімуму, що ймовірно пов'язано із кількісною різницею поширеності мікроорганізмів, яку ілюструє копійність 16S рРНК (Рис. 3.13). Кількість копій 16S рРНК була найвищою у зразках донних осадів та глибинного максимуму хлорофілу і найнижчою в зоні кисневого мінімуму, а копійність *nahAc* та *bphA1* позитивно корелювала із копійністю 16S рРНК ( $\rho = 0,59$ ,  $p = 0,0009$  та  $\rho = 0,55$ ,  $p = 0,002$ , відповідно) (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

**Кореляція Спірмена між копійністю 16S рРНК  
та копійністю функціональних генів біотрансформації ксенобіотиків**

Ген	Функціональний ген	$\rho^*$	$p$
16S рРНК	<i>linB</i>	0,69	4,13e-05
16S рРНК	<i>nahAc</i>	0,59	0,00087
16S рРНК	<i>bphA1</i>	0,55	0,00203
16S рРНК	<i>PAH-RDH<math>\alpha</math>-M</i>	0,49	0,00783
16S рРНК	<i>linA</i>	0,37	0,05033
16S рРНК	<i>PAH-RDH<math>\alpha</math>-P</i>	0,35	0,06372

\*коефіцієнт кореляції Спірмена

Кількість копій генів *PAH-RDH $\alpha$ -P* була достовірно вищою в поверхневих водах, ніж в інших шарах водного стовпа. Це можна зокрема пояснити найвищим різноманіттям мікробних угруповань на поверхні (Pavlovska et al., 2021), що зумовлює вищу ймовірність одночасної присутності різних алелей генів *PAH-RDH $\alpha$ -P*, які охоплює застосований набір праймерів.

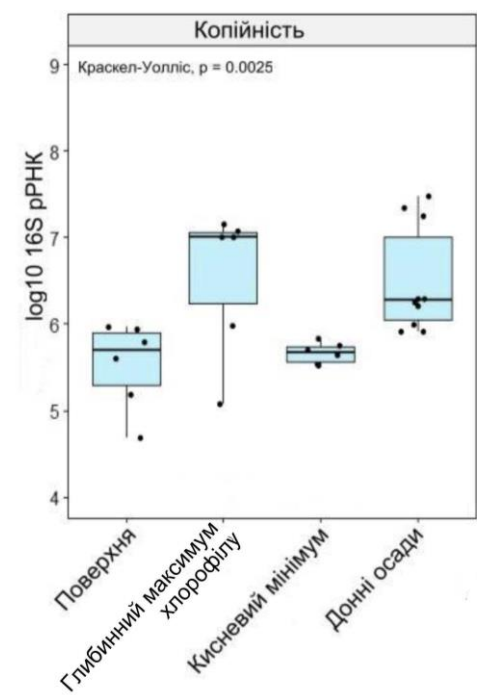


Рисунок 3.13 Копійність 16S рРНК (log10) у водній товщі та донних осадах Чорного моря

Статистично значущих відмінностей у копійності гену *linA* в різних зонах виявлено не було. Водночас кількість копій *linB* демонструвала позитивну кореляцію із 16S рРНК, а тому імовірно залежить від кількості клітин прокаріот в різних зонах водного стовпа та в донних осадах. Крім того, різниця у розподілі гену *linB* може бути пов'язана із меншою субстратною специфічністю в порівнянні з *linA* і високим ступенем гомологічності його фермента із іншими галоредуктазами (Kmuńček et al. 2005, Lal et al. 2010, Nagata et al. 2019).

Співвідношення кількості копій катаболічних генів та 16S рРНК було запропоновано для оцінки потенціалу мікробного угруповання до

біотрансформації певних сполук (Cébron et al. 2008). Копійність, як генів розкладу ксенобіотиків так і 16S рРНК є вищою у донних осадах, ніж у водній товщі (Рис. 3.11, Рис. 3.12). Тому, використання даного індекса співвідношення дозволяє уникнути переоцінки потенціалу мікробних угруповань донних осадів щодо розкладу забруднюючих речовин.

Найвищий індекс співвідношення генів розкладу ксенобіотиків до копійності 16S рРНК було отримано для зразків донних осадів (Табл. 3.6). Співвідношення *bphA1*/16S рРНК було найвищим у поверхневих водах, глибинному максимумі хлорофіла та в зоні кисневого мінімуму. У цілому, даний аналіз показав значний потенціал мікробних угруповань Чорного моря до біотрансформації забруднюючих речовин, оскільки співвідношення всіх досліджуваних генів до 16S рРНК були високими у порівнянні з даними інших досліджень (Табл. 3.6). Так, у дослідженні Cébron et al. (Cébron et al. 2008), що було проведено у зонах значного забруднення ПАВ, отримані співвідношення *PAH-RHDα*/16S рРНК були в межах від 0,001 до 92,2%.

Таблиця 3.6

**Індекс співвідношення копійності досліджуваних генів розкладу ксенобіотиків та 16S рРНК на різних горизонтах відбору в Чорному морі**

Горизонт відбору	<i>bphA1</i> /16S рРНК	<i>nahAc</i> /16S рРНК	<i>linA</i> /16S рРНК	<i>linB</i> /16S рРНК	<i>PAH-RHDα-N</i> /16S рРНК	<i>PAH-RHDα-P</i> /16S рРНК
Донні осади	68,9±13,9	1,2±0,2	4,3±0,3	12,0±1,3	9,2±0,6	26,5±1,6
Поверхня	49,1±23,2	0,3±0,2	3,2±1,4	2,6±1,0	5,9±2,4	9,1±5,0
Глибинний максимум хлорофілу	44,4±24,3	0,1±0,07	0,6±0,3	3,6±1,9	1,9±1,1	0,00
Кисневий мінімум	46,2±16,7	0,1±0,02	2,7±1,3	3,7±1,1	3,1±0,7	0,7±0,7

### 3.2.3 Реалізована активність мікробних угруповань Чорного моря щодо розкладу ксенобіотиків

Аналіз активності генів на основі ідентифікації їх транскриптів дозволяє виявити пряму активність мікроорганізмів щодо біотрансформації ксенобіотиків на момент відбору зразків. У даному дослідженні кількість транскриптів вважається показником експресії.

Згідно отриманих нами даних рівень транскрипції досліджуваних генів був значно нижчим за показники їх копійності (Рис. 3.11). Згідно показників експресії 16S рРНК, інтенсивність метаболічних процесів є значно вищою у верхніх шарах водного стовпа і знижується в зоні кисневого мінімуму та в донних осадах (Рис. 3.14).

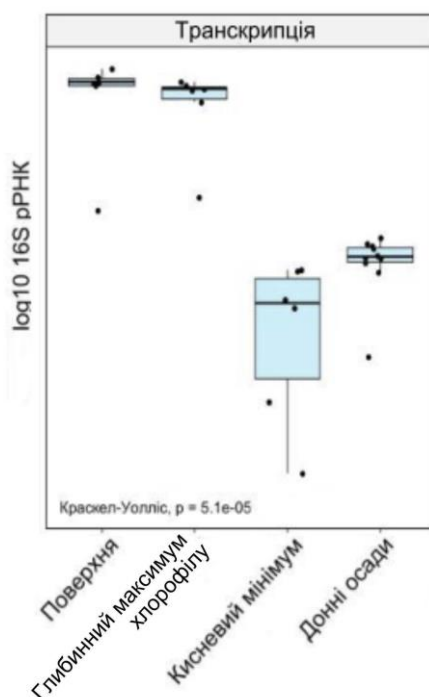


Рисунок 3.14 Рівень транскрипції 16S рРНК (log10) в водній товщі та донних осадах Чорного моря

Водночас експресія генів, що кодують ферменти розкладу ксенобіотиків, мала більш монотонний характер і не настільки суттєво відрізнялась на поверхні, в зоні глибинного максимуму хлорофілу, кисневого мінімуму та в донних осадах.

За даними неметричного багатовимірного шкалювання дані експресії досліджуваних генів не утворюють кластерів відповідно до глибини відбору (Рис. 3.15).

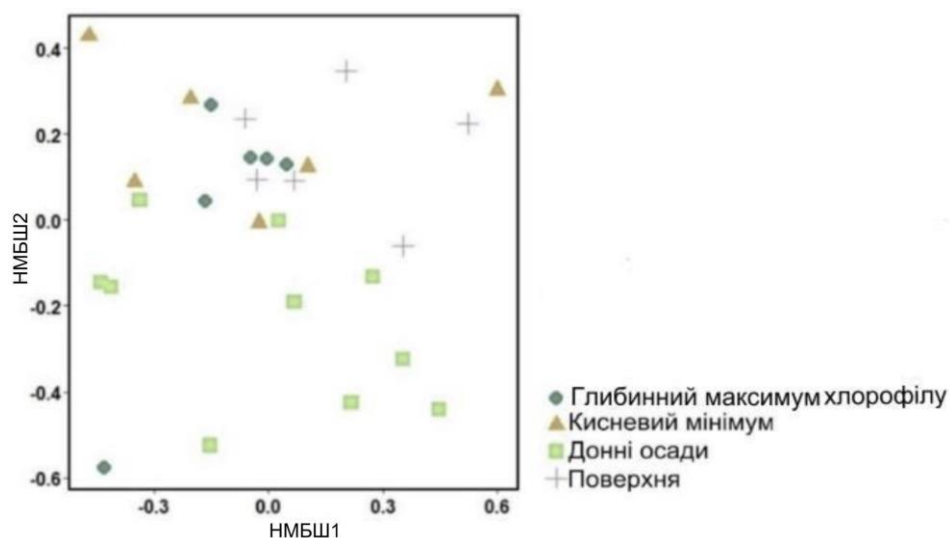


Рисунок 3.15 Результати неметричного багатовимірного шкалювання на основі матриці Брей-Кертис для транскрипції досліджуваних катаболічних генів

Згідно отриманих даних гени *linA* та *linB* характеризувались найвищими показниками транскрипції, як у зразках морської води, так і в донних осадах (Рис. 3.17). За даними культиваційних експериментів інших авторів відомо, що експресія *linA* та *linB* є постійною у культивованих мікроорганізмів, які здатні до біотрансформації ГХЦГ (Suar et al. 2004). Тому, очікуваним є високий рівень транскрипції *linA* та *linB* в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря, для яких нами була показана значна копійність цих генів. Аналогічно до копійності, було показано, що рівень експресії *linB* був вищими за *linA*, що можна зокрема пояснити меншою субстратною специфічністю його фермента. Відомо, що дегалогеназа *linB* є менш специфічною, ніж *linA* і каталізує дегалогенування не лише ГХЦГ, але й аліфатичних сполук. Крім того даний фермент специфічно діє на один з найбільш стійких ізомерів -  $\beta$ -

ГХЦГ (Nagata et al. 2005, Sharma et al. 2006), що характеризувався найвищою концентрацією у зразках води Чорного моря на момент відбору (Рис. 3.16).

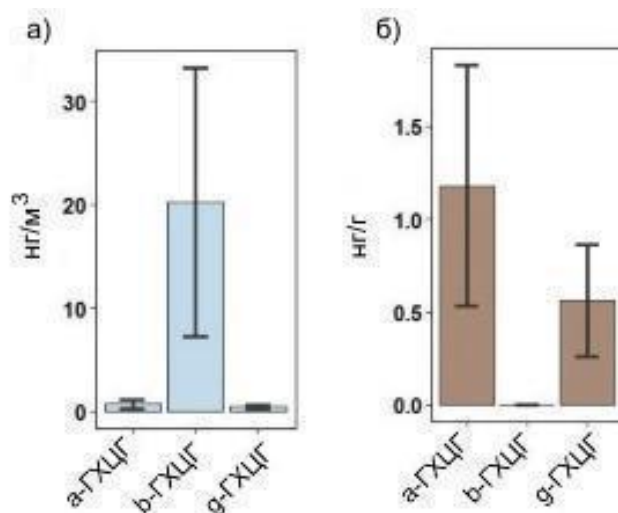


Рисунок 3.16 Концентрація ГХЦГ у поверхневих водах (а) та в донних осадах (б) Чорного моря (Prekrasna et al. 2021)

Ген *bphA1*, що мав найвищу копійність у досліджуваних мікробних угрупованнях, характеризувався низькими показниками транскрипції (Рис. 3.17). Відомо, що ферменти, які кодуються геном *bphA1*, індукуються під час біотрансформації ПХБ та біфенілу, а також за присутності менш стійких нафталену, саліцилату та хлорбіфенілу в навколишньому середовищі (Master & Mohn 2001, Lal et al. 2010). За даними хімічного аналізу зразків, здійсненого в рамках проєкту ЕМБЛАС, у воді та донних осадах Чорного моря були поширені стійкі ПХБ, що мали у своїй структурі  $\geq 4$  атомів хлору (Рис. 3.18). Тому можна припустити, що низька експресія гену *bphA1* пов'язана із відсутністю у навколишньому середовищі біфенілу.



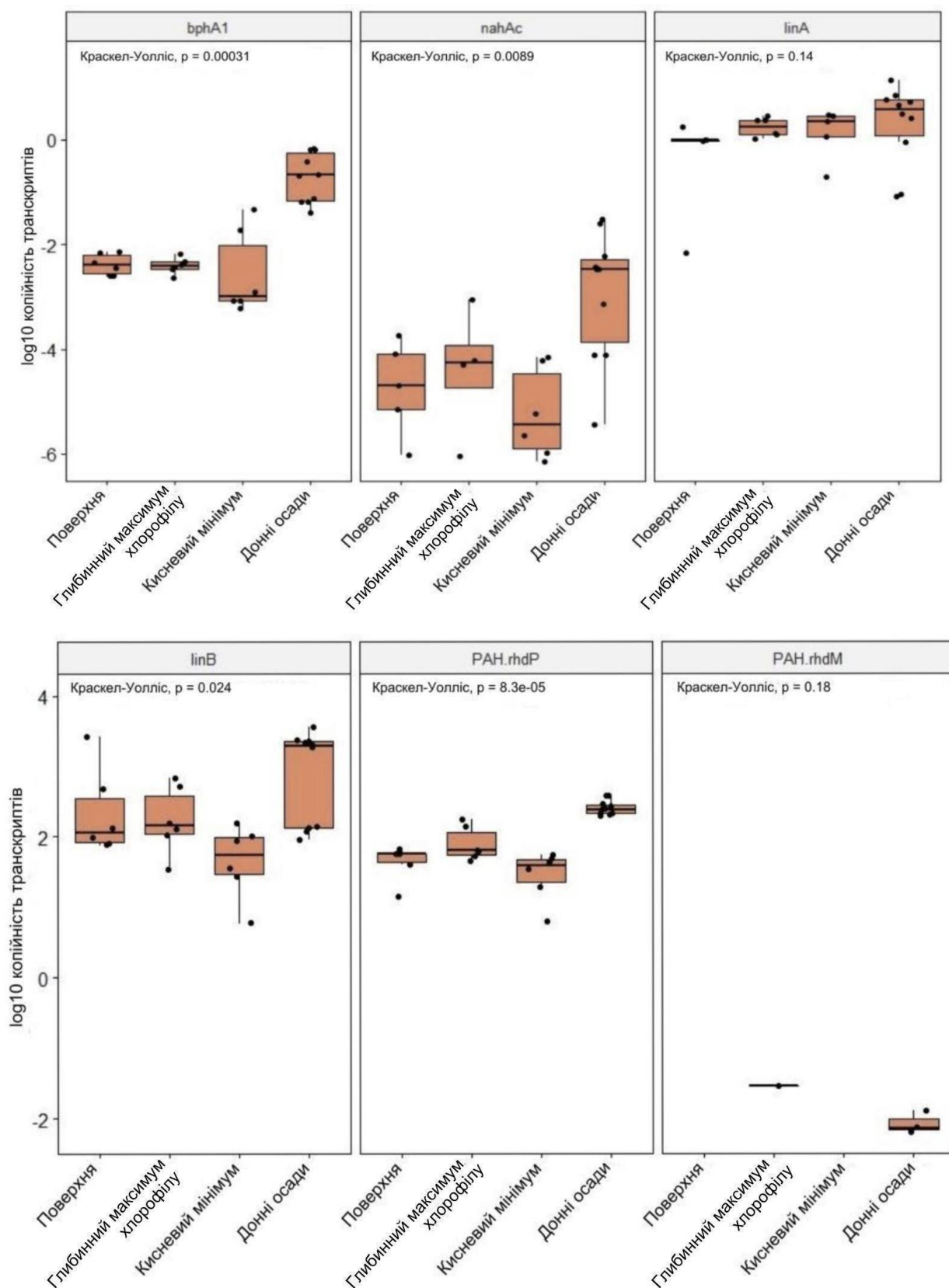


Рисунок 3.17 Експресія досліджуваних генів (log<sub>10</sub>) біотрансформації ксенобіотиків у водній товщі та донних осадах Чорного моря. nahAc:

Anova,  $p = 0,003$ ; rhd-P: Anova,  $p = 1,2e -07$

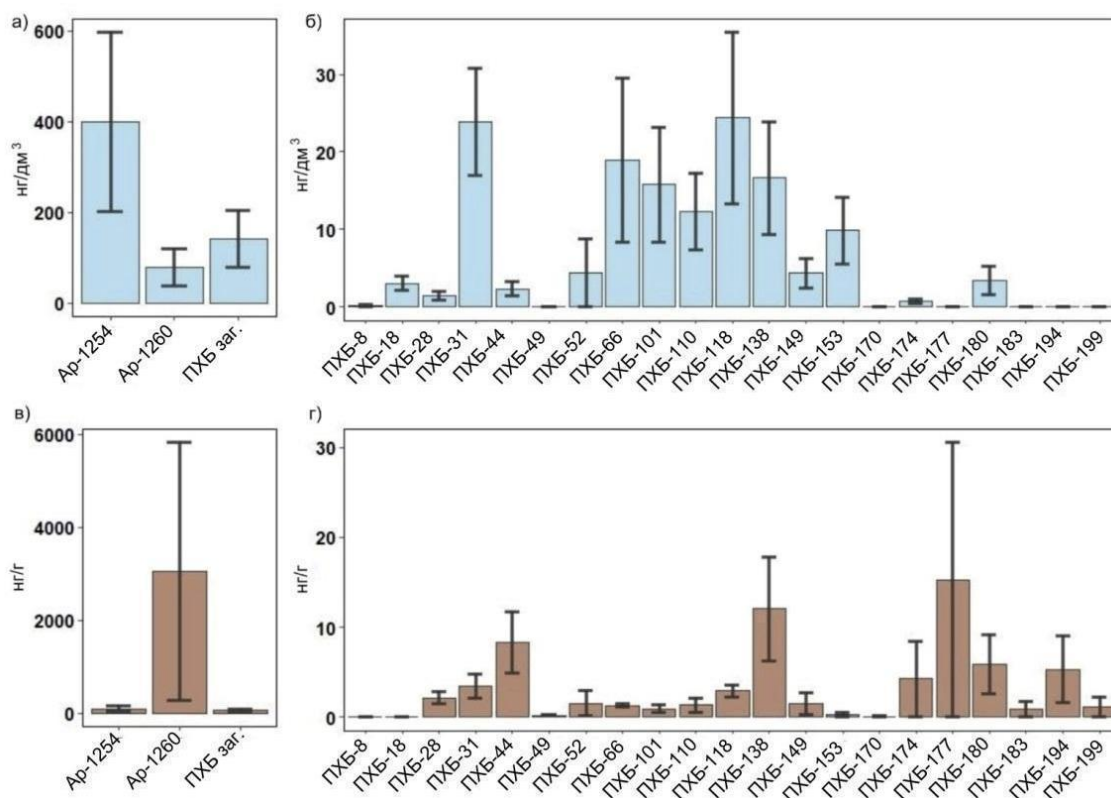


Рисунок 3.18 Концентрація ПХБ у поверхневих водах (а, б) та в донних осадах (в, г) Чорного моря (Prekrasna et al. 2021) Ар-1254 - арохлор ПХБ-16 - ПХБ-65; Ар-1260 - арохлор ПХБ-28 - ПХБ-73; ПХБ заг. - сума конгенерів ПХБ

Експресія генів *PAH-RHDα-P* спостерігалась в усіх шарах водного стовпа та в донних осадах (Рис. 3.17) і корелювала із копійністю ( $\rho = 0,76$ ,  $p = 1,9 \times 10^{-6}$ ) (табл. 3.7). Водночас транскрипція *PAH-RHDα-N* була присутня лише в деяких зразках.

Відмінності у копійності та експресії генів розкладу ПАВ граммпозитивних та грамнегативних бактерій можуть бути пов'язані з різною стратегією та спеціалізацією цих мікроорганізмів. Відомо, що граммпозитивні бактерії, здатні до розкладу ПАВ є К-стратегіями, що спеціалізуються на біотрансформації високомолекулярних стійких ПАВ таких, як флуорантен, пірен та бензопірен (Leys et al. 2005, Baldwin et al. 2003, Kim et al. 2007, Zeng et al. 2017), які превалювали у зразках морської води на момент відбору. Крім того за даними хімічного аналізу, 4-кільцеві ПАВ - бензантрацен та хризен були присутні у

високих концентраціях (Рис. 3.19). У зразках донних осадів було виявлено 4- та 5-кільцеві ПАВ, які є стійкими до розкладу та мають гідрофобні властивості, що сприяє їх акумуляції (Рис. 3.19). Таким чином, переважання високомолекулярних ПАВ може сприяти поширенню та стимулювати активність грампозитивних К-стратегів, а акумуляція цих сполук вказує на тривале забруднення акваторії Чорного моря.

Таблиця 3.7

**Показники кореляції копійності та транскрипції генів розкладу  
ксенобіотиків в мікробних угрупованнях Чорного моря**

Копійність гену	К-ть транскриптів	$\rho$	$p$
bphA1	bphA1	0.70	3.33e-05
PAH-RHD $\alpha$ -P	PAH-RHD $\alpha$ -P	0.76	1.93e-06
nahAc	nahAc	0.64	0.00025
linB	linB	0.52	0.005
PAH-RHD $\alpha$ -N	PAH-RHD $\alpha$ -MN	0.33	0.088
linA	linA	0.21	0.28

\*коефіцієнт кореляції Спірмена

Нами було виявлено низькі значення транскрипції гену *nahAc*, що є логічним з огляду на відсутність нафталену у зразках морської води та його низьку концентрацію в донних осадах у 2017 році (Рис. 3.19). Водночас варто відмітити значну невідповідність у копійності та експресії гену *nahAc*. Висока копійність може свідчити про вплив значної концентрації нафталену на мікробні угруповання у минулому, що підтверджується результатами хімічного аналізу зразків води Чорного моря 2016 року, згідно яких нафтален був домінуючим ксенобіотиком (Denga et al., 2017). Активність мікроорганізмів може вважатися одним із факторів, що сприяли зниженню концентрації нафталену протягом року.

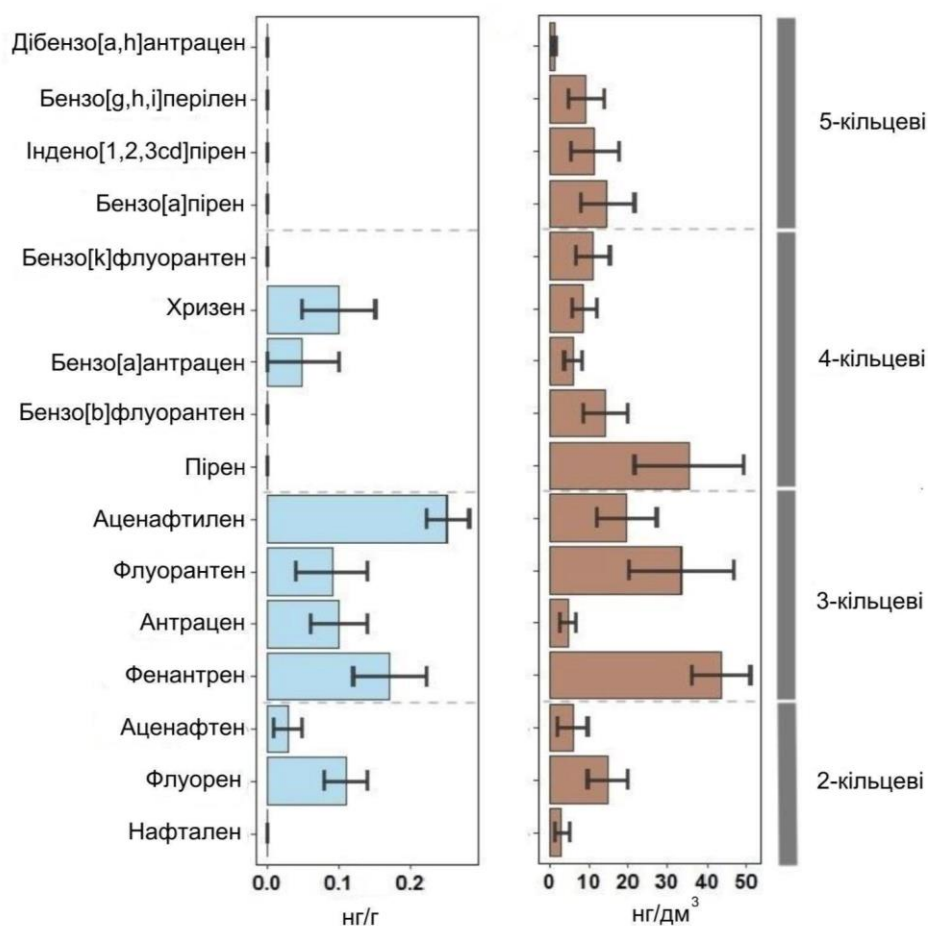


Рисунок.3.19 Концентрація ПАВ у поверхневих водах (а) та в донних осадах (б) Чорного моря (Prekrasna et al. 2021)

Слід зазначити, що набір генів, використаний у даному дослідженні не є вичерпним і не покриває всі можливі шляхи розкладу ксенобіотиків у водному середовищі. Нами було проаналізовано гени аеробних метаболічних шляхів, однак відомо, що трансформація зазначених ксенобіотиків, може відбуватись в анаеробному середовищі (Meckenstock et al. 2016). Так, розклад ПХБ може відбуватись шляхом відновного дегалогенування, а хлорароматичні сполуки можуть виступати у ролі акцептора електронів під час анаеробного дихання (Holliger et al. 1998, Boyle et al. 1999). Отже, значна частка органічних забруднюючих речовин може розкладатись анаеробно в зоні кисневого мінімуму, анаеробній сірководневій зоні, донних осадах та в розсіяній органічній речовині в Чорному морі. Детальний аналіз цих процесів вимагає проведення

метагеномного дослідження мікробних угруповань в зонах підвищеного забруднення Чорного моря.

У цілому, виявлене широке поширення та експресія генів розкладу ксенобіотиків вказує на активну участь мікробних угруповань у процесах біотрансформації забруднюючих речовин в екосистемі Чорного моря. Порівняння копійності генів, що є ілюстрацією метаболічного потенціалу мікробного угруповання із їх транскрипцією, що визначає реалізовану активність, дає змогу зробити припущення щодо функціональної відповіді мікроорганізмів Чорного моря на надходження ксенобіотиків. Отримані дані молекулярно-генетичного аналізу вказують на те, що концентрація менш стійких органічних забруднювачів, таких як біфеніл, нафтален  $\alpha$ - та  $\gamma$ -ГХЦГ знижується під впливом мікробної активності. Водночас, більш стійкі ксенобіотики - високомолекулярні ПАВ та  $\beta$ -ГХЦГ мають тенденцію до накопичення в середовищі, хоча функціональна активність мікроорганізмів спрямована на їх розклад.

### **3.3 Роль угруповань мікроорганізмів у поширенні генів антибіотикорезистентності в екосистемі Чорного моря**

Стійкість мікроорганізмів до антибіотиків визнана однією з найбільших загроз громадському здоров'ю (EClinicalMedicine 2021). Дана проблема є особливо актуальною для чорноморського регіону через гідрологічні особливості Чорного моря та через низький контроль призначення антибіотиків населенню.

Надходження антибіотиків із річковим стоком сприяє розвитку антибіотикорезистентності в угрупованнях мікроорганізмів (Griffin et al. 2020). Додатковим фактором поширення стійкості до антибіотиків є фекальне забруднення (Khan et al., 2019). Згідно дослідження Karkman et al.,

2019 присутність генів стійкості до антибіотиків може бути прямим наслідком фекального забруднення, що містить стійкі бактерії.

За даними масштабного дослідження поширення генів антибіотикорезистентності у стоках очисних споруд, що розташовані в басейні р. Дунай, було встановлено повсюдну присутність генів *aph (III)a* (стійкість до аміноглікозидів), *blaOXA*, *blaSHV* (до беталактамів), *ermB*, *ermF* (до макролідів), *sulI* (до сульфонамідів) та *tetM* (до тетрацикліну), в той час як, *mecA* (резистентність до пеніциліну), *qnrS* (до хінолонів), *tetB* (до тетрацикліну) and *vanA* (до ванкоміцину) виявляли спорадично. Водночас, даних щодо поширеності генів стійкості до антибіотиків безпосередньо у Чорному морі недостатньо (Sabatino et al. 2022).

У даній дисертаційній роботі дослідженні нами було оцінено поширення генів стійкості до антибіотиків першого вибору та останньої лінії в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря, протестовано гіпотезу щодо вищої копійності даних генів у прибережних водах порівняно з відкритим морем, а також прослідковано шляхи надходження агентів антибіотикорезистентності до морського середовища шляхом аналізу маркерів фекального забруднення та даних масштабного хімічного скринінгу. Таким чином було проаналізовано поширеність генів антибіотикорезистентності та фактори, що сприяють розвитку цього явища в акваторії Чорного моря.

### **3.3.1 Копійність генів антибіотикорезистентності в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря**

В досліджуваних угрупованнях мікроорганізмів були присутні всі гени стійкості до антибіотиків, включені до аналізу: *blaTEM*, *blaSHV*, *erm(B)*, *vanA*, *vanB* та *mcr-1* (Рис. 3.20). Абсолютні значення копійності наведено у Таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

**Абсолютні значення копійності генів антибіотикорезистентності  
в угрупованнях мікроорганізмів східного,  
північно-західного шельфу та відкритих вод Чорного моря**

Станція	Регіон	<i>bla<sub>CMY</sub></i>	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>ermB</i>	<i>mcr-1</i>
1A	ПЗЧМ	$1,1 \times 10^{6 \pm 1}$ $1,1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{6 \pm 1}$ $7,3 \times 10^4$	$3,0 \times 10^{4 \pm 1}$ $1,7 \times 10^4$	$1,6 \times 10^{6 \pm 1}$ $1,0 \times 10^5$	$9,3 \times 10^{4 \pm 1}$ $4,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^{6 \pm 1}$ $1,1 \times 10^5$
2A		$3,7 \times 10^{6 \pm 1}$ $3,4 \times 10^5$	$5,4 \times 10^{6 \pm 1}$ $2,5 \times 10^5$	$6,1 \times 10^{4 \pm 1}$ $3,5 \times 10^4$	$4,6 \times 10^{6 \pm 1}$ $5,0 \times 10^5$	$8,2 \times 10^{3 \pm 1}$ $5,8 \times 10^3$	$3,1 \times 10^{6 \pm 1}$ $2,1 \times 10^5$
2		$2,8 \times 10^{5 \pm 1}$ $7,2 \times 10^2$	$9,8 \times 10^{5 \pm 1}$ $1,2 \times 10^4$	$1,7 \times 10^{3 \pm 1}$ $9,8 \times 10^2$	$1,3 \times 10^{7 \pm 1}$ $3,8 \times 10^6$	$4,5 \times 10^{4 \pm 1}$ $2,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^{5 \pm 1}$ $7,1 \times 10^4$
3		$1,5 \times 10^{6 \pm 1}$ $3,1 \times 10^4$	$2,7 \times 10^{6 \pm 1}$ $6,4 \times 10^4$	$2,5 \times 10^{4 \pm 1}$ $1,5 \times 10^4$	$9,2 \times 10^{6 \pm 1}$ $7,3 \times 10^4$	$1,7 \times 10^{4 \pm 1}$ $7,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^{6 \pm 1}$ $5,6 \times 10^4$
4	Відкриті води	$1,2 \times 10^{5 \pm 1}$ $6,4 \times 10^3$	$5,6 \times 10^{5 \pm 1}$ $1,5 \times 10^4$	$3,5 \times 10^{3 \pm 1}$ $2,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^{5 \pm 1}$ $1,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{3 \pm 1}$ $2,1 \times 10^3$	$2,6 \times 10^{5 \pm 1}$ $3,2 \times 10^4$
5		$7,8 \times 10^{4 \pm 1}$ $3,4 \times 10^4$	$2,6 \times 10^{5 \pm 1}$ $8,1 \times 10^3$	$4,6 \times 10^{3 \pm 1}$ $1,3 \times 10^3$	$2,0 \times 10^{5 \pm 1}$ $1,1 \times 10^4$	$3,1 \times 10^{3 \pm 1}$ $1,8 \times 10^3$	$5,4 \times 10^{5 \pm 1}$ $3,3 \times 10^5$
7		$4,7 \times 10^{4 \pm 1}$ $5,7 \times 10^3$	$3,0 \times 10^{5 \pm 1}$ $2,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^{3 \pm 1}$ $2,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^{5 \pm 1}$ $9,0 \times 10^3$	$1,8 \times 10^{4 \pm 1}$ $7,6 \times 10^3$	$6,5 \times 10^{5 \pm 1}$ $2,2 \times 10^5$
8		$2,0 \times 10^{5 \pm 1}$ $5,8 \times 10^4$	$7,4 \times 10^{5 \pm 1}$ $7,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^{3 \pm 1}$ $7,3 \times 10^2$	$4,4 \times 10^{5 \pm 1}$ $4,6 \times 10^4$	$3,1 \times 10^{4 \pm 1}$ $1,5 \times 10^4$	$3,5 \times 10^{5 \pm 1}$ $3,4 \times 10^3$
9	СЧМ	$2,5 \times 10^{5 \pm 1}$ $1,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^{6 \pm 1}$ $4,9 \times 10^4$	$1,3 \times 10^{4 \pm 1}$ $7,6 \times 10^3$	$3,9 \times 10^{5 \pm 1}$ $1,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^{3 \pm 1}$ $9,8 \times 10^2$	$3,5 \times 10^{5 \pm 1}$ $1,2 \times 10^4$
10		$6,1 \times 10^{5 \pm 1}$ $1,4 \times 10^4$	$3,2 \times 10^{6 \pm 1}$ $5,4 \times 10^4$	$5,9 \times 10^{3 \pm 1}$ $3,4 \times 10^3$	$4,2 \times 10^{7 \pm 1}$ $2,4 \times 10^7$	$5,0 \times 10^{3 \pm 1}$ $2,7 \times 10^3$	$6,7 \times 10^{5 \pm 1}$ $5,3 \times 10^4$
11		$2,4 \times 10^{5 \pm 1}$ $5,1 \times 10^3$	$8,0 \times 10^{5 \pm 1}$ $7,1 \times 10^4$	$2,9 \times 10^{3 \pm 1}$ $1,7 \times 10^3$	$4,2 \times 10^{6 \pm 1}$ $1,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{3 \pm 1}$ $1,6 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{5 \pm 1}$ $3,8 \times 10^4$
12		$4,2 \times 10^{5 \pm 1}$ $2,8 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{6 \pm 1}$ $1,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{3 \pm 1}$ $1,0 \times 10^3$	$3,8 \times 10^{5 \pm 1}$ $1,1 \times 10^4$	$1,8 \times 10^{4 \pm 1}$ $2,4 \times 10^4$	$3,9 \times 10^{5 \pm 1}$ $8,1 \times 10^4$

Ген стійкості до ванкоміцину *vanB* був найпоширенішим за середніми значеннями копійності нормалізованими до кількості копій гену 16S рРНК ( $2 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-1}$  копій/мкл). Нормалізована копійність *blaSHV* та *blaCMY* становила  $4 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-2}$  копій/мкл та  $1 \times 10^{-2} \pm 3 \times 10^{-3}$  копій/мкл, відповідно. Кількість

копій гену *mcr-1*, який у даному дослідженні було вперше виявлено у водах Чорного моря, склала  $5 \times 10^{-2} \pm 3 \times 10^{-2}$  копій/мкл. Найнижча копійність була характерна для генів *ermB* ( $1 \times 10^{-3} \pm 5 \times 10^{-4}$  копій/мкл) та *vanA* ( $1 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-4}$  копій/мкл).

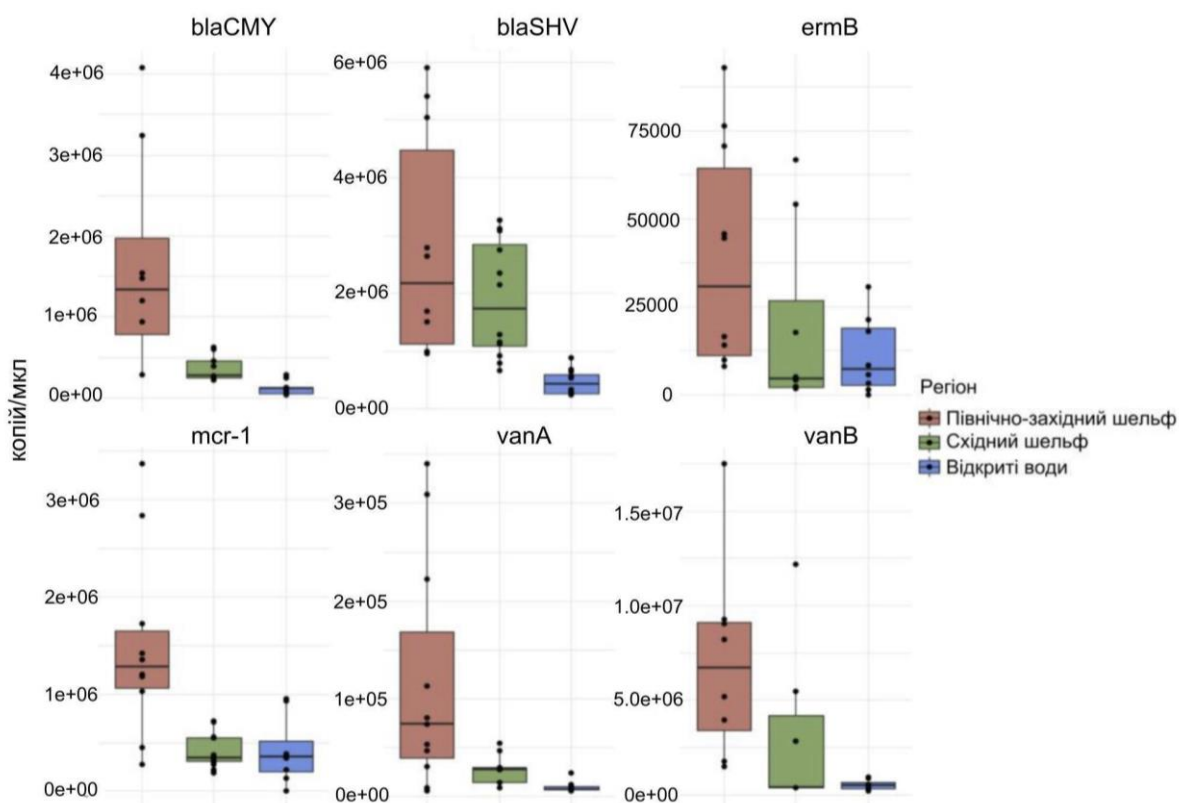


Рисунок 3.20 Регіональний розподіл генів антибіотикорезистентності (копії/мкл) в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря

Спостерігались статистично достовірні відмінності між відкритими водами та східним і північно-західним шельфом за абсолютною поширеністю генів антибіотикорезистентності в угрупованнях мікроорганізмів. Зокрема, копійність була значно вищою в межах північно-західного шельфу, і найнижчою у відкритих водах (Рис. 3.20). Так, кількість копій генів *blaCMY*, *vanA* та *mcr-1* була значно вищою в угрупованнях північно-західного шельфу порівняно з угрупованням віддалених від узбережжя вод, що було підтверджено критерієм Вілкоксона ( $p < 0,05$ , Табл. 3.9). Гени стійкості до  $\beta$ -лактамів - *blaSHV* та *blaCMY* мали достовірно вищу копійність в межах східного шельфу, ніж у відкритих водах. Водночас



кількість копій *blaCMY* та *mcr-1* достовірно відрізнялась в угрупованнях мікроорганізмів північно-західного та східного шельфу (Табл. 3.9).

Таблиця 3.9

**Оцінка диференціації угруповань мікроорганізмів східного,  
північно-західного шельфу та відкритих вод Чорного моря  
за копійністю генів антибіотикорезистентності  
(критерій Вілкоксона)**

Ген	Група порівняння		
	північно-західний шельф vs відкриті води	північно-західний шельф vs східний шельф	східний шельф vs відкриті води
<i>blaSHV</i>	$3,1 \times 10^{-6}^*$	0,38*	$5,2 \times 10^{-6}^*$
<i>blaCMY</i>	$8,2 \times 10^{-5}^*$	0,005*	0,002*
<i>vanA</i>	0,05*	0,04*	0,05*
<i>vanB</i>	0,01*	0,28	0,63
<i>mcr-1</i>	0,005*	0,002*	0,77
<i>ermB</i>	0,04*	0,07*	0,95
16S рРНК	$6,0 \times 10^{-4}^*$	0,02*	0,05*

\*достовірна різниця ( $p < 0,05$ )

Статистично достовірної різниці між досліджуваними регіонами Чорного моря за копійністю генів антибіотикорезистентності, нормалізованою за кількістю копій 16S рРНК, виявлено не було. Це пов'язано із нерівномірним розподілом гену 16S рРНК, середня копійність якого була найвищою в угрупованнях північно-західного шельфу, а найнижчою - у відкритих водах, і становила  $3 \times 10^8 \pm 6 \times 10^7$  копій/мкл та  $3 \times 10^7 \pm 8 \times 10^6$  копій/мкл, відповідно. Кількість копій 16S рРНК в мікробних угрупованнях східного шельфу складала  $1 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$  копій/мкл.

Було проведено порівняння отриманих даних щодо поширеності генів стійкості до антибіотиків у мікробних угрупованнях Чорного моря із даними комплексного аналізу 122-х метагеномних досліджень антибіотикорезистентності у річкових та озерних екосистемах (Yang et al. 2019). Згідно даних Yang et al. нормалізована до 16S рРНК копійність генів стійкості до беталактамів та аміноглікозидів складала від  $1 \times 10^{-3}$  до  $2 \times 10^{-2}$  копій/мкл. На порядок нижчою була середня кількість копій генів стійкості до поліміксину та ванкоміцину – до  $3 \times 10^{-3}$  копій/мкл. Згідно отриманих даних поширеність генів стійкості до аміноглікозидів у водах Чорного моря збігається із середніми розрахунками Yang et al. для інших екосистем. Сумарне значення копійності генів *blaSHV* та *blaCMY* в мікробних угрупованнях Чорного моря було в межах  $7 \times 10^{-3}$  –  $2 \times 10^{-1}$  копій/мкл, що перевищує загальну копійність генів стійкості до беталактамів, наведену Yang et al. (Yang et al. 2019). Отримані дані знаходяться в межах діапазону копійності генів стійкості до беталактамів (*blaOXA*), який було визначено для басейну річки Дунай -  $2.4 \times 10^{-8}$  –  $3.1 \times 10^{-2}$  копій/мкл (Alygizakis et al. 2019). У попередньому дослідженні антибіотикорезистентності у водах Чорного моря (Sabatino et al. 2020) також було встановлено присутність генів *blaCTXM* у мікробних угрупованнях, проте їх кількість не визначали.

Копійність генів *vanB* нормалізована до 16S рРНК, визначена у даному дослідженні, становила  $2 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-1}$  копій/мкл, що перевищує показники стійкості до ванкоміцину у Yang et al. (Yang et al. 2019). Згідно попередніх досліджень поширення стійкості до ванкоміцину в чорноморському регіоні, *vanB* був відсутній у викидах очисних споруд на річці Дунай, а присутність *vanA* була спорадичною (Alygizakis et al. 2019). Це свідчить, що Дунай не є основним джерелом забруднення акваторії Чорного моря генами стійкості до ванкоміцину. Водночас, перспективними є дослідження антибіотикорезистентності в угрупованнях мікроорганізмів інших великих річок басейну Чорного моря (Дніпро, Дністер та Південний Буг).

За нашими даними копійність генів стійкості до поліміксину (*mcr-1*) нормалізована до 16S рРНК становила  $2 \times 10^{-3} - 3 \times 10^{-2}$  копій/мкл, що перевищує показники визначені у дослідженні Yang et al. (Yang et al. 2019).

Копійність гену *ermB* у викидах очисних споруд на річці Дунай становила  $1,8 \times 10^{-5} - 4,9 \times 10^{-3}$  копій/мкл (Alygizakis et al. 2019), що вказує на ймовірне джерело появи стійкості до макролідів в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря. Варто відмітити, що за даними Sabatino et al. (Sabatino et al. 2020) *ermB* був відсутній у мікробних угрупованнях Чорного моря. Ймовірно, у майбутньому спостерігатиметься зростання поширеності стійкості до макролідів в Чорному морі, а отже це питання потребує моніторингу.

Достатньо високі значення копійності генів антибіотикорезистентності в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря пов'язані з недостатнім контролем за призначенням та використанням антибіотиків в країнах чорноморського басейну. Так, у період 2013 - 2018 рр. в Україні найчастіше призначали амоксицилін, цефтріаксон та цефуроксим (Yakovlieva et al. 2019). Водночас, споживання макролідів зростало у чорноморському регіоні (Matyashova et al. 2015). Даних щодо використання антибіотиків у ветеринарній медицині України недостатньо, однак наявні дослідження свідчать про присутність проблеми антибіотикорезистентності у цій галузі. Так, Shevchenko et al. 2019 було виявило присутність антибіотиків (пеніциліну, тетрацикліну, фторхінолонів) у 38,2% зразках пташиного посліду, відібраного в межах фермерських господарств України (Shevchenko et al. 2019). А зі зразків, відібраних на молочних фермах, було ізольовано *Staphylococcus aureus*, стійкі до пеніциліну (80,6% ізолятів), оксациліну (53,2%), ванкоміцину (32,3%), лінкоміцину (25,8%) та тетрацикліну (29,0%) (Berhilevych et al. 2017).

Згідно Tarcea Bizo et al. (Bizo et al. 2015) ванкоміцин є антибіотиком, який найчастіше призначали в лікарні м. Клуж-Напока, Румунія. Європейська Агенція з питань антибіотикорезистентності (EARS-NET, 2019) звітувала про виявлення стійких до беталактамів та ванкоміцину ізолятів мікроорганізмів у країнах чорноморського регіону. За даними EARS-NET у лікарнях Румунії та Болгарії

63% ізолятів *E. coli* мали резистеність до амоксициліну/ампіциліну. А, відповідно, 64,1% та 75,7% ізолятів *K. pneumoniae* були стійкими до цефтріаксону/цефтазидиму у зазначених країнах. 35,7% ізолятів *E. faecium* мали стійкість до ванкоміцину у лікарнях Румунії. Результати масштабної екологічної оцінки річки Дунай - Joint Danube Survey 3 - вказують на присутність стійких до бета-лактамів та карбапенему представників *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.* та *E. coli* у водному середовищі (Kittinger et al., 2016a; Kittinger et al., 2016b).

На жаль, дані щодо поширеності резистентності мікроорганізмів до колістину (ген *mcr-1*) не представлені у звітах EARS-NET. Однак, відомо, що колістин широко застосовується у ветеринарній медицині, а, отже, ймовірність розвитку та поширення стійкості до нього у навколишньому середовищі - є високою (Kempf et al. 2016).

За даними дисертаційного дослідження спостерігалась значна статистично достовірна диференціація за поширеністю генів антибіотикорезистентності між станціями відбору. Так, копійність генів стійкості до антибіотиків була вищою (критерій Вілкоксона,  $p < 0,05$ ) у мікробних угрупованнях північно-західного шельфу, ніж у відкритих водах Чорного моря. Гени стійкості до бета-лактамів *blaCMY* та *blaSHV* були більш поширені в межах східного шельфу, ніж у відкритих водах. Така картина відповідає попереднім даним щодо просторового розподілу копійності гену *sul1* у прибережних водах Чорного моря (Sabatino et al., 2020). Подібний ефект спостерігався і водах затоки Бохайвань Жовтого моря (Lu et al., 2019). Різниця копійності генів антибіотикорезистентності у прибережних та відкритих Чорного моря є яскравим свідченням антропогенного впливу на поширення явища стійкості до антибіотиків у досліджуваній акваторії.

Основними джерелами забруднення прибережних та естуарних вод Чорного моря генами стійкості до антибіотиків є річковий стік, очисні споруди, аквакультури та неочищені стоки (Zheng et al., 2021). В межах північно-західного узбережжя Чорного моря розташовані великі міста – Одеса (Україна) та Констанца (Румунія), а також менші поселення, сумарна популяцій яких перевищує 1,5 млн. Крім того, великі річки – Дніпро, Західний Буг, Дністер та

Дунай із загальною площею басейну 1,437,790 км<sup>2</sup>, впадають у Чорне море в північно-західному регіоні, привносячі гени антибіотикорезистентності та інші ксенобіотики у середовище. Аналогічно, східне узбережжя Чорного моря піддається впливу великих річок - Чороха та Ріоні із сумарною площею басейну – 35,500 км<sup>2</sup>. Одним із факторів вищих показників копійності генів стійкості до ванкоміцину *vanA* та поліміксину *mcr-1* в межах північно-західного шельфу, ніж в межах східного регіону є, ймовірно, більший об'єм річкового стоку та екстенсивне сільське господарство.

### **3.3.2 Поширеність маркерів фекального забруднення в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря**

З метою ідентифікації джерел фекального забруднення вод Чорного моря було проаналізовано генетичні маркери представників відділу *Bacteroidetes*, специфічних до фекальної мікробіоти людини, жуйних тварин та свиней. Анаеробні бактерії відділу *Bacteroidetes* мають специфічні генетичні адаптації до хазяїна (Dick et al. 2005) і тому ділянки їх 16S рРНК використовуються, як індикатори для ідентифікації джерела фекальної контамінації (Reischer et al. 2006; Mieszkin et al. 2009; Epa and of Science, 2019).

Генетичні послідовності представників *Bacteroidetes*, що асоційовані з людським організмом, зазвичай виявляють у людській фекальній мікробіоті та в середовищі, для якого встановлене забруднення фекаліями людини. Водночас, у дослідженні Layton et al. було ідентифіковано асоційовані з людиною *Bacteroidetes* у представників інших видів тварин. Аналогічно можлива перехресна реакція *Bacteroidetes*, специфічних до свиней та корів, через подібність дієти та особливості будови травного тракту цих тварин (Dick et al. 2005, Mieszkin et al. 2009). Однак, присутність асоційованих із людиною представників *Bacteroidetes* у не клінічних зразках зазвичай свідчить саме про забруднення навколишнього середовища фекаліями людини (Layton et al. 2013).

У даному дисертаційному дослідженні копійність генів специфічних до *Bacteroidetes* людини, становила:  $7 \times 10^3 \pm 9 \times 10^2$  копій/мкл та  $6 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$  копій/мкл у водах північно-західного та східного шельфу відповідно, та  $7 \times 10^3 \pm 1 \times 10^2$  копій/мкл у відкритих водах. Статистично достовірної різниці у кількості копій *Bacteroidetes* фекальної мікробіоти свиней у зразках води з різних регіонів Чорного моря виявлено не було (Табл. 3.10). Так, копійність 16S рРНК *Bacteroidetes* свиней становила:  $1 \times 10^2 \pm 5 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2 \pm 5 \times 10^1$ ,  $2 \times 10^2 \pm 1 \times 10^2$  копій/мкл, в районі північно-західного, східного шельфу та у відкритих водах, відповідно. Кількість копій *Bacteroidetes* жуйних тварин склала  $6 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2$ ,  $4 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2$ ,  $4 \times 10^2 \pm 4 \times 10^2$  копій/мкл у водах зазначених регіонів Чорного моря, відповідно.

Таблиця 3.10

**Оцінка диференціації угруповань мікроорганізмів східного, північно-західного шельфу та відкритих вод Чорного моря за копійністю генів-маркерів фекального забруднення (критерій Вілкоксона)**

Ген	Група порівняння		
	північно-західний шельф vs відкриті води	північно-західний шельф vs східний шельф	східний шельф vs відкриті води
<i>Bacteroidetes</i> людини	0,03*	0,11	0,003*
<i>Bacteroidetes</i> свиней	0,63	0,51	0,18
<i>Bacteroidetes</i> жуйних тварин	0,03*	0,16	0,26

\*достовірна різниця ( $p < 0,05$ )

Було встановлено статистично достовірну різницю за критерієм Вілкоксона між північно-західним шельфом та відкритими водами за кількістю копій 16S рРНК *Bacteroidetes* людини та жуйних тварин (Табл. 3.10). За допомогою тесту

Мантеля із застосуванням індексу Брея-Кертіса було виявлено помірну позитивну кореляцію між копійністю маркерів фекального забруднення та відстанню між північно-західним шельфом та відкритими водами (від станції 1А до станції 8). Кореляції не спостерігалось у випадку одночасного аналізу зразків із всіх досліджуваних регіонів - північно-західного, східного шельфу та відкритих вод (Рис. 3.21). Це вказує на те, що північно-західне узбережжя Чорного моря є основним джерелом надходження маркерів фекального забруднення до акваторії.

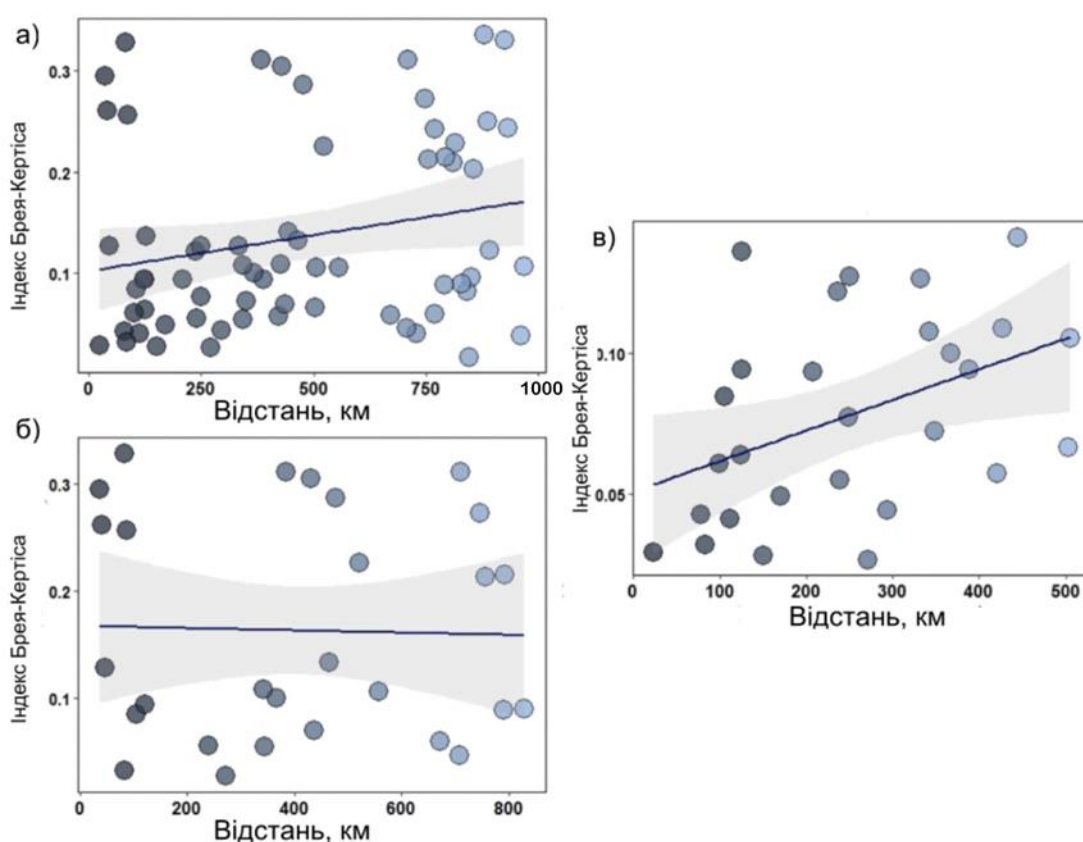


Рисунок 3.21 Залежність фекального забруднення від фізичної дистанції: а) від північно-західного до східного шельфу (від станції 1А до 12), б) від відкритих вод до східного шельфу (від станції 4 до 12), в) від північно-західного шельфу до відкритих вод (від станції 1А до станції 8)

Було встановлено присутність позитивної кореляції між копійністю *Bacteroidetes* жуйних тварин та копійністю генів стійкості до беталактамів

(*blaCMY*, *blaSHV*) та до колістину (*mcr-1*) (Рис. 3.21). Крім, того копійність гену 16S рРНК позитивно корелювала із поширеністю генів стійкості до беталактамів (*blaCMY*, *blaSHV*), ванкоміцину (*vanA*) та колістину (*mcr-1*) в мікробних угрупованнях (Рис. 3.21).

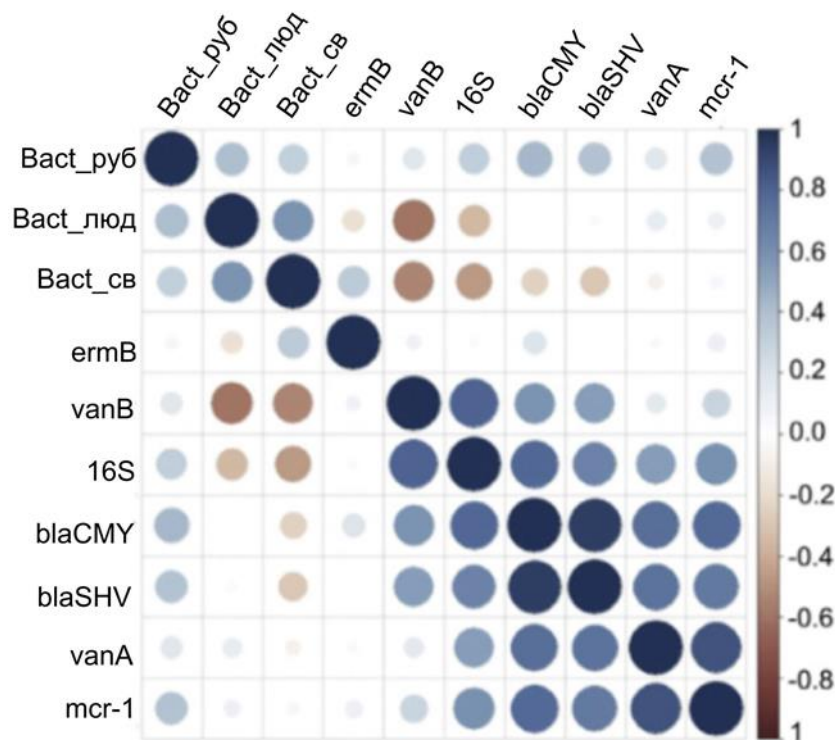


Рисунок 3.22 Кореляція Спірмена між копійністю генами антибіотикорезистентності та маркерами фекального забруднення

Відомо, що гени стійкості до антибіотиків можуть надходити до навколишнього середовища безпосередньо разом із фекальним забрудненням, оскільки мікробіота кишківника є резервуаром резистентних бактерій (Karkman et al. 2019, Khan et al. 2019). Водночас, гени антибіотикорезистентності можуть тривалий час бути присутніми у навколишньому середовищі через надходження антибіотиків та дезінфікуючих речовин, що створюють тиск добору та сприяють горизонтальній передачі даних генів (Zheng et al. 2021). За даними, отриманими в рамках масштабного хімічного скринінгу, концентрація жодного із 22 таргетних антибіотиків не перевищила ліміт детекції (1,25 нг/л) у зразках води



Чорного моря. Це виключає селективний вплив антибіотиків на розподіл генів антибіотикорезистентності у досліджуваних угрупованнях на момент відбору. Нижчі показники копійності генів стійкості до антибіотиків у відкритих водах у порівнянні із прибережною акваторією дають підстави припустити загальну тенденцію до елімінації даних ксенобіотиків із навколишнього середовища, однак дане питання потребує моніторингу.

Попередні дослідження свідчать про присутність суттєвого фекального забруднення вод в межах басейну річки Дунай через вплив сільського господарства, а також урбаністичного забруднення (Alygizakis et al. 2019). Очевидно, що Чорне море перебуває під опосередкованим впливом фекального забруднення вод Дунаю, що підтверджується вищою копійністю маркерів фекального забруднення в акваторії північно-західного шельфу. Згідно отриманих даних, копійність *blaCMY*, *blaSHV* та *mcr-1* характеризувалась помірною позитивною кореляцією із поширеністю *Bacteroidetes* жуйних тварин (Рис. 3.22), що, імовірно, свідчить про вплив бета-лактамів та колістину, які використовуються у ветеринарії, на поширеність генів стійкості до даних антибіотиків у мікробних угрупованнях Чорного моря.

Проте, фекальне забруднення навряд є основною причиною підвищеної копійності генів антибіотикорезистентності у прибережних водах Чорного моря. Іншим фактором може бути безпосереднє забруднення Чорного моря стійкими до антибіотиків бактеріями, про що свідчить сильна позитивна кореляція між копійністю генів антибіотикорезистентності та копійністю 16S рРНК. Гени стійкості до антибіотиків можуть поширюватись в угрупованнях мікроорганізмів під впливом тиску добору ще до їх надходження в акваторію Чорного моря (у водах очисних споруд, стоках тощо) із наступним надходженням до моря разом із річковими стоками.

За результатами даного дисертаційного дослідження поширення генів стійкості до широкого спектру антибіотиків (бета-лактами, макроліди, глікопептиди, колістин) у мікробних угрупованнях Чорного моря, було показано присутність антибіотикорезистентності у відкритих водах та в шельфовій зоні

акваторії. Було виявлено всі таргетні гени, а копійність генів стійкості до бета-лактамів, ванкоміцину та поліміксину була вищою, ніж у попередніх дослідженнях інших авторів (Yang et al. (2019)). Ген стійкості до колістину було виявлено вперше в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря. Копійність генів антибіотикорезистентності була вищою на шельфі, ніж у відкритих водах, що ілюструє вплив річкового стоку та екстенсивного сільського господарства на розвиток резистому. Вплив даних факторів було підтверджено статистично значущою кореляцією між копійністю генів *blaCMY*, *blaSHV* та *mcr-1* із кількістю копій *Bacteroidetes* жуйних тварин.

Результати нашого дослідження ілюструють присутність екологічної проблеми поширення стійкості до антибіотиків в акваторії Чорного моря. Тому даний індикатор може бути рекомендовано до використання у національній програмі моніторингу. Крім того, враховуючи потенційні шляхи надходження генів антибіотикорезистентності до акваторії Чорного моря, важливо провести оцінку поширеності та розподілу генів стійкості до антибіотиків у великих річках - Дунаї та Дністрі, що дозволить точніше визначити ймовірні джерела забруднення.

### Висновки до розділу 3

1. У досліджуваних угрупованнях мікроорганізмів спостерігалася вертикальна диференціація таксономічної структури у відповідності до стратифікації водного стовпа. В межах насичених киснем вод поверхні, термоклин у та глибинного максимуму хлорофілу переважали представники *Flavobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Synechococcaceae*, *Halomonadaceae* та *OCS155*, що зазвичай залучені до розкладу ексудатів фітопланктону та відіграють ключову роль у циклі вуглецю та азоту в морських екосистемах. В екотонній субоксичній зоні основну частку складали мікроорганізми, пристосовані до існування в умовах присутності залишкового світла та відновлених сполук сульфуру - *Chlorobia*, *Anaerolineae*, *Piscirickettsiaceae*,

*Deltaproteobacteria*. В умовах безкисневої зони Чорного моря спостерігалась диференціація угруповань залежно від глибини та, відповідно, концентрації сірководню. Так, верхню безкисневу зону населяло угруповання таксономічно подібне до бактеріопланктону субоксичної зони, а в глибокій сірководневій зоні переважали таксономічні групи, здатні до ферментації. Безкиснева зона характеризувалась різноманіттям сульфатвідновлювальних бактерій - *Desulfarculaceae*, *SAR324* та *Desulfobacteraceae*

2. Аналогічно, функціональна структура досліджуваного угруповання мікроорганізмів характеризувалась диференціацією у відповідності до таксономічної структури та градієнту фізико-хімічних умов. Так, в поверхневих водах та в межах термоклину переважали процеси асиміляційного відновлення сульфатів (40 – 47%) та оксигенного фотосинтезу. В межах глибинного максимуму хлорофілу зростала роль денітрифікації, що ймовірно пов'язано із доступністю продуктів лізису клітин фіпланктону. Зі збільшенням глибини спостерігалось зменшення частки функціональних компонентів оксигенного фотосинтезу та асиміляційного відновлення нітрату. Натомість, аноксигенний фотосинтез та дисиміляційне відновлення нітрату набували поширеності у субоксичних та безкисневих водах. Було виявлено компоненти дисиміляційної сульфат-редукції, частка яких зростала з глибиною синхронно із дисиміляційним відновленням нітрату, що свідчить про взаємопов'язаність біогеохімічних циклів сульфуру та азоту у Чорному морі. Кореляційний аналіз за Спірменом показав, що глибина та концентрація  $O_2$ ,  $PO_4$  та  $NO_3$  були найважливішими факторами формування функціональної структури досліджуваного угруповання мікроорганізмів.

3. Аналіз ANOSIM показав присутність регіональної диференціації мікробних угруповань шельфових зон та відкритих вод. Зафіксовані відмінності таксономічної та функціональної структури бактеріопланктону можна пояснити більшим видовим різноманіттям та вищою біомасою фітопланктону в районі українського шельфу у порівнянні із відкритими водами, що впливає на тип та доступність субстрату для розвитку бактерій.

4. Вертикальна диференціація досліджуваного угруповання мала більш виражений характер, ніж регіональна, що пов'язано із градієнтом фізико-хімічних умов середовища і постійною стратифікацією вод Чорного моря.

5. Статистично достовірна кореляція між матрицею географічних відстаней та таксономічною і функціональною структурою бактеріопланктону була відсутня, що вказує на провідний вплив факторів середовища у формуванні угруповань мікроорганізмів Чорного моря.

6. У таксономічній структурі угруповання бактеріопланктону було виявлено таксони, представники яких мають експериментально доведену здатність до розкладу ПАВ - *Rhodobacteraceae*, *Rhodospirillaceae*, *Halomonadaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Alcanivoracaceae*, *Bacilliaceae*, *Actinomycetales* та *Acidobacteriaceae*. Також було виявлено мікроорганізми із потенціалом до розщеплення хлорорганічних сполук - *Rhodobacteraceae*, *Micrococcaceae*.

7. Для мікробних угруповань донних осадів було характерне вище таксономічне різноманіття. Аналогічно, було встановлено присутність таксономічних груп, представники яких здатні до розкладу ПАВ - *Piscirickettsiaceae*, та хлорорганічних сполук - *Desulfuromonadaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Syntrophaceae*, *Peptococcaceae*, *Dehalococcoideaceae*.

8. З метою встановлення потенційної та реалізованої активності мікроорганізмів щодо розкладу ксенобіотиків було проведено оцінку копійності та аналіз транскрипції відповідних генів. Було показано достовірну різницю між копійністю генів розкладу ПХБ, ПАВ та хлорорганічних сполук у донних осадах та в різних зонах водного стовпа. Найвищий індекс співвідношення генів розкладу ксенобіотиків до копійності 16S рРНК було отримано для зразків донних осадів. У цілому, було показано потенціал мікробних угруповань Чорного моря до біотрансформації ПАВ, ПХБ та ГХЦГ.

9. За рівнем транскрипції найвищі показники мали гени розкладу ГХЦГ - *linA* та *linB*, що узгоджується із високими концентраціями  $\beta$ -ГХЦГ у водах Чорного моря на момент аналізу. Показник транскрипції гену розкладу ПАВ -

*PAH-RHD $\alpha$ -P* мав високі значення, як у воді, так і в донних осадах, що відповідає присутності високомолекулярних стійких ПАВ таких, як флуорантен, пірен та бензопірен у зразках морської води під час відбору. Високі показники транскрипції генів розкладу ксенобіотиків вказує на активну участь угруповань мікроорганізмів Чорного моря у біотрансформації забруднюючих речовин.

10. Активність мікроорганізмів вод та донних осадів Чорного моря сприяє зниженню концентрації менш стійких органічних забрудників, таких як біфеніл, нафтален,  $\alpha$ - та  $\gamma$ -ГХЦГ. Водночас, в середовищі спостерігається тенденція до накопичення стійких ксенобіотиків - високомолекулярних ПАВ та  $\beta$ -ГХЦГ, хоча функціональна активність мікроорганізмів спрямована на їх розклад.

11. У досліджуваних угрупованнях мікроорганізмів шельфу та відкритих вод Чорного моря було виявлено гени стійкості до антибіотиків – бета-лактамів, макролідів, глікопептидів та колістину. Ген стійкості до колістину було виявлено вперше.

12. Між відкритими водами, східним та північно-західним шельфом Чорного моря спостерігались достовірні відмінності за абсолютною копійністю генів антибіотикорезистентні в мікробних угрупованнях. Так, стійкість до антибіотиків мала найвищі значення у бактеріопланктону північно-західного шельфу.

13. Копійність генів стійкості до антибіотиків, визначена у даному дослідженні, знаходиться у діапазоні антибіотикорезистентності, встановленої для басейну річки Дунай та інших водних об'єктів.

14. Було встановлено кореляцію між фекальним забрудненням Чорного моря мікробіотою людини та жуйних тварин і копійністю маркерів антибіотикорезистентності, кількість копій 16S рРНК *Bacteroidetes* людини та жуйних тварин достовірно відрізнялась між шельфом та відкритими водами.

15. Достатньо високі значення копійності генів стійкості до антибіотиків та різниця копійності в районі шельфу та відкритих вод свідчать про антропогенний вплив на поширення явища стійкості до антибіотиків у досліджуваній акваторії і пов'язані із недостатнім контролем за призначенням та використанням

антибіотиків в країнах чорноморського басейну. Вищі показники стійкості до антибіотиків в районі північно-західного шельфу, ймовірно, зумовлені більшим об'ємом річкового стоку та екстенсивним сільським господарством у даному регіоні.

16. Результати дослідження ілюструють присутність екологічної проблеми поширення стійкості до антибіотиків в акваторії Чорного моря, що має підлягати регулярному моніторингу. Оцінка поширеності та розподілу генів стійкості до антибіотиків у великих річках - Дунаї та Дністрі дозволить точніше визначити ймовірні джерела забруднення.

## РОЗДІЛ 4

### ВИКОРИСТАННЯ ДАНИХ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛІЗУ УГРУПОВАНЬ МІКРООРГАНІЗМІВ ЧОРНОГО МОРЯ ДЛЯ ОЦІНКИ ЕКОЛОГІЧНОГО СТАНУ СЕРЕДОВИЩА

З розвитком технологій екологічних досліджень метагеномними методами постало питання про максимально ефективне використання отриманих даних з метою оцінки стану середовища. Було запропоновано розробити індекси для моніторингу морських екосистем із використанням даних молекулярного аналізу (Borja et al., Pawlowski et al., 2018). Мікроорганізми є потенційно ефективними індикаторами якості морської екосистеми через їх різноманіття, функціональну роль, повсюдну поширеність та швидку відповідь на коливання параметрів середовища (Lau et al., 2015, Stoeck & Pawlowski, 2018a). Оскільки таксономічне та функціональне різноманіття бактеріопланктону та мікробних угруповань донних осадів неможливо оцінити культуральними методами (Amann et al. 1995, Mu et al. 2021), застосування метагеномних методів є єдиним можливим способом максимально повно врахувати мікроорганізми у розробці біотичних індексів якості середовища (Lanzen et al. 2020).

Нами було проведено розрахунок індексу microgAMBI (microbial genomic Marine Biotic Index) та  $P_i$  (Pressure index) на основі, відповідно, даних таксономічного складу угруповань бактерій водної товщі та донних осадів (формула 2.14) та концентрації забруднюючих речовин у зразках. Дані було отримано в рамках проекту EMBLAS-II шляхом аналізу зразків, відібраних під час дослідницького рейсу в серпні-вересні 2017 року.

#### **4.1 Розрахунок індексу тиску на навколишнє середовище ( $P_i$ ) для водної товщі та донних осадів Чорного моря**

Для водної товщі Чорного моря було окремо розраховано значення  $P_i$  за концентрацією металів, хлорорганічних сполук (ХОС) та ПХБ

(поліхлорбіфенілів). Загальний індекс  $P_i$  для кожної станції відбору було обчислено, як середнє з індексів по окремих класах забруднюючих речовин.

Було виявлено значну різницю у показниках  $P_i$ , залежно від класу забруднюючих речовин, для якого його розраховували. Так, найнижчі значення мав індекс тиску, розрахований за концентрацією важких металів у морській воді, що свідчить про відсутність екологічного тиску за цим параметром. Індекс тиску за ХОС був вищим на деяких станціях відбору, зокрема 1б, 5, 6 та 10 перевищував межу допустимих значень (Табл. 4.1). Найвищі показники  $P_i$  було зафіксовано для ПХБ, що пов'язано із високими концентраціями стійких ПХБ, які було виявлено у воді Чорного моря. Так,  $P_i$  за ПХБ становив 5 на станціях 4, 5, 6, 7, що свідчить про високий рівень екологічного тиску (Табл. 4.1).

Таблиця 4.1

**Значення індексу тиску на навколишнє середовище,  
розраховане для водної товщі Чорного моря**

Станція	P <sub>i</sub> (умовні одиниці)			
	Метали	ХОС	ПХБ	Загальний
1a	1	1	3	2
1b	1	3	5	3
1	0	1	3	1
2	0	1	4	2
3	0	0	3	1
4	0	2	5	2
5	0	3	5	3
6	0	4	5	3
7	0	2	5	2
8	0	2	4	2
9	0	2	4	2
10	0	4	4	3



Загальне значення  $P_i$ , усереднене по різних класах ксенобіотиків, становило від 1 до 3 із найвищими показниками на станціях 1b, 6 та 10 (Рис. 6.1). Таким чином, розподіл  $P_i$  у морській воді мав мозаїчний характер, не було виявлено тенденції до вищих показників даних індексів в прибережних зонах порівняно із відкритими водами.

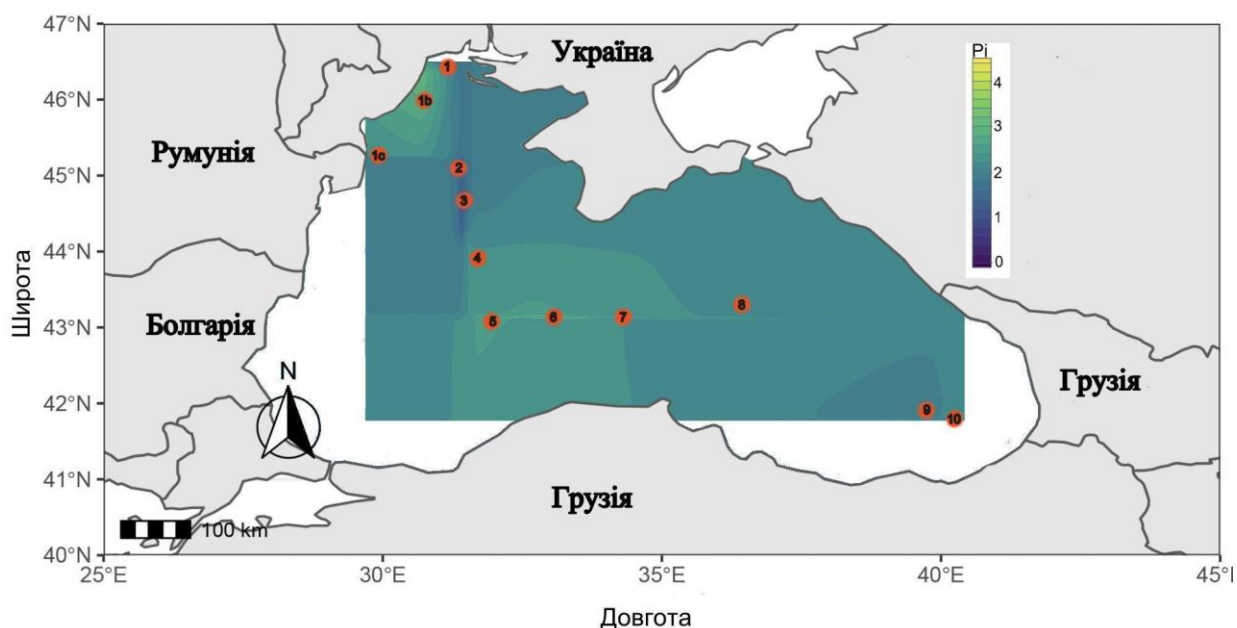


Рисунок 4.1 Розподіл значень  $P_i$  у водній товщі різних зон Чорного моря

Аналогічно було розраховано значення  $P_i$  для донних осадів Чорного моря. В цілому, донні осади характеризувались вищими показниками індексу тиску. Так, для жодної станції не було зафіксовано  $P_i < 2$  (Табл. 4.2), що пов'язано із вищим концентраціями забруднюючих речовин та, відповідно, вищими значеннями  $P_i$ .

Найнижчий показник екологічного тиску було зафіксовано для металів.  $P_i$  перевищували значення, визначені для водної товщі, однак були в межах допустимих (Aylagas et al. 2016). Показники  $P_i$ , розраховані для ХОС, варіювались в межах 1 - 3 із найвищими значеннями на станціях 5 та 9 (Табл. 4.2).  $P_i$ , визначені за концентрацією ПХБ, були вищими за індекси для інших класів забруднюючих речовин, що співпадає із результатом

аналізу екологічного тиску за вмістом ксенобіотиків у морській воді. Так, дані показники були в межах від 2 до 5 і мали найвищі значення на станціях 4 – 9.

Загальні усереднені  $P_i$  становили від 2 до 4, що вище за показники, зафіксовані для водної товщі (Табл. 4.2). На відміну від аналізу екологічного тиску за концентрацією ксенобіотиків у морській воді, розподіл значень  $P_i$  у донних осадах мав тенденцію до зростання із заходу на схід, а найвищі значення було зафіксовано в районі грузинського шельфу (Рис. 4.2).

Таблиця 4.2

**Значення індексу тиску на навколишнє середовище,  
розраховане для донних осадів Чорного моря**

Станція	Рі (умовні одиниці)			
	Важкі метали	Хлорорганічні сполуки	Поліхлорбіфеніли	Загальний
1б	0	2	3	2
1в	1	1	3	2
1	1	2	2	2
2	1	2	3	2
3	1	2	2	2
4	1	1	4	3
5	2	3	4	3
6	2	2	4	3
8	1	2	5	4
9	1	3	5	4
10	1	1	3	4

Значна різниця у показниках  $P_i$ , розрахованих для різних класів забруднюючих речовин, вказує на необхідність використання максимальної кількості доступних параметрів для розрахунку середніх значень індексу.

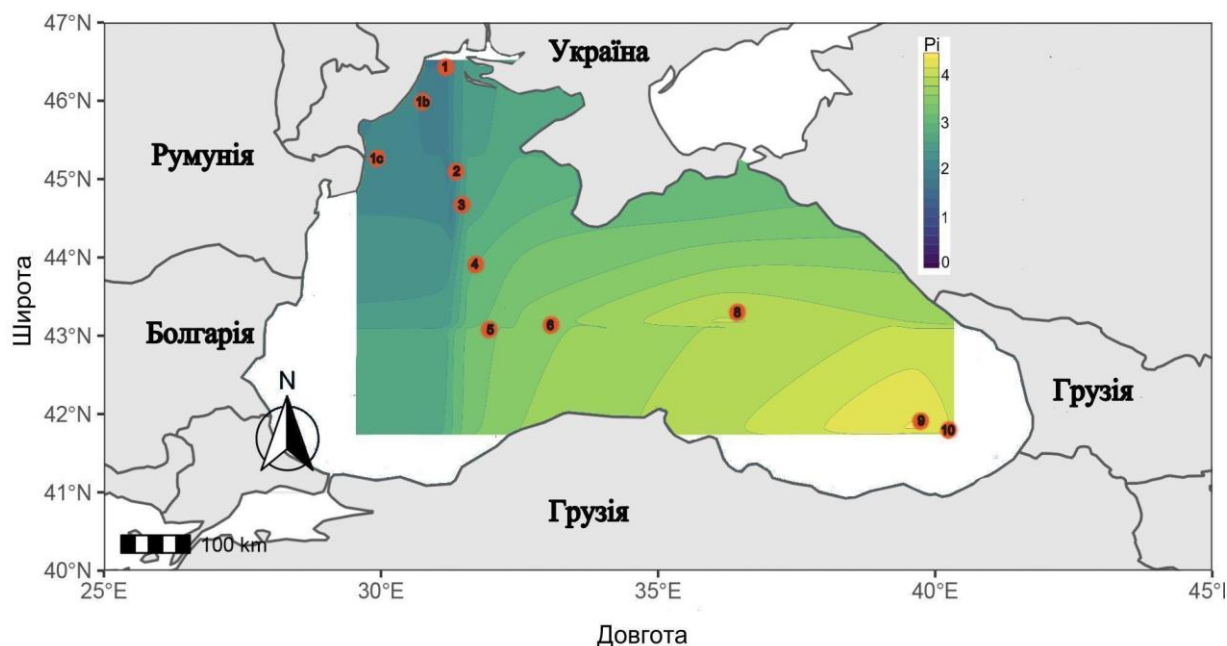


Рисунок 4.2 Розподіл значень  $P_i$  у донних осадах різних зон Чорного моря

#### 4.2 Розрахунок індексу *microgAMBI* для угруповань мікроорганізмів водної товщі Чорного моря

На основі даних таксономічної структури угруповань бактеріопланктону та мікроорганізмів донних осадів було проведено розрахунок біотичного індексу якості середовища - *microgAMBI* (Aylagas et al. 2016).

Спершу було проведено порівняння даних таксономічного аналізу із базою даних Aylagas et al. 2016, що містить інформацію щодо функціональної відповіді таксономічних груп на надходження ксенобіотиків у середовище. Таким чином, було встановлено частку, яку складають таксони, що 1) є оліготрофними та чутливими до забруднюючих речовин та 2) опортуністичними та толерантними до забруднення. Кількісне співвідношення зазначених груп визначало індекс *microgAMBI*.

Згідно отриманих результатів, переважна частина досліджуваної акваторії характеризувались “добрим” екологічним станом. В районі станції 5 було встановлено “задовільний” екологічний стан, біля станції 2 - “поганий” і, біля станції 6 - “дуже поганий” (Табл. 4.3).

Таблиця 4.3

**Значення індексу microgAMBI, розраховане для водної товщі  
Чорного моря**

Станція	microgAMBI (умовні одиниці)	Екологічна група (EG, цифрова градація)	Екологічний стан (умовна оцінка)
1a	1,867	2	Добрий
1б	1,661	2	Добрий
1	1,734	2	Добрий
2	3,750	4	Поганий
3	2,341	2	Добрий
4	2,251	2	Добрий
5	2,479	3	Задовільний
6	4,602	5	Дуже поганий
7	1,473	2	Добрий
8	2,345	2	Добрий
9	1,711	2	Добрий
10	2,253	2	Добрий

З метою визначення таксонів мікроорганізмів, що є потенційними індикаторами погіршення екологічного стану Чорного моря, було проведено непараметричний кореляційний аналіз між таксономічним складом угруповань мікроорганізмів водної товщі Чорного моря та розрахованими індексами microgAMBI.

Так було встановлено присутність негативної кореляції між екологічним станом вод та часткою *Actinomycetales* у досліджуваному угрупованні ( $R=0,6$ ,  $p=0,04$ ). Середня частка *Actinomycetales* зростала від 0,03 на станціях із “добрим” екологічним станом до 0,22 на станціях із “дуже поганим” екологічним станом (Рис. 4.3). *Actinomycetales* відомі високим рівнем толерантності до присутності ксенобіотиків у навколишньому середовищі і, навіть пропонуються до використання з метою біоремедіації (Hamed et al. 2013, Dong et al, 2015, Devanshi et al. 2021).

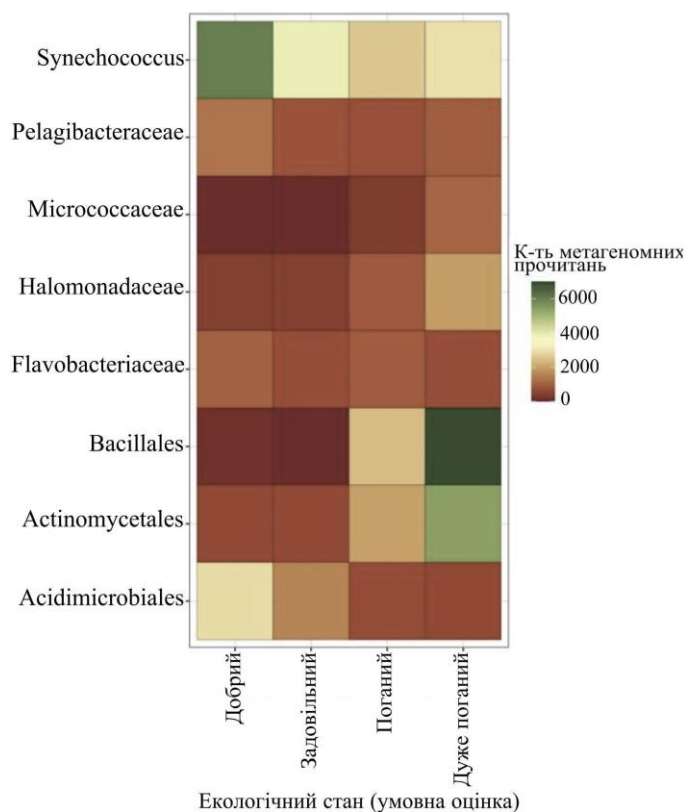


Рисунок 4.3 Розподіл таксономічних груп мікроорганізмів водної товщі Чорного моря (чисельність > 1000 метагеномних послідовностей) у відповідності до екологічного стану

Аналогічно спостерігалась статистично достовірна негативна кореляція між часткою *Halomonadaceae*, що становили від 0,02 на станціях із низькими значеннями microgAMBI до 0,08 за високих значень microgAMBI, та екологічним станом середовища ( $p=0,6$ ,  $p=0,04$ ) (Рис. 4.3.б), Рис. 4.4)). Дана таксономічна група є опортуністичною та толерантною до присутності органічних забруднюючих речовин та токсинів у середовищі (Kalaitzidou et al. 2022). Згідно попередніх досліджень *Halomonadaceae* здатні до деструкції ПАВ (Dong et al. 2015). Високу чисельність представників *Halomonadaceae* було встановлено у районах із хронічним забрудненням та під час масового розвитку фітопланктону, що супроводжувався надходженням значної кількості органіки до морських вод (Catania et al. 2018).

Нами було виявлено достовірну негативну кореляцію між екологічним станом вод Чорного моря та часткою *Shewanella* в угрупованні бактеріопланктону ( $\rho=0,6$ ,  $p=0,03$ ). Чисельність даної таксономічної групи коливалась в межах 0,00 - 0,018 метагеномних послідовностей за умови “доброго” та “дуже поганого” стану вод, відповідно (Рис. 4.4а). Згідно попередніх даних інших авторів представники *Shewanella* здатні до розщеплення ПАВ та детоксикації інших ксенобіотиків (Dong et al. 2015, Lemaire et al. 2020).

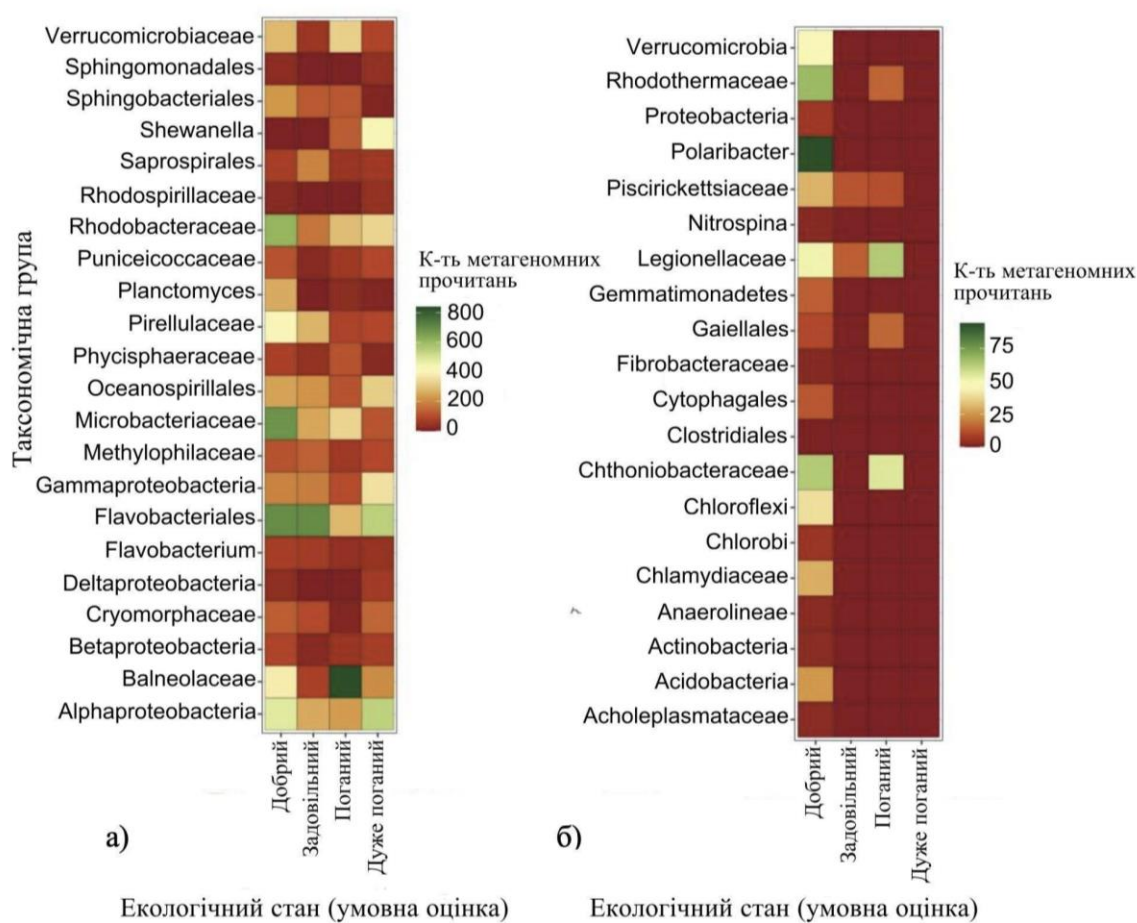


Рисунок 4.4 Розподіл таксономічних груп мікроорганізмів водної товщі у відповідності до екологічного стану Чорного моря: (а) чисельність > 100 метагеномних послідовностей, б) чисельність < 100 метагеномних послідовностей

Крім зазначених таксономічних груп спостерігалась динаміка інших представників бактеріопланктону у відповідності до екологічного стану вод, однак статистично достовірних кореляцій встановлено не було. Так, із “добрим” екологічним станом асоціювалось зростання частки *Synechococcus*, *Acidimicrobiaceae*, *Pelagibacteraceae* (Рис. 4.3), *Rhodobacteraceae*, *Microbacteriaceae* (Рис. 4.4а), *Polaribacter*, *Rhodothermaceae*, *Chloroflexi* (Рис. 4.4б).

Дані проведеного нами кореляційного аналізу вказують на потенційну можливість використання *Actinomycetales*, *Halomonadaceae* та *Shewanella*, як одних із індикаторів стану вод Чорного моря, що узгоджується із попередніми дослідженнями інших авторів (Dong et al, 2015, Catania et al. 2018). Подальші дослідження у Чорноморському регіоні дозволять розширити цей список потенційних індикаторів.

### **4.3 Розрахунок індексу microgAMBI для угруповань мікроорганізмів донних осадів Чорного моря**

Оскільки зразки донних осадів для даного аналізу було відібрано лише на шельфових станціях, розрахунки було проведено для точок 1б, 1в, 1, 2 та 3.

Значення microgAMBI, розраховане для донних осадів було в цілому вище за індекси, обчислені для водної товщі (Табл. 4.4), що свідчить про “гірший” екологічний стан і відповідає вищим значенням екологічного тиску (табл. 4.2). Екологічний стан донних осадів варіювався від “задовільного” на станціях 1в, 2 та 3 до “поганого” на станціях 1б та 1 і не корелював, як із показниками стану водної товщі, так із індексом екологічного тиску на середовище. Відсутність кореляції із показниками екологічного тиску може бути, зокрема, пов’язана із різницею у кількості та зонуванні зразків донних осадів, відібраних на хімічний та метагеномний аналіз.

Варто зазначити, що вищі показники microgAMBI співпадають із вищою копійністю та експресією генів розкладу ксенобіотиків, що була показана нами раніше (Prekrasna et al. 2022, Розділ 3).

Таблиця 4.4

**Значення індексу microgAMBI, розраховане для донних осадів  
Чорного моря**

Станція	microgAMBI (умовні одиниці)	Екологічна група (EG, цифрова градація)	Екологічний стан (умовна оцінка)
1б	4,429	4	Поганий
1в	3,153	3	Задовільний
1	4,141	4	Поганий
2	2,633	3	Задовільний
3	3,352	3	Задовільний

Кореляційний тест Спірмена показав присутність негативного статистично достовірного зв'язку між часткою *Anaerolineae* в угрупованні та екологічним станом середовища ( $\rho = 1$ ,  $p=0,02$ ). *Anaerolineae* становили від 0,031 до 0,065 за умов “задовільного” та “поганого” стану, відповідно (Рис. 4.5а). Представники даної таксономічної групи є облигатними анаеробами з експериментально показаною здатністю до розкладу ПХБ (Yamada et al. 2006, Rodriguez et al. 2021). Зростання відносної чисельності *Anaerolineae* спостерігали в анаеробних сульфатредуючих умовах у мікрокосмах на основі донних осадів, забруднених нафтопродуктами (Sherry et al. 2013). Вища частка *Anaerolineae* у донних осадах і значна роль даної таксономічної групи у погіршенні екологічного стану середовища, відповідає вищій активності угруповання мікроорганізмів донних осадів щодо розкладу конгенерів ПХБ, що була показана нами раніше (Prekrasna et al. 2021).

Аналогічно спостерігалась негативна кореляція між відотною чисельністю *Dehalococcoidetes*, що мають експериментально показану здатність до розкладу



хлорорганічних сполук (Seshadri et al. 2005), та екологічним станом донних осадів ( $p = 0,9$ ,  $p=0,05$ ). *Dehalococcoidetes* становили від 0,01 до 0,03 в угрупованнях мікроорганізмів в районах із “задовільним” та “поганим” екологічним станом (Рис. 4.5а, Рис. 4.6).

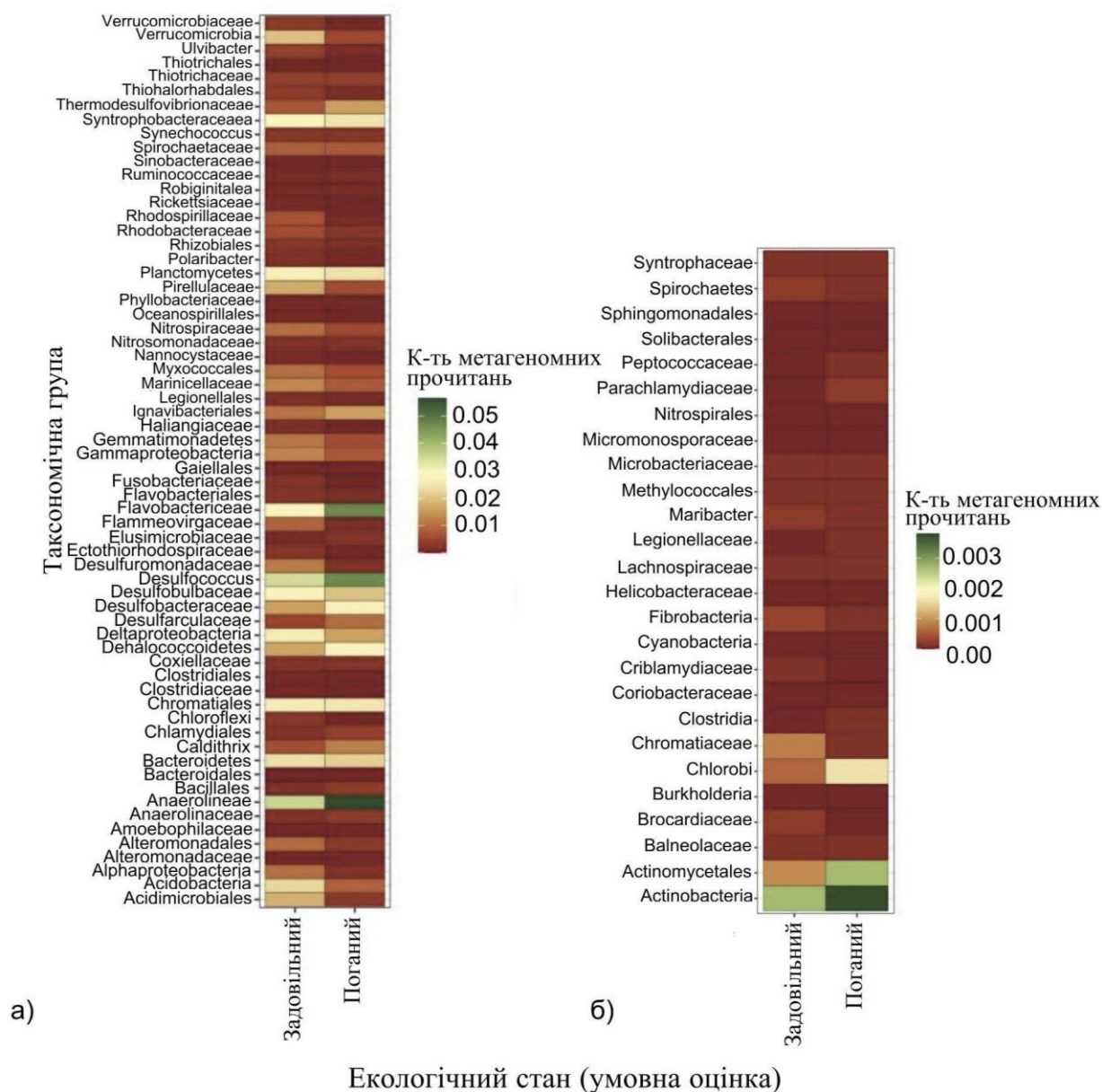


Рисунок 4.5 Розподіл таксономічних груп мікроорганізмів донних осадів Чорного моря у відповідності до екологічного стану: (а) частка  $> 0,005$ , б) частка  $< 0,005$ )

Статистично достовірного кореляційного зв'язку між екологічним станом донних осадів та часткою інших таксономічних груп відмічено не було. Водночас, із погіршенням екологічного стану асоціювалась вища частка *Thermodesulfovibrionaceae*, *Flavobacteraceae*, *Desulfococcus*, *Desulfobacteraceae*, *Actinomycetales* та *Chlorobi* (Рис. 4.5а, 4.5б, Рис. 4.6).

У попередніх дослідженнях інших авторів взаємозв'язку таксономічного складу угруповання бактеріопланктону із індексом *microgAMBI* та, відповідно, екологічним станом морського середовища було показано, що *Flavobacteraceae*, *Desulfobacteraceae*, *Anaerolineaceae* корелюють із “поганим” станом (Aygalas et al. 2017), що відповідає отриманим даним. Таким чином, частка *Anaerolineaea* та *Dehalococcoidetes* може бути рекомендована до використання, як додатковий параметр екологічного стану донних осадів Чорного моря. Інші таксони можна аналогічно рекомендувати, як індикатори стану середовища, після проведення додаткових досліджень.

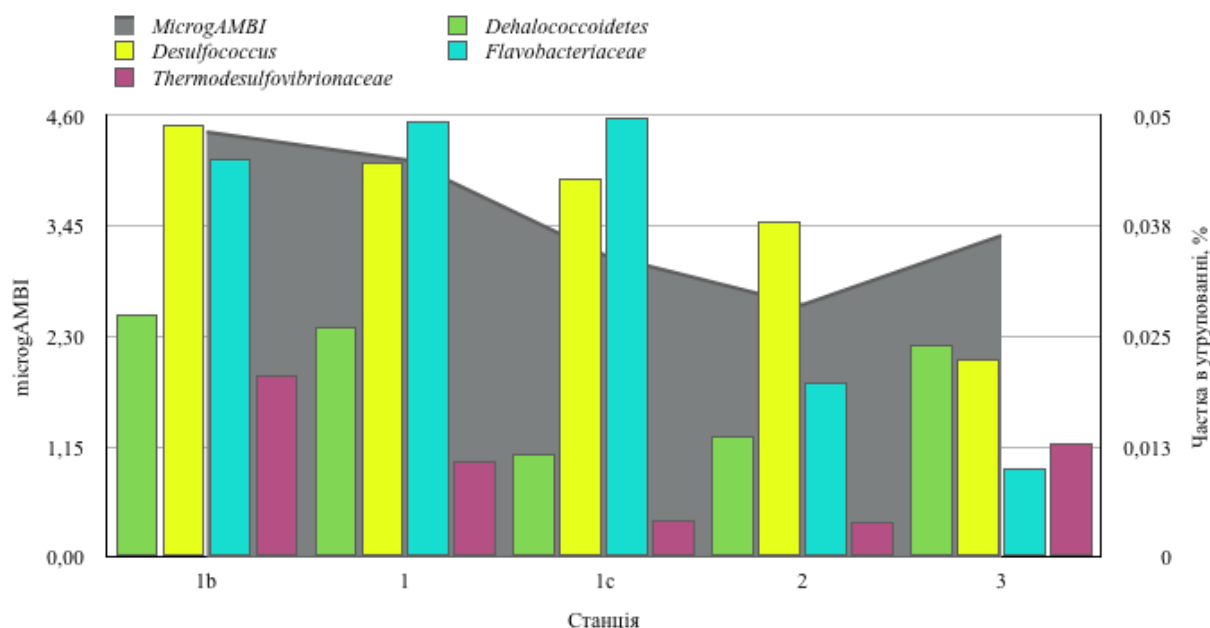


Рисунок 4.6 Таксономічні групи мікроорганізмів, асоційовані із динамікою *microgAMBI*

#### 4.4 Порівняння значень індексу тиску на навколишнє середовище та індексу екологічного стану microAMBI

Індекси тиску на навколишнє середовище та індекси екологічного стану, розраховані для водної товщі Чорного моря характеризувалися подібним розподілом (Рис. 4.7), хоча значення microAMBI були переважно вищими. Екологічний стан вод визначався ідентично за microAMBI та Pi для всіх станцій, крім 1б та 3.

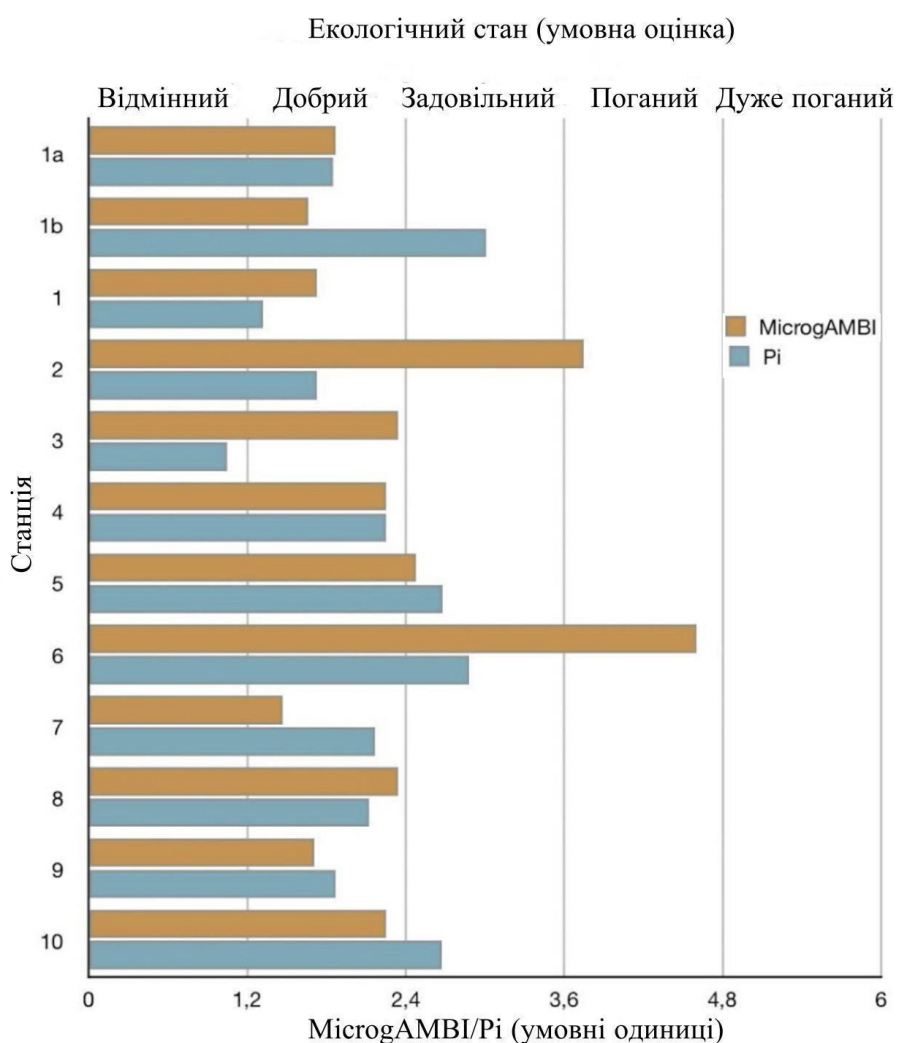


Рисунок 4.7 Порівняння індексів Pi та microAMBI для визначення екологічного стану вод Чорного моря

Значення індексів microgAMBI перевищували показники тиску на середовище під час оцінки екологічного стану донних осадів (Рис. 4.8). Було відмічено значні відмінності у визначенні екологічного стану за двома індексами. Так, за Рі усі досліджувані станції потрапили до категорії “добрий” та “задовільний” стан, а за microgAMBI - до категорії “задовільний” та “поганий”.

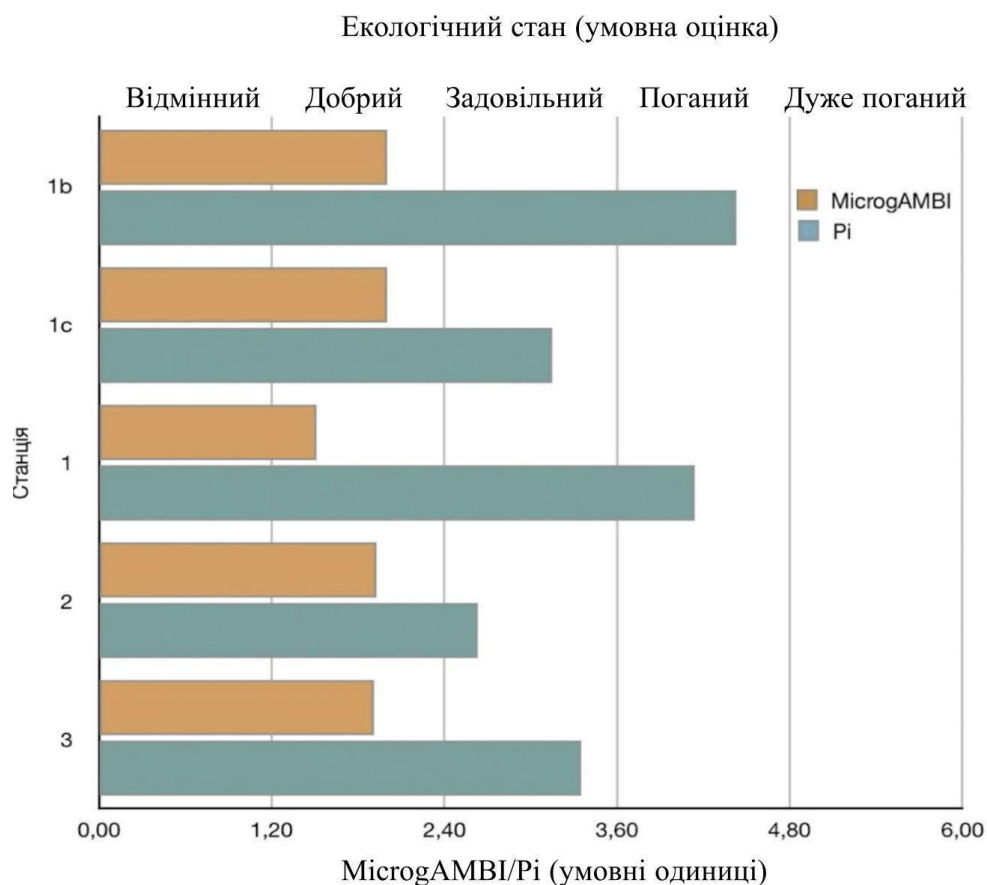


Рисунок 4.8 Порівняння індексів Рі та microgAMBI для визначення екологічного стану донних осадів Чорного моря

Зазначена відмінність є суттєвою, оскільки згідно Рамкової Директиви про морську стратегію, межа між гарним екологічним станом (GES) та поганим екологічним станом (non-GES) проходить по категоріях “добрий” та “задовільний”. Тому, нами було проведено порівняння microgAMBI із індексом M-AMBI, який визначався за показниками різноманіття бентосних угруповань в рамках проекту ЕМБЛАС-II (Muxika et al. 2007, Slobodnik et al. 2017). За

показниками M-AMBI станції 1б, 1с та 1 мали задовільний екологічний стан і таким чином належали до категорії non-GES, аналогічно до наших розрахунків. Водночас, станції 2 та 3 були віднесені до категорії GES і мали відмінний екологічний стан (Slobodnik et al. 2017), що суперечить нашим висновкам на основі microgAMBI.

Таким чином, розраховані індекси мають певні розбіжності, однак microgAMBI дозволяє уточнювати висновки щодо екологічного стану, як вод, так і донних осадів. Тому на даному етапі доцільним є застосування microgAMBI, як складової комплексного підходу до екологічної оцінки стану екосистеми Чорного моря.

Розрахований індекс є експериментальним. На даний момент його не впроваджено у програми регулярного моніторингу через брак досліджень із його застосуванням. Відомо, що функціональна відповідь бактерій на антропогенне навантаження характеризується значним різноманіттям, що, разом зі швидкими змінами геному бактерій під дією стрес-фактору, ускладнює інтерпретацію даних (Haggerty & Dinsdale 2017, Borja et al. 2018).

Саме тому, актуальним є випробування даного підходу для водних об'єктів із різним ступенем та типом антропогенного впливу. Крім того, варто зазначити, що точність розрахунків microgAMBI залежить від двох факторів: 1) наповненості баз даних, за якими визначається таксономічна приналежність операційних таксономічних одиниць, отриманих внаслідок метагеномного секвенування, 2) наявності досліджень реакції мікробного угруповання на надходження певного типу ксенобіотиків до середовища, як лабораторних, так і в реальних умовах навколишнього середовища. На даний момент, методи метагеномного секвенування набувають все більшого поширення, особливо для аналізу прокаріот, що призводить до постійного покращення точності таксономічного та функціонального аналізу. Тому, розробка та валідація індексів якості навколишнього середовища з використанням даних метагеномного аналізу мікроорганізмів є перспективним напрямком.

## Висновки до Розділу 4

1. Було проведено розрахунок індексу екологічного тиску на середовище (Pi) та індексу екологічного стану середовища за даними метагеномного аналізу мікробних угруповань водного стовпа та донних осадів (microgAMBI).

2. Показники Pi становили від 1 до 3 у морській воді і 2 - 4 у донних осадах. Pi у донних осадах мав тенденцію до зростання із заходу на схід, що свідчить про найвищі показники екологічного тиску в районі грузинського шельфу.

3. Показники Pi різнилися залежно від класу забруднюючих речовин, за якими їх було розраховано, що вказує на необхідність використання широкого спектру ксенобіотиків під час екологічної оцінки стану вод.

4. Розрахунки microgAMBI показали, що екологічний стан вод Чорного моря переважно “добрий”. Лише на трьох станціях було зафіксовано “задовільний”, “поганий” та “дуже поганий” стан. Екологічний стан донних осадів варіювався від “задовільного” до “поганого”, що узгоджується із вищою копійністю та експресією генів розкладу ксенобіотиків, що була показана нами раніше.

5. З метою визначення таксонів - потенційних індикаторів екологічного стану Чорного моря було проведено кореляційний аналіз між microgAMBI та таксономічною структурою угруповання мікроорганізмів. Було зафіксовано позитивну кореляцію між часткою *Actinomycetales*, *Halomonadaceae* та *Shewanella* в угрупованнях бактеріопланктону та вищими показниками microgAMBI, що свідчать про гірший екологічний стан вод. Поширеність *Synechococcus*, *Acidimicrobiaceae*, *Pelagibacteraceae*, *Rhodobacteraceae*, *Microbacteriaceae*, *Polaribacter*, *Rhodothermaceae* та *Chloroflexi* у воді асоціювалася із “добрим” екологічним станом.

6. В угрупованнях мікроорганізмів донних осадів спостерігалась кореляція між часткою *Anaerolineae* та *Dehalococcoidetes* і показником microgAMBI. Крім того, з погіршенням екологічного стану асоціювалася вища частка

*Thermodesulfovibrionaceae*, *Flavobacteraceae*, *Desulfococcus*, *Desulfobacteraceae*, *Actinomycetales* та *Chlorobi*.

7. В цілому було встановлено подібність розподілу показників екологічного стану вод Чорного моря за індексами microgAMBI та Pi. Водночас, у донних осадах значення індексів microgAMBI перевищували Pi.

8. Присутні певні розбіжності у біотичному (microgAMBI) та хімічному (Pi) індексах, проте microgAMBI дозволяє уточнювати висновки щодо екологічного стану, як вод, так і донних осадів. Актуальним є випробування та валідація даного підходу, як складової комплексного підходу до екологічної оцінки стану екосистеми Чорного моря

## ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі було проведено дослідження угруповань мікроорганізмів водної товщі та донних осадів Чорного моря на предмет їх таксономічного та функціонального складу, вертикального та горизонтального розподілу та екосистемної ролі, а саме участі у біотрансформації ксенобіотиків та в перенесенні генів стійкості до антибіотиків. За результатами дослідження було проведено аналіз можливості використання метагеномних даних щодо таксономії угруповань мікроорганізмів в екологічній оцінці стану Чорного моря згідно вимог Рамкової Директиви про морську стратегію ЄС. Це дало підставу зробити наступні висновки:

1. Виявлено, що в межах поверхні, термоклину та глибинного максимуму хлорофілу переважають представники *Flavobacteriaceae* (8-11%), *Rhodobacteraceae* (8-11%), *Synechococcaceae* (10-13%), *Halomonadaceae* (7%) та *OCS155* (6%). У функціональній структурі угруповань бактеріопланктону поверхні переважали процеси окисного фотосинтезу, а в межах глибинного максимуму хлорофілу зростала роль денітрифікації. В субоксичній зоні, що є екотонним середовищем набував поширення аноксигенний фотосинтез, а основна частка угруповання була складена представниками *Chlorobia* (7%), *Piscirickettsiaceae* (6%), *Deltaproteobacteria* (8%). Високе різноманіття сульфатвідновлювальних бактерій – *Desulfarculaceae* (0,6%), *SAR324* (5%) та *Desulfobacteraceae* (0,6%), було зафіксовано у безкисневій зоні Чорного моря, що супроводжувалося зростанням ролі дисиміляційної сульфат-редукції та дисиміляційного відновлення нітрату.

2. Встановлено, що в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря спостерігається вертикальна диференціація за таксономічної та функціональною структурою, що відповідає стратифікації водного стовпа та градієнту фізико-хімічних параметрів середовища. Показано присутність географічної диференціації угруповань мікроорганізмів шельфу та відкритих вод. Згідно результатів кореляційного аналізу Спірмена, глибина та концентрація  $O_2$ ,  $PO_4$  та



NO<sub>3</sub> є найважливішими факторами формування функціональної структури мікробних угруповань Чорного моря.

3. У досліджуваних угрупованнях мікроорганізмів було виявлено гени біотрансформації поліароматичних вуглеводнів (ПАВ), поліхлорбіфенілів (ПХБ) та гексахлорциклогексану (ГХЦГ). Найвищою була копійність гену катаболізму біфенілу та ПХБ – в середньому  $1,4 \times 10^5$  копій/мл у зразках з водної товщі та  $1,4 \times 10^6 \pm 3,3 \times 10^5$  копій/мг у донних осадах. Наступним за поширеністю був ген мікробного розкладу ГХЦГ. Найвищі показники транскрипції мали гени розкладу ГХЦГ та ПАВ. Високі показники транскрипції генів розкладу ксенобіотиків вказують на значну реалізовану активність угруповань мікроорганізмів Чорного моря у біотрансформації забруднюючих речовин, що є їх важливою екосистемною функцією.

4. У досліджуваних угрупованнях мікроорганізмів шельфу та відкритих вод Чорного моря було виявлено гени стійкості до бета-лактамів, макролідів, глікопептидів та колістину. Найвищі показники копійності спостерігались в межах північно-західного шельфу, що зумовлено більшим об'ємом річкового стоку та екстенсивним сільським господарством у даному регіоні. Ген стійкості до колістину було виявлено вперше у кількості  $1,52 \times 10^6 \pm 1,12 \times 10^5$  копій/мкл, а найпоширенішим був ген стійкості до ванкоміцину із  $7,1 \times 10^6 \pm 1,12 \times 10^6$  копій/мкл. Результати дослідження ілюструють присутність екологічної проблеми поширення стійкості до антибіотиків в акваторії Чорного моря, що має підлягати регулярному моніторингу.

5. Екологічний стан вод Чорного моря за біотичним індексом microgAMBI переважно належав до категорії “добрий”. “Задовільний”, “поганий” та “дуже поганий” стан було встановлено на трьох станціях з дванадцяти. Донні осади характеризувались різним екологічним станом – від “задовільного” до “поганого”, що узгоджується із вищою копійністю та експресією генів розкладу ксенобіотиків. У водній товщі з погіршенням екологічного стану асоціювалась присутність *Actinomycetales*, *Halomonadaceae* та *Shewanella*, а у донних осадах – *Anaerolineae* та *Dehalococcoidetes*. Актуальним є випробування та валідація

застосування індексу microgAMBI, як складової комплексної оцінки стану екосистеми Чорного моря

6. В рамках даного дисертаційного дослідження було розроблено та випробувано протоколи метагеномного аналізу угруповань мікроорганізмів Чорного моря: відбору матеріалу та подальшого лабораторного аналізу. Дані протоколи наведено у Додатках і може бути використано під час подальших моніторингових досліджень угруповань мікроорганізмів Чорного моря.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Угрупування мікроорганізмів відіграють ключову роль у морських екосистемах та здатні до швидкої відповіді на коливання параметрів навколишнього середовища, а тому мають потенціал, як індикатори екологічного стану Чорного моря. Проте на даному етапі мікроорганізми не враховуються у дискрипторів екологічного стану, згідно Рамкової Директиви про морську стратегію ЄС та Морської природоохоронної стратегії України. Впровадження індикаторів на основі даних щодо таксономічного, функціонального складу угруповань мікроорганізмів та їх розподілу потребує додаткових досліджень, валідації та гармонізації методик. Перспективними напрямками в даному контексті можуть бути наступні кроки:

1. Моніторинг поширення генів стійкості до антибіотиків в угрупованнях мікроорганізмів Чорного моря. На даний момент у Європейській комісії ведуться дискусії щодо можливості внесення генів антибіотикорезистентності до списку індикаторів якості середовища Водної Рамкової Директиви (WFD Watch List), аналогічно до антибіотиків. Тому доцільним є підготовка протоколів для моніторингу явища антибіотикорезистентності у мікробних угрупованнях Чорного моря.

2. Оцінка поширення стійкості до антибіотиків в угрупованнях мікроорганізмів великих річок, що впадають в Чорне море. Поширеність явища антибіотикорезистентності в акваторії Чорного моря опосередковано свідчить про розвиток стійкості до антибіотиків в угрупованнях бактеріопланктону Дунаю, Дніпра та Дністра. Прогнозується, що дана проблема поглибиться, оскільки багато очисних споруд пошкоджено через збройну агресію російської федерації щодо України.

3. Використання даних щодо частки сульфатредуючих мікробних таксонів в угрупованні мікроорганізмів Чорного моря для моніторингу розташування безкисневої зони Чорного моря.

4. Подальше тестування можливостей застосування індексу microgAMBI для оцінки екологічного стану середовища Чорного моря. Розвиток технологій метагеномного секвенування призвів до генерацію великих масивів даних, які є у вільному доступі і можуть бути використані для оцінки стану навколишнього середовища. Тому актуальним є подальша валідація даного підходу із розрахунком microgAMBI для різних зон Чорного моря та для інших водних об'єктів.

5. Результати наукових досліджень, оприлюднених в дисертаційній роботі, доцільно застосовувати для підготовки спеціалістів – екологів у ВНЗ

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abramowicz, D. A. (1990). Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: A review. In Critical Reviews in Biotechnology. <https://doi.org/10.3109/07388559009038210>
2. Agulló, L., Pieper, D. H., & Seeger, M. (2017). Genetics and Biochemistry of Biphenyl and PCB Biodegradation. In Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5\\_30-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_30-1)
3. Allers, E., Wright, J. J., Konwar, K. M., Howes, C. G., Beneze, E., Hallam, S. J., & Sullivan, M. B. (2013). Diversity and population structure of Marine Group A bacteria in the Northeast subarctic Pacific Ocean. *ISME Journal*, 7(2), 256–268. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.108>
4. Alygizakis, N. A., Besselink, H., Paulus, G. K., Oswald, P., Hornstra, L. M., Oswaldova, M., Medema, G., Thomaidis, N. S., Behnisch, P. A., & Slobodnik, J. (2019). Characterization of wastewater effluents in the Danube River Basin with chemical screening, in vitro bioassays and antibiotic resistant genes analysis. *Environment International*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.060>
5. Angly, F. E., Heath, C., Morgan, T. C., Tonin, H., Rich, V., Schaffelke, B., Bourne, D. G., & Tyson, G. W. (2016). Marine microbial communities of the Great Barrier Reef lagoon are influenced by riverine floodwaters and seasonal weather events. *PeerJ*, 4, e1511. <https://doi.org/10.7717/peerj.1511>
6. Antoniadou A., Kontopidou F., Poulakou G., Koratzanis E., Galani I., Papadomichelakis E., Kopterides P., Souli M., Armaganidis A., Giamarellou H. (2007) Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother*. 59(4):786-90. doi: 10.1093/jac/dkl562. Epub 2007 Feb 16. PMID: 17307769
7. Atlas, R. M., & Hazen, T. C. (2011). Oil biodegradation and bioremediation: A tale of the two worst spills in U.S. history. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es2013227>

8. Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents. In *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>
9. Aylagas, E., Borja, Á., Irigoien, X., & Rodríguez-Ezpeleta, N. (2016). Benchmarking DNA metabarcoding for biodiversity-based monitoring and assessment. *Frontiers in Marine Science*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00096>
10. Aylagas, E., Borja, Á., Muxika, I., & Rodríguez-Ezpeleta, N. (2018). Adapting metabarcoding-based benthic biomonitoring into routine marine ecological status assessment networks. *Ecological Indicators*. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.07.044>
11. Aylagas, E., Borja, Á., Tangherlini, M., Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Michell, C. T., Irigoien, X., Danovaro, R., & Rodríguez-Ezpeleta, N. (2017). A bacterial community-based index to assess the ecological status of estuarine and coastal environments. *Marine Pollution Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.050>
12. Aytan, U., Feyzioglu, A. M., Valente, A., Agirbas, E., & Fileman, E. S. (2018). Microbial plankton communities in the coastal southeastern Black Sea: biomass, composition and trophic interactions. *Oceanologia*. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2017.09.002>
13. Bakan, G., & Ariman, S. (2004). Persistent organochlorine residues in sediments along the coast of mid-Black Sea region of Turkey. *Marine Pollution Bulletin*, 48(11–12), 1031–1039. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.12.005>
14. Bakenhus, I., Dlugosch, L., Billerbeck, S., Giebel, H.-A., Milke, F., & Simon, M. (2017). Composition of total and cell-proliferating bacterioplankton community in early summer in the North Sea –Roseobacters are the most active component. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1771. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01771>
15. Baldani, J. I., Videira, S. S., Dos Santos Teixeira, K. R., Reis, V. M., de Oliveira, A. L. M., Schwab, S., de Souza, E. M., Pedraza, R. O., Baldani, V. L. D., & Hartmann, A. (2014). The family Rhodospirillaceae. In E. Rosenberg, F. E. DeLong, S. Lory, E.

- Stackebrandt & F. Thompson (Eds.). *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. *The Prokaryotes*. (533–618). Berlin, Heidelberg: Springer
16. Baldwin, B. R., Nakatsu, C. H., & Nies, L. (2003). Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3350-3358.2003>
  17. Baquero F., Martí'nez J-L, Canto R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. - *Current Opinion in Biotechnology*. - 19: 260–265
  18. Bargiela, R., Mapelli, F., Rojo, D., Chouaia, B., Tornés, J., Borin, S., Richter, M., Del Pozo, M. V., Cappello, S., Gertler, C., Genovese, M., Denaro, R., Martínez-Martínez, M., Fodelianakis, S., Amer, R. A., Bigazzi, D., Han, X., Chen, J., Chernikova, T. N., ... Ferrer, M. (2015). Bacterial population and biodegradation potential in chronically crude oil-contaminated marine sediments are strongly linked to temperature. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep11651>
  19. Basen, M., Krüger, M., Milucka, J., Kuever, J., Kahnt, J., Grundmann, O., Meyerdierks, A., Widdel, F., & Shima, S. (2011). Bacterial enzymes for dissimilatory sulfate reduction in a marine microbial mat (Black Sea) mediating anaerobic oxidation of methane. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02443.x>
  20. Berglund, B. (2015). Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infection Ecology & Epidemiology*. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.28564>
  21. Berhilevych OM, Kasianchuk VV, Kukhtyn MD, Lotskin IM, Garkavenko TO et al (2017) Characteristics of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms in Ukraine. *Regul Mech Biosyst* 8(4):559–563. <https://doi.org/10.15421/021786>
  22. Bezborodov, A. A. (1992). The fine geochemical structure of the oxic/anoxic interface layer in the black sea. In *Complex Oceanographic Research on the Black Sea*. <https://doi.org/10.1201/b12069-11>

23. Bizo T., P., Dumitras, D., & Popa, A. (2015). Evaluation of restricted antibiotic use in a hospital in Romania. *International Journal of Clinical Pharmacy*. <https://doi.org/10.1007/s11096-015-0096-1>
24. Boetius A., Ravensschlag K., Schubert C. J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., et al. (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407 623–626
25. Bonaglia, S., Klawonn, I., De Brabandere, L., Deutsch, B., Thamdrup, B., & Brüchert, V. (2016). Denitrification and DNRA at the Baltic Sea oxic–anoxic interface: Substrate spectrum and kinetics. *Limnology and Oceanography*. <https://doi.org/10.1002/lno.10343>
26. Borin, S., Brusetti, L., Mapelli, F., D'Auria, G., Brusa, T., Marzorati, M., Rizzi, A., Yakimov, M., Marty, D., De Lange, G. J., Van der Wielen, P., Bolhuis, H., McGenity, T. J., Polymenakou, P. N., Malinverno, E., Giuliano, L., Corselli, C., & Daffonchio, D. (2009). Sulfur cycling and methanogenesis primarily drive microbial colonization of the highly sulfidic Urania deep hypersaline basin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), 9151–9156. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811984106>
27. Borja, A. (2018). Testing the efficiency of a bacterial community-based index (microgAMBI) to assess distinct impact sources in six locations around the world. *Ecological Indicators*. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.11.018>
28. Borja, A., Franco, J., & Pérez, V. (2000). A marine Biotic Index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments. *Marine Pollution Bulletin*. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00061-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00061-8)
29. Bowman, J. P. (2006). The marine clade of the family flavobacteriaceae: The genera *aequorivita*, *arenibacter*, *cellulophaga*, *croceibacter*, *formosa*, *gelidibacter*, *gillisia*, *maribacter*, *mesonia*, *muricauda*, *polaribacter*, *psychroflexus*, *psychroserpens*, *robiginitalea*, *salegentibacter*, *tenacibaculum*, *ulvibacter*, *vitellibacter* and *zobellia*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt (Eds.). *The Prokaryotes* (677–694). New York, NY: Springer



30. Boyle, A. W., Häggblom, M. M., & Young, L. Y. (1999). Dehalogenation of lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane) by anaerobic bacteria from marine sediments and by sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(99\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(99)00035-5)
31. Boyle, A. W., Phelps, C. D., & Young, L. Y. (1999). Isolation from estuarine sediments of a *Desulfovibrio* strain which can grow on lactate coupled to the reductive dehalogenation of 2,4,6-tribromophenol. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.65.3.1133-1140.1999>
32. Bristow, L. A., Callbeck, C. M., Larsen, M., Altabet, M. A., Dekaezemacker, J., Forth, M., Gauns, M., Glud, R. N., Kuypers, M. M. M., Lavik, G., Milucka, J., Naqvi, S. W. A., Pratihary, A., Revsbech, N. P., Thamdrup, B., Treusch, A. H., & Canfield, D. E. (2017). N<sub>2</sub> production rates limited by nitrite availability in the Bay of Bengal oxygen minimum zone. *Nature Geoscience*, 10, 24–29. <https://doi.org/10.1038/ngeo2847>
33. Bristow, L. A., Dalsgaard, T., Tiano, L., Mills, D. B., Bertagnolli, A. D., Wright, J. J., Hallam, S. J., Ulloa, O., Canfield, D. E., Revsbech, N. P., & Thamdrup, B. O. (2016). Ammonium and nitrite oxidation at nanomolar oxygen concentrations in oxygen minimum zone waters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 10601–10606. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600359113>
34. Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. In *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860>
35. Buchan, A., LeClerc, G. R., Gulvik, C. A., & González, J. M. (2014). Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 12(10), 686–698. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3326>
36. Bulow, S. E., Rich, J. J., Naik, H. S., Pratihary, A. K., & Ward, B. B. (2010). Denitrification exceeds anammox as a nitrogen loss pathway in the Arabian Sea oxygen minimum zone. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2009.10.014>

37. Bunge M., Adrian L., Kraus A., Opel M., Lorenz W.G., Andreesen J.R., Görisch H., Lechner U. (2003). Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. – *Nature*. – 421:357–360. <https://doi.org/10.1038/nature01237>
38. Canfield, D. E., Stewart, F. J., Thamdrup, B., De Brabandere, L., Dalsgaard, T., Delong, E. F., Revsbech, N. P., & Ulloa, O. (2010). A cryptic sulfur cycle in oxygen-minimum-zone waters off the Chilean coast. *Science*, 330(6009), 1375–1378. <https://doi.org/10.1126/science.1196889>
39. Cao, H., Dong, C., Bougouffa, S., Li, J., Zhang, W., Shao, Z., Bajic, V. B., & Qian, P.-Y. (2016). Delta-proteobacterial SAR324 group in hydrothermal plumes on the South Mid-Atlantic Ridge. *Scientific Reports*, 6, 22842. <https://doi.org/10.1038/srep22842>
40. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pêa, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. In *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
41. Cardman, Z., Arnosti, C., Durbin, A., Ziervogel, K., Cox, C., Steen, A. D., & Teske, A. (2014). Verrucomicrobia are candidates for polysaccharide-degrading bacterioplankton in an Arctic fjord of Svalbard. *Applied and Environment Microbiology*, 80(12), 3749–3756. <https://doi.org/10.1128/AEM.00899-14>
42. Carey, C. C., Ibelings, B. W., Hoffmann, E. P., Hamilton, D. P., & Brookes, J. D. (2012). Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research*, 46(5), 1394–1407. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.016>
43. Carolan, M. T., Smith, J. M., & Beman, J. M. (2015). Transcriptomic evidence for microbial sulfur cycling in the eastern tropical North Pacific oxygen minimum zone. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00334>
44. Caruso, G., La Ferla, R., Azzaro, M., Zoppini, A., Marino, G., Petochi, T., Corinaldesi, C., Leonardi, M., Zacccone, R., Fonda, S., Caroppo, C., Monticelli, L.,

- Azzaro, F., Decembrini, F., Maimone, G., Cavallo, R., Stabili, L., Todorova, N., Karamfilov, V., ... Danovaro, R. (2016). Microbial assemblages for environmental quality assessment: Knowledge, gaps and usefulness in the European marine strategy framework directive. In *Critical Reviews in Microbiology*. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1087380>
45. Casciotti, K. L., & Buchwald, C. (2012). Insights on the marine microbial nitrogen cycle from isotopic approaches to nitrification. *Frontiers in Microbiology*, 3, 356. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00356>
  46. Catania, V., Cappello, S., Di Giorgi, V., Santisi, S., Di Maria, R., Mazzola, A., Vizzini, S., & Quatrini, P. (2018). Microbial communities of polluted sub-surface marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.015>
  47. Cebon, A., Norini, M.-P., Beguiristain, T., Leyval, C. (2008). Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J. Microbiol. Methods* 73, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.009>
  48. Chakraborty, J., & Das, S. 2016. Molecular perspectives and recent advances in microbial remediation of persistent organic pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6887-7>
  49. Chiodini, R. J., Dowd, S. E., Chamberlin, W. M., Galandiuk, S., Davis, B., & Glassing, A. (2015). Microbial population differentials between mucosal and submucosal intestinal tissues in advanced Crohn's disease of the ileum. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134382>
  50. Cokacar, T., Kubilay, N., & Oguz, T. (2001). Structure of *Emiliana huxleyi* blooms in the Black Sea surface waters as detected by SeaWiFS imagery. *Geophysical Research Letters*. <https://doi.org/10.1029/2001GL013770>
  51. Coolen, M. J. L., Abbas, B., Van Bleijswijk, J., Hopmans, E. C., Kuypers, M. M. M., Wakeham, S. G., & Sinninghe Damsté, J. S. (2007). Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: A basin-wide ecological study using

- 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01227.x>
52. Cui, Y., Chun, S.-J., Baek, S. H., Lee, M., Kim, Y., Lee, H.-G., Ko, S.-R., Hwang, S., Ahn, C.-Y., & Oh, H.-M. (2019). The water depth-dependent co-occurrence patterns of marine bacteria in shallow and dynamic Southern Coast, Korea. *Scientific Reports*, (5), 9176. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45512-5>
  53. Cui, Z., Lai, Q., Dong, C., & Shao, Z. (2008). Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01637.x>
  54. Daffonchio, D., Borin, S., Brusa, T., Brusetti, L., van der Wielen, P. W. J. J., Bolhuis, H., Yakimov, M. M., D'Auria, G., Giuliano, L., Marty, D., Tamburini, C., McGenity, T. J., Hallsworth, J. E., Sass, A. M., Timmis, K. N., Tselepides, A., de Lange, G. J., Hübner, A., Thomson, J., ... Corselli, C. (2006). Stratified prokaryote network in the oxic-anoxic transition of a deep-sea halocline. *Nature*, 440(7081), 203–207. <https://doi.org/10.1038/nature04418>
  55. Daims, H., Lücker, S., & Wagner, M. (2016). A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends in Microbiology*, 24(9), 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>
  56. Dalsgaard, T., Canfield, D. E., Petersen, J., Thamdrup, B., & Acuña-González, J. (2003). N<sub>2</sub> production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature01526>
  57. De La Haba, R. R., Arahall, D. R., Sánchez-Porro, C. et al. (2014). The family halomonadaceae. In E. Rosenberg, E. F DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt & F. Thompson (Eds.). *The prokaryotes: Gammaproteobacteria* (325–360). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag
  58. Denga, Y., Orlova, I., Komorin, V., Oleynik, Y., Korshenko, A., Hushchyna, K., Lukyanova, N., Kochetkov, S., Arabidze, M., Machitadze, N., Gelashvili, N., Bakradze, H., Kitoshvili, E., Medinets, V., G, Z., Chasovnikov, V., Matveeva, I., Zhugailo, S. (2020). Metals, polyaromatic hydrocarbons, total petroleum hydrocarbons, chlorinated pesticides and PCBs in sea water and sediments. In:

- Slobodnik, J., Alexandrov, B., Komorin, V., Mikaelyan, A., Guchmanidze, A., Arabidze, M., Korshenko, A., Moncheva, S. (Eds.), National Pilot Monitoring Studies and Joint Open Sea Surveys in Georgia, Russian Federation and Ukraine, 2016: Final Scientific Report. Seredniak T.K., Dnipro, pp. 305–420
59. Denga, Y. M., Mykhailenko, V. I., Oleynik, Y. V., & Safranov, T. A. (2020). Peculiarities of Pollution by Some Persistent Organic Pollutants of the Marine Environment of the Northwestern Part of the Black Sea. *Visnyk of VN Karazin Kharkiv National University series «Ecology»*, (23), 8-20
  60. DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
  61. Deutsch, C., Sarmiento, J. L., Sigman, D. M., Gruber, N., & Dunne, J. P. (2007). Spatial coupling of nitrogen inputs and losses in the ocean. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature05392>
  62. Devanshi, S., R. Shah, K., Arora, S., & Saxena, S. (2022). Actinomycetes as An Environmental Scrubber. In *Crude Oil - New Technologies and Recent Approaches*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99187>
  63. Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive)
  64. Doern, G. V., Pfaller, M. A., Erwin, M. E., Brueggemann, A. B., & Jones, R. N. (1998). The prevalence of fluoroquinolone resistance among clinically significant respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States and Canada - 1997 results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(98\)00081-9](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(98)00081-9)
  65. Dong, C., Bai, X., Sheng, H., Jiao, L., Zhou, H., & Shao, Z. (2015). Distribution of PAHs and the PAH-degrading bacteria in the deep-sea sediments of the high-latitude Arctic Ocean. *Biogeosciences*. <https://doi.org/10.5194/bg-12-2163-2015>

66. Dong, X., Greening, C., Bröls, T., Conrad, R., Guo, K., Blaskowski, S., Kaschani, F., Kaiser, M., Laban, N. A., & Meckenstock, R. U. (2018). Fermentative *Spirochaetes* mediate necromass recycling in anoxic hydrocarbon-contaminated habitats. *ISME Journal*, 12(8), 2039–2050. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0148-3>
67. Dowd, S. E., Sun, Y., Wolcott, R. D., Domingo, A., & Carroll, J. A. (2008). Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: Bacterial diversity in the ileum of newly weaned *Salmonella*-infected pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0107>
68. Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A. M., & Clipson, N. (2008). Chapter 2 Microbial PAH Degradation. In *Advances in Applied Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00602-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00602-3)
69. Dumoulin, D., Net, S., & Ouddane, B. (2013).- Étude de la contamination en PCB de la Somme rivière – Campagne 2012. Report published by Agence de l'Eau Artois-Picardie, (<http://www.eauartois-picardie.fr/Etude-de-la-contamination-en-PCB.html>)
70. Duran, R., & Cravo-Laureau, C. (2016). Role of environmental factors and microorganisms in determining the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. In *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw031>
71. Duran, R., Bielen, A., Paradžik, T., Gassie, C., Pustijanac, E., Cagnon, C., Hamer, B., & Vujaklija, D. (2015). Exploring Actinobacteria assemblages in coastal marine sediments under contrasted Human influences in the West Istria Sea, Croatia. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4240-1>
72. Durisch-Kaiser, E., Klauser, L., Wehrli, B., & Schubert, C. (2005). Evidence of intense archaeal and bacterial methanotrophic activity in the Black Sea water column. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8099-8106.2005>
73. ECDC. (2020). European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. Centre for Disease Control and Prevention

74. Eckert, E. M., Salcher, M. M., Posch, T., Eugster, B., & Pernthaler, J. (2012). Rapid successions affect microbial N-acetyl-glucosamine uptake patterns during a lacustrine spring phytoplankton bloom. *Environmental Microbiology*, 14(3), 794–806. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02639.x>
75. EClinicalMedicine. (2021). Antimicrobial resistance: a top ten global public health threat. In eClinicalMedicine. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101221>
76. Economou V., Gousia P. (2015) Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect Drug Resist.* doi: 10.2147/IDR.S55778
77. Ediger, D., Murray, J. W., & Yilmaz, A. (2019). Phytoplankton biomass, primary production and chemoautotrophic production of the Western Black Sea in April 2003. *Journal of Marine Systems*. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2019.103183>
78. Edwards, J. L., Smith, D. L., Connolly, J., McDonald, J. E., Cox, M. J., Joint, I., Edwards, C., & McCarthy, A. J. (2010). Identification of carbohydrate metabolism genes in the metagenome of a marine biofilm community shown to be dominated by Gammaproteobacteria and Bacteroidetes. *Genes*. <https://doi.org/10.3390/genes1030371>
79. Epa and of Science (2019). Office of water method 1697: characterization of human fecal pollution in water by HF183/BacR287 TaqMan ® quantitative polymerase chain reaction (qPCR) Assay I. EPA Off. Water 821, 2–19. March [www.epa.gov](http://www.epa.gov)
80. Ewald, J. M., Humes, S. V., Martinez, A., Schnoor, J. L., & Mattes, T. E. (2020). Growth of *Dehalococcoides* spp. and increased abundance of reductive dehalogenase genes in anaerobic PCB-contaminated sediment microcosms. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05571-7>
81. Falagas, M. E., & Kasiakou, S. K. (2005). Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. In *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1086/429323>
82. Fetzner S. 2002. Biodegradation of xenobiotics. In Doelle H W, Rokem S, Berovic M (eds.) *Biotechnology*. Volume 10. *En-cyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. EOLSS Pub-lishers Co. Ltd., Oxford. pp. 215–246

83. Frias-Lopez, J., Shi, Y., Tyson, G. W., Coleman, M. L., Schuster, S. C., Chisholm, S. W., & DeLong, E. F. (2008). Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708897105>
84. Fuchsman, C. A., Devol, A. H., Saunders, J. K., McKay, C., & Rocap, G. (2017). Niche partitioning of the N cycling microbial community of an offshore oxygen deficient zone. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02384>
85. Fuchsman, C. A., Kirkpatrick, J. B., Brazelton, W. J., Murray, J. W., & Staley, J. T. (2011). Metabolic strategies of free-living and aggregate-associated bacterial communities inferred from biologic and chemical profiles in the Black Sea suboxic zone. *FEMS Microbiology Ecology*, 78(3), 586–603. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01189.x>
86. Fuchsman, C. A., Murray, J. W., & Staley, J. T. (2012). Stimulation of autotrophic denitrification by intrusions of the Bosphorus Plume into the anoxic Black Sea. *Frontiers in Microbiology*, 3, 257. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00257>
87. Furukawa, K., & Fujihara, H. (2008). Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: Biochemical and molecular features. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1263/jbb.105.433>
88. Ghai, R., Mizuno, C. M., Picazo, A. et al. (2014). Key roles for freshwater Actinobacteria revealed by deep metagenomic sequencing. *Molecular Ecology*, 23(24), 6073–6090. <https://doi.org/10.1111/mec.12985>
89. Gibson, D. T., & Parales, R. E. (2000). Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. In *Current Opinion in Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00090-2)
90. Glaubit S, Labrenz M, Jost G, Jürgens K. Diversity of active chemolithoautotrophic prokaryotes in the sulfidic zone of a Black Sea pelagic redoxcline as determined by rRNA-based stable isotope probing. *FEMS Microbiology Ecology* 2010; 74 – 32–41
91. Glöckner, F. O., Kube, M., Bauer, M. et al. (2003). Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proceedings of the National Academy*



- of Sciences of the United States of America, 100, 8298–8303.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1431443100>
92. Griffin, D. W., Benzel, W. M., Fisher, S. C., Focazio, M. J., Iwanowicz, L. R., Loftin, K. A., Reilly, T. J., & Jones, D. K. (2019). The presence of antibiotic resistance genes in coastal soil and sediment samples from the eastern seaboard of the USA. *Environmental Monitoring and Assessment*. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7426-z>
  93. Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G., & Bailey, M. J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5488-5491.2000>
  94. Grote, J., Jost, Günter, Labrenz, M., Herndl, G. J., & Jürgens, K. (2008). Epsilonproteobacteria represent the major portion of chemoautotrophic bacteria in sulfidic waters of pelagic redoxclines of the Baltic and Black seas. *Applied and Environment Microbiology*, 74(24), 7546–7551. <https://doi.org/10.1128/AEM.01186-08>
  95. Guevara Campoverde N.C., Hassenrück C., Buttigieg P.L., Gärdes A. (2018). Characterization of bacterioplankton communities and quantification of organic carbon pools off the Galapagos Archipelago under contrasting environmental conditions. *PeerJ*. 2018 Dec 3;6:e5984. doi: 10.7717/peerj.5984. PMID: 30533298; PMCID: PMC6282939
  96. Gupta, S. K., Lal, D., Lata, P., Sangwan, N., Garg, N., Holliger, C., & Lal, R. (2013). Changes in the bacterial community and lin genes diversity during biostimulation of indigenous bacterial community of hexachlorocyclohexane (HCH) dumpsite soil. *Microbiology (Russian Federation)*. <https://doi.org/10.1134/S0026261713020185>
  97. Haas, S., Beer, D. de, Klatt, J. M., Fink, A., Rench, R. M. C., Hamilton, T. L., Meyer, V., Kakuk, B., & Macalady, J. L. (2018). Low-light anoxygenic photosynthesis and Fe-S-biogeochemistry in a microbial mat. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00858>

98. Habe, H., Omori, T., 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 225–243. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.225>
99. Haggerty, J. M., & Dinsdale, E. A. (2017). Distinct biogeographical patterns of marine bacterial taxonomy and functional genes. *Global Ecology and Biogeography*, 26(2), 177–190. <https://doi.org/10.1111/geb.12528>
100. Hamed, J., Kafshnouchi, M., & Ranjbaran, M. (2019). A Study on actinobacterial diversity of Hampoeil cave and screening of their biological activities. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.10.010>
101. Hannig, M., Lavik, G., Kuypers, M. M. M., Woebken, D., Martens-Habbena, W., & Jurgens, K. (2007). Shift from denitrification to anammox after inflow events in the central Baltic Sea. *Limnology and Oceanography*, 52(4), 1336–1345. <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.4.1336>
102. Harhangi, H. R., Le Roy, M., van Alen, T., Hu, B. Ian, Groen, J., Kartal, B., Tringe, S. G., Quan, Z. X., Jetten, M. S. M., & Op den Camp, H. J. M. (2012). Hydrazine synthase, a unique phylomarker with which to study the presence and biodiversity of anammox bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.07113-11>
103. Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. In *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
104. Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E. T., & Schwartz, T. (2017). Occurrence of the mcr-1 colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01282>
105. Holliger, C., Hahn, D., Harmsen, H., Ludwig, W., Schumacher, W., Tindall, B., Vazquez, F., Weiss, N., & Zehnder, A. J. B. (1998). *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and

- trichloroethene in an anaerobic respiration. *Archives of Microbiology*.  
<https://doi.org/10.1007/s002030050577>
106. Holliger, C., Wohlfarth, G., & Diekert, G. (1998). Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. In *FEMS Microbiology Reviews*.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(98\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(98)00030-8)
  107. Horak, R. E. A., Qin, W., Bertagnolli, A. D., Nelson, A., Heal, K. R., Han, H., Heller, M., Schauer, A. J., Jeffrey, W. H., Armbrust, E. V., Moffett, J. W., Ingalls, A. E., Stahl, D. A., & Devol, A. H. (2018). Relative impacts of light, temperature, and reactive oxygen on thaumarchaeal ammonia oxidation in the North Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography*. <https://doi.org/10.1002/lno.10665>
  108. Hsieh, S. E. (2000). Antimicrobial susceptibility and species identification for clinical isolates of enterococci. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*
  109. Huang, Y., Xiao, L., Li, F., Xiao, M., Lin, D., Long, X., & Wu, Z. (2018). Microbial degradation of pesticide residues and an emphasis on the degradation of cypermethrin and 3-phenoxy benzoic acid: A review. In *Molecules*.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23092313>
  110. Isaac, P., Lozada, M., Dionisi, H.M., Est'évez, M.C., Ferrero, M.A., 2015. Differential expression of the catabolic nahAc gene and its effect on PAH degradation in *Pseudomonas* strains isolated from contaminated Patagonian coasts. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 105, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.08.011>
  111. Jensen, M. M., Kuypers, M. M. M., Lavik, G., & Thamdrup, B. (2008). Rates and regulation of anaerobic ammonium oxidation and denitrification in the Black Sea. *Limnology and Oceanography*. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.1.0023>
  112. Jørgensen, B. B. (1982). Mineralization of organic matter in the sea bed - The role of sulphate reduction. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/296643a0>
  113. Jørgensen, B. B., Findlay, A. J., & Pellerin, A. (2019). The biogeochemical sulfur cycle of marine sediments. *Frontiers in Microbiology*, 10, 849.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00849>
  114. Kalaitzidou, M. P., Alvanou, M. V., Papageorgiou, K. V., Lattos, A., Sofia, M., Kritas, S. K., Petridou, E., & Giantsis, I. A. (2022). Pollution Indicators and HAB-

- Associated Halophilic Bacteria Alongside Harmful Cyanobacteria in the Largest Mussel Cultivation Area in Greece. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph19095285>
115. Kappler, U., Davenport, K., Beatson, S., Lapidus, A., Pan, C., Han, C., Montero-Calasanz, M. D. C., Land, M., Hauser, L., Rohde, M., Göker, M., Ivanova, N., Woyke, T., Klenk, H.-P., & Kyrpides, N. C. (2016). Complete genome sequence of the haloalkaliphilic, obligately chemolithoautotrophic thiosulfate and sulfide-oxidizing  $\gamma$ -proteobacterium *Thioalkalimicrobium cyclicum* type strain ALM 1 (DSM 14477T). *Standards in Genomic Sciences*, 11, 38. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0162-x>
  116. Karkman, A., Pärnänen, K., & Larsson, D. G. J. (2019). Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07992-3>
  117. Karl, D. M., & Knauer, G. A. (1991). Microbial production and particle flux in the upper 350 m of the Black Sea. *Deep-Sea Research, Part A*. [https://doi.org/10.1016/s0198-0149\(10\)80017-2](https://doi.org/10.1016/s0198-0149(10)80017-2)
  118. Kempf, I., Jouy, E., & Chauvin, C. (2016). Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016>
  119. Khan, F. A., Söderquist, B., & Jass, J. (2019). Prevalence and diversity of antibiotic resistance genes in Swedish aquatic environments impacted by household and hospital wastewater. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00688>
  120. Kim, A. V., Buzoleva, L. S., Bogatyrenko, E. A., Zemskaya, T. I., & Mamaeva, E. V. (2018). Monitoring of oil hydrocarbons pollution in the Sea of Japan, based on detection of marker genes in microbial communities. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/107/1/012061>
  121. Kim, S. J., Kweon, O., Jones, R. C., Freeman, J. P., Edmondson, R. D., & Cerniglia, C. E. (2007). Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.01310-06>

122. Kimes, N. E., Callaghan, A. V., Suflita, J. M., & Morris, P. J. (2014). Microbial transformation of the deepwater horizon oil spill-past, present, and future perspectives. In *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00603>
123. Kirkpatrick, J. B., Fuchsman, C. A., Yakushev, E. V., Egorov, A. V., Staley, J. T., & Murray, J. W. (2019). Dark N<sub>2</sub> Fixation: NifH expression in the redoxcline of the Black Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 82(1), 43–58. <https://doi.org/10.3354/ame0188>
124. Kirkpatrick, J. B., Fuchsman, C. A., Yakushev, E., Staley, J. T., & Murray, J. W. (2012). Concurrent activity of anammox and denitrifying bacteria in the Black sea. *Frontiers in Microbiology*, 3, 256. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00256>
125. Kirkpatrick, J., Oakley, B., Fuchsman, C., Srinivasan, S., Staley, J. T., & Murray, J. W. (2006). Diversity and distribution of Planctomycetes and related bacteria in the suboxic zone of the Black Sea. *Applied and Environment Microbiology*, 72(4), 3079–3083. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.3079-3083.2006>
126. Kittinger, C., Lipp, M., Baumert, R., Folli, B., Koraimann, G., Toplitsch, D., Liebmann, A., Grisold, A. J., Farnleitner, A. H., Kirschner, A., & Zarfel, G. (2016). Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from the river Danube. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00586>
127. Kittinger, C., Lipp, M., Folli, B., Kirschner, A., Baumert, R., Galler, H., Grisold, A. J., Luxner, J., Weissenbacher, M., Farnleitner, A. H., & Zarfel, G. (2016). Enterobacteriaceae isolated from the River danube: Antibiotic resistances, with a focus on the presence of ESBL and carbapenemases. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165820>
128. Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
129. Kmuníček, J., Hynková, K., Jedlicka, T., Nagata, Y., Negri, A., Gago, F., Wade, R. C., & Damborský, J. (2005). Quantitative analysis of substrate specificity of haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi047912o>

130. Kostka, J. E., Teske, A. P., Joye, S. B., & Head, I. M. (2014). The metabolic pathways and environmental controls of hydrocarbon biodegradation in marine ecosystems. In *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00471>
131. Kovalova, N. V., Medinets, V. I., Medinets, S. V. (2020). Specific features of long-term variations of bacterioplankton number in the Dniester estuary. *Hydrobiological journal*, 56 (5), 28-37. <http://jnas.nbuu.gov.ua/article/UJRN-0001202599> [In Ukrainian]
132. Kovalova, N., Medinets, V., Medinets, S., Cherkez, E., Kozlova, T., & Soltys, I. (2021). Results of Long-Term Bacterioplankton Monitoring in the Northwestern Black Sea. *15th International Conference Monitoring of Geological Processes and Ecological Condition of the Environment, Monitoring 2021*. <https://doi.org/10.3997/2214-4609.20215K2035>
- 133.
134. Kraft, B., Tegetmeyer, H. E., Sharma, R., Klotz, M. G., Ferdelman, T. G., Hettich, R. L., Geelhoed, J. S., & Strous, M. (2014). The environmental controls that govern the end product of bacterial nitrate respiration. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1254070>
135. Krüger, K., Chafee, M., Ben Francis, T., Glavina del Rio, T., Becher, D., Schweder, T., Amann, R. I., & Teeling, H. (2019). In marine Bacteroidetes the bulk of glycan degradation during algae blooms is mediated by few clades using a restricted set of genes. *ISME Journal*, 13(11), 2800–2816. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0476-y>
136. Krumholz, L. R. (1997). *Desulfuromonas chloroethenica* sp. nov. uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors. *International Journal of Systematic Bacteriology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1262>
137. Kuypers, M. M. M., Sliekers, A. O., Lavik, G., Schmid, M., Jørgensen, B. B., Kuenen, J. G., Sinninghe Damsté, J. S., Strous, M., & Jetten, M. S. M. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 422(6932), 608–611. <https://doi.org/10.1038/nature01472>
138. Kweon, O., Kim, S. J., Baek, S., Chae, J. C., Adjei, M. D., Baek, D. H., Kim, Y. C., & Cerniglia, C. E. (2008). A new classification system for bacterial Rieske non-heme

- iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC Biochemistry*.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-11>
139. Lachmayr, K. L., Cavanaugh, C. M., Kerkhof, L. J., DiRienzo, A. G., & Ford, T. E. (2009). Quantifying nonspecific tem  $\beta$ -lactamase (blatem) genes in a wastewater stream. *Applied and Environmental Microbiology*.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01254-08>
  140. Lal, D., Jindal, S., Kumari, H., Jit, S., Nigam, A., Sharma, P., Kumari, K., & Lal, R. (2015). Bacterial diversity and real-time PCR based assessment of linA and linB gene distribution at hexachlorocyclohexane contaminated sites. *Journal of Basic Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300211>
  141. Lal, R., Pandey, G., Sharma, P., Kumari, K., Malhotra, S., Pandey, R., Raina, V., Kohler, H.-P. E., Holliger, C., Jackson, C., & Oakeshott, J. G. (2010). Biochemistry of Microbial Degradation of Hexachlorocyclohexane and Prospects for Bioremediation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00029-09>
  142. Lam, P., Jensen, M. M., Lavik, G., McGinnis, D. F., Müller, B., Schubert, C. J., Amann, R., Thamdrup, B., & Kuypers, M. M. M. (2007). Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0611081104>
  143. Landa, M., Blain, S., Christaki, U., Monchy, S., & Obernosterer, I. (2016). Shifts in bacterial community composition associated with increased carbon cycling in a mosaic of phytoplankton blooms. *ISME Journal*, 10(1), 39–50.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2015.105>
  144. Lanzén, A., Mendibil, I., Borja, Á., & Alonso-Sáez, L. (2021). A microbial mandala for environmental monitoring: Predicting multiple impacts on estuarine prokaryote communities of the Bay of Biscay. *Molecular Ecology*.  
<https://doi.org/10.1111/mec.15489>
  145. Laquittaine, L., Durimel, A., de Alencastro, L. F., Jean-Marius, C., Gros, O., & Gaspard, S. (2016). Biodegradability of HCH in agricultural soils from Guadeloupe

- (French West Indies): identification of the lin genes involved in the HCH degradation pathway. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5875-7>
146. Laroche, O., Pochon, X., Tremblay, L. A., Ellis, J. I., Lear, G., & Wood, S. A. (2018). Incorporating molecular-based functional and co-occurrence network properties into benthic marine impact assessments. *FEMS Microbiology Ecology*, 94, 167. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy167>
  147. Lau, K. E. M., Washington, V. J., Fan, V., Neale, M. W., Lear, G., Curran, J., & Lewis, G. D. (2015). A novel bacterial community index to assess stream ecological health. *Freshwater Biology*. <https://doi.org/10.1111/fwb.12625>
  148. Laura, M., Snchez-Salinas, E., Dantn Gonzlez, E., & Luisa, M. (2013). Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process. In *Biodegradation - Life of Science*. <https://doi.org/10.5772/56098>
  149. Lavik, G., Stührmann, T., Brüchert, V., Van Der Plas, A., Mohrholz, V., Lam, P., Mußmann, M., Fuchs, B. M., Amann, R., Lass, U., & Kuypers, M. M. M. (2009). Detoxification of sulphidic African shelf waters by blooming chemolithotrophs. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature07588>
  150. Layton, B. A., Cao, Y., Ebentier, D. L., Hanley, K., Ballesté, E., Brandão, J., Byappanahalli, M., Converse, R., Farnleitner, A. H., Gentry-Shields, J., Gidley, M. L., Gourmelon, M., Lee, C. S., Lee, J., Lozach, S., Madi, T., Meijer, W. G., Noble, R., Peed, L., ... Griffith, J. F. (2013). Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.060>
  151. Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J., Courvalin, P. (1988). Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* 319,157-161
  152. Leys, N. M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Wattiau, P., Top, E. M., Verstraete, W., & Springael, D. (2005). Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.09.015>



153. Lin, X., Wakeham, S. G., Putnam, I. F., Astor, Y. M., Scranton, M. I., Chistoserdov, A. Y., & Taylor, G. T. (2006). Comparison of vertical distributions of prokaryotic assemblages in the anoxic Cariaco basin and Black Sea by use of fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2679–2690. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2679-2690.2006>
154. Lincy, J., & Manohar, C. S. (2020). A comparison of bacterial communities from OMZ sediments in the Arabian Sea and the Bay of Bengal reveals major differences in nitrogen turnover and carbon recycling potential. *Marine Biology Research*. <https://doi.org/10.1080/17451000.2020.1840593>
155. Liu, Q., Tang, J., Bai, Z., Hecker, M., & Giesy, J. P. (2015). Distribution of petroleum degrading genes and factor analysis of petroleum contaminated soil from the Dagang Oilfield, China. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep11068>
156. Liu, Y., Debeljak, P., Rembauville, M., Blain, S., & Obernosterer, I. (2019). Diatoms shape the biogeography of heterotrophic prokaryotes in early spring in the Southern Ocean. *Environmental Microbiology*, 21(4), 1452–1465. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14579>
157. Loredana S., Graziano P., Antonio M., Marzano Carlotta N., Caterina L., Antonella Maria A., Carlo Z., Giuseppe C., Pietro A. 2017. Lindane Bioremediation Capability of Bacteria Associated with the Demosponge *Hymeniacidon perlevis*. - *Marine Drugs*. - 15(4):108; <https://doi.org/10.3390/md15040108>
158. Louvado, A., Gomes, N.C.M., Simões, M.M.Q., Almeida, A., Cleary, D.F.R., Cunha, A., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons in deep sea sediments: microbe-pollutant interactions in a remote environment. *Sci. Total Environ.* 526, 312–328. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.048>
159. Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
160. Lu, J., Zhang, Y., Wu, J., Wang, J., Zhang, C., & Lin, Y. (2019). Occurrence and spatial distribution of antibiotic resistance genes in the Bohai Sea and Yellow Sea areas, China. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.143>

161. Ma, J., Xu, L., & Jia, L. (2012). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. JM2 isolated from active sewage sludge of chemical plant. *Journal of Environmental Sciences (China)*. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)61064-4](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)61064-4)
162. Madigan, M., Cox, S. S., & Stegeman, R. A. (1984). Nitrogen fixation and nitrogenase activities in members of the family Rhodospirillaceae. *Journal of Bacteriology*, 157(1), 73–78. <https://doi.org/10.1128/jb.157.1.73-78.1984>
163. Mahro, B., Müller, R., & Kasche, V. (2001). Bioavailability — the Key Factor of Soil Bioremediation. In *Treatment of Contaminated Soil*. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-04643-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-662-04643-2_13)
164. Manske, A. K., Glaeser, J., Kuypers, M. M. M., & Overmann, Jörg (2005). Physiology and phylogeny of green sulfur bacteria forming a monospecific phototrophic assemblage at a depth of 100 meters in the Black Sea. *Applied and Environment Microbiology*, 71(12), 8049–8060. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8049-8060.2005>
165. Marschall, E., Jogler, M., Henßge, U., & Overmann, J. (2010). Large-scale distribution and activity patterns of an extremely low-light-adapted population of green sulfur bacteria in the Black Sea. *Environmental Microbiology*, 12(5), 1348–1362. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02178.x>
166. Martinez J.L., Fajardo A., Garmendia L., Hernandez A., Linares J.F., Martínez-Solano L., Sánchez M.B. (2009) A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 33(1):44-65. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00142.x
167. Master, E. R., & Mohn, W. W. (2001). Induction of bphA, Encoding Biphenyl Dioxygenase, in Two Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacteria, Psychrotolerant *Pseudomonas* Strain Cam-1 and Mesophilic *Burkholderia* Strain LB400. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2669-2676.2001>
168. Matturro, B., Ubaldi, C., & Rossetti, S. (2016). Microbiome dynamics of a polychlorobiphenyl (PCB) historically contaminated marine sediment under conditions promoting reductive dechlorination. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01502>

169. Matyashova, N. O., and Iakovlieva, L. V. (2015). Analysis of consumption of macrolides in Ukraine. *Klin. Farm.* 19 (2), 19–22.  
<https://doi.org/10.24959/cphj.15.1338>
170. Maymó-Gatell, X., Anguish, T., & Zinder, S. H. (1999). Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by “*Dehalococcoides ethenogenes*” 195. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.65.7.3108-3113.1999>
171. Meckenstock, R. U., & Mouttaki, H. (2011). Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. In *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.009>
172. Meckenstock, R.U., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J.S., Cunha Tarouco, P., Weyrauch, P., Dong, X., Himmelberg, A.M., 2016. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Microb. Physiol.* 26, 92–118.  
<https://doi.org/10.1159/000441358>
173. Mee, L.D. and Topping, G., eds. (1999). *Black Sea Pollution Assessment*. Black Sea Environmental Series, Vol. 10. UNDP, United Nations Publications, New York, U.S.
174. Merkel, A. Y., Korneeva, V. A., Tarnovetskii, I. Y., Bryukhanov, A. L., Chasovnikov, V. K., Taranov, E. A., Toshchakov, S. V., & Pimenov, N. V. (2015). Structure of the archaeal community in the Black Sea photic zone. *Microbiology (Russian Federation)*. <https://doi.org/10.1134/S0026261715040128>
175. Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K. et al. (2002). Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science*, 297, 1013–1015.  
<https://doi.org/10.1126/science.1072502>
176. Mieszkin, S., Furet, J. P., Corthier, G., & Gourmelon, M. (2009). Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two Pig-Specific Bacteroidales 16S rRNA genetic markers. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-08>
177. Mikaelyan, A.S., Silkin, V.A. & Pautova, L.A. (2011). Coccolithophorids in the Black Sea: Their interannual and long-term changes. *Oceanology* 51, 39–48.  
<https://doi.org/10.1134/S0001437011010127>

178. Misson, B., Garnier, C., Lauga, B., Dang, D. H., Ghiglione, J. F., Mullot, J. U., Duran, R., & Pringault, O. (2016). Chemical multi-contamination drives benthic prokaryotic diversity in the anthropized Toulon Bay. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.038>
179. Mizuno, C. M., Rodriguez-Valera, F., & Ghai, R. (2015). Genomes of planktonic acidimicrobiales: Widening horizons for marine actinobacteria by metagenomics. *MBio*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.02083-14>
180. Morris, R. M., Frazar, C. D., & Carlson, C. A. (2012). Basin-scale patterns in the abundance of SAR11 subclades, marine Actinobacteria (OM1), members of the Roseobacter clade and OCS116 in the South Atlantic. *Environmental Microbiology*, 14(5), 1133–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02694.x>
181. Mu, D. S., Ouyang, Y., Chen, GJ. et al. Strategies for culturing active/dormant marine microbes. *Mar Life Sci Technol* 3, 121–131 (2021). <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00053-z>
182. Muangchinda, C., Chavanich, S., Viyakarn, V., Watanabe, K., Imura, S., Vangnai, A. S., & Pinyakong, O. (2015). Abundance and diversity of functional genes involved in the degradation of aromatic hydrocarbons in Antarctic soils and sediments around Syowa Station. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3721-y>
183. Muxika, I., Borja, Á., & Bald, J. (2007). Using historical data, expert judgement and multivariate analysis in assessing reference conditions and benthic ecological status, according to the European Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.05.025>
184. Muyzer, G., & Stams, A. J. M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. In *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>
185. Mykhailenko, V., Safranov, T., & Adobovska, M. (2023). Biological wastewater treatment plants as sources of environmental pollution by persistent organic pollutants (on the example of Odesa industrial-and-urban agglomeration). *Visnyk of VN Karazin Kharkiv National University, series" Geology. Geography. Ecology"*, (58), 350-359.

186. Nagata Y., Prokop Z., Sato Y., Jerabek P., Kumar A., Ohtsubo Y., Tsuda M., Damborsky J. (2005). Degradation of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane by haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71: 2183–2185. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2183-2185.2005>
187. Nagata, Y., Kato, H., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. (2019). Lessons from the genomes of lindanedegrading sphingomonads. *Environ. Microbiol. Rep.* 11, 630–644. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12762>
188. Nation, R.L, Li J. (2009). Colistion in 21 st century. *Current opininon Infect Diseaases*, 22(6): 535-543
189. Nelson, C. E., Carlson, C. A., Ewart, C. S., & Halewood, E. R. (2014). Community differentiation and population enrichment of Sargasso Sea bacterioplankton in the euphotic zone of a mesoscale mode-water eddy. *Environmental Microbiology*, 16(3), 871–887. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12241>
190. Nwinyi, O. C., Ajayi, O. O., & Amund, O. O. (2016). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by two strains of *Pseudomonas*. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.026>
191. Oakley, B. B., Francis, C. A., Roberts, K. J., Fuchsman, C. A., Srinivasan, S., & Staley, J. T. (2007). Analysis of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) genes and cultivation reveal depauperate community of denitrifying bacteria in the Black Sea suboxic zone. *Environmental Microbiology*, 9(1), 118–130. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01121.x>
192. Oguz, T., & Merico, A. (2006). Factors controlling the summer *Emiliana huxleyi* bloom in the Black Sea: A modeling study. *Journal of Marine Systems*. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2005.08.002>
193. Olson, J. M. (1998). Chlorophyll organization and function in green photosynthetic bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 67(1), 61–75. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1998.tb05166.x>
194. Overmann, J., & Manske, A. K. (2006). ANOXYGENIC PHOTOTROPHIC BACTERIA IN THE BLACK SEA CHEMOCLINE. In *Past and Present Water Column Anoxia*. [https://doi.org/10.1007/1-4020-4297-3\\_20](https://doi.org/10.1007/1-4020-4297-3_20)

195. Ozkoc, H.B., Bakan, G. & Ariman, S. Distribution and bioaccumulation of organochlorine pesticides along the Black Sea coast. *Environ Geochem Health* 29, 59–68 (2007). <https://doi.org/10.1007/s10653-006-9064-y>
196. Pajares, S., & Ramos, R. (2019). Processes and Microorganisms Involved in the Marine Nitrogen Cycle: Knowledge and Gaps. In *Frontiers in Marine Science*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00739>
197. Pajares, S., Soto-Jiménez, M. F., & Merino-Ibarra, M. (2019). Molecular and isotopic evidence of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities in the oxygen minimum zone of the Tropical Mexican Pacific. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(10), fiz143. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz143>
198. Pavlovska, M., Prekrasna, I., Dykyi, E., Zotov, A., Dzhulai, A., Frolova, A., Slobodnik, J., & Stoica, E. (2021). Niche partitioning of bacterial communities along the stratified water column in the Black Sea. *MicrobiologyOpen*. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1195>
199. Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Beja, P., Boggero, A., Borja, A., Bouchez, A., Cordier, T., Domaizon, I., Feio, M. J., Filipe, A. F., Fornaroli, R., Graf, W., Herder, J., van der Hoorn, B., Iwan Jones, J., Sagova-Mareckova, M., Moritz, C., ... Kahlert, M. (2018). The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. In *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.002>
200. Payne, D.J., Gwynn, M.N., Holmes, D.J., et al. (2007). Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 6, 29–40
201. Peng, X., Fuchsman, C. A., Jayakumar, A. et al. (2016). Revisiting nitrification in the Eastern Tropical South Pacific: A focus on controls. *J Geophys Res Ocean*, 121, 1667–1684. <https://doi.org/10.1002/2015JC011455>
202. Périchon, B., Courvalin, P. (2000). Update on vancomycin resistance. *Int. J. Clin. Pract.* 54, 250-254

203. Pieper, D. H., & Seeger, M. (2008). Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. In *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1159/000121325>
204. Pieper, D. H., Martins Dos Santos, V. A. P., & Golyshin, P. N. (2004). Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants. In *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.03.008>
205. Prekrasna I., Pavlovska M., Dzhulai A., Dykyi E., Alygizakis N., Slobodnik J. (2022). Antibiotic Resistance in Black Sea Microbial Communities. *Front. Environ. Sci.* 10:823172. doi: 10.3389/fenvs.2022.823172
206. Prekrasna, I., Pavlovska, M., Oleinik, I., Dykyi, E., Slobodnik, J., Alygizakis, N., Solomenko, L., & Stoica, E. (2022). Bacterial communities of the Black Sea exhibit activity against persistent organic pollutants in the water column and sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113367>
207. Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., & Carlson, K. H. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es060413l>
208. R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
209. Rabus, R., Boll, M., Heider, J., Meckenstock, R. U., Buckel, W., Einsle, O., Ermler, U., Golding, B. T., Gunsalus, R. P., Kroneck, P. M. H., Krüger, M., Lueders, T., Martins, B. M., Musat, F., Richnow, H. H., Schink, B., Seifert, J., Szaleniec, M., Treude, T., ... Wilkes, H. (2016). Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: From enzymatic reactions to the environment. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1159/000443997>
210. Rabus, R., Hansen, T. A., Widdel, F. et al. (2006). Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes BT. In M. Dworkin, S. Falkow, & E. Rosenberg (Eds.), *The prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and biochemistry* (pp. 659–768). Springer

211. Radulescu V. Environmental Conditions and the Fish Stocks Situation in the Black Sea, between Climate Change, War, and Pollution. *Water*. 2023; 15(6):1012. <https://doi.org/10.3390/w15061012>
212. Readman, J. W., Fillmann, G., Tolosa, I., Bartocci, J., Villeneuve, J. P., Catinni, C., ... & Mee, L. D. (1999). The Black Sea: A comprehensive survey of contamination. *Black Sea pollution assessment*. UN Publ., New York, 171-252
213. Readman, J. W., Fillmann, G., Tolosa, I., Bartocci, J., Villeneuve, J. P., Catinni, C., & Mee, L. D. (2002). Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00189-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00189-8)
214. Reischer, G. H., Kasper, D. C., Steinborn, R., Mach, R. L., & Farnleitner, A. H. (2006). Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00364-06>
215. Reynolds P.E. (1989) Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 8(11):943-50. doi: 10.1007/BF01967563. PMID: 2532132
216. Rodríguez, J., Gallampois, C. M. J., Haglund, P., Timonen, S., & Rowe, O. (2021). Bacterial communities as indicators of environmental pollution by POPs in marine sediments. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115690>
217. Rodríguez-Gómez, C., Durán-Riveroll, L. M., Okolodkov, Y. B., Oliart-Ros, R. M., García-Casillas, A. M., & Cembella, A. D. (2021). Diversity of bacterioplankton and bacteriobenthos from the veracruz reef system, southwestern gulf of Mexico. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030619>
218. Röling, W. F. M., Van Breukelen, B. M., Bruggeman, F. J., & Westerhoff, H. V. (2007). Ecological control analysis: Being(s) in control of mass flux and metabolite concentrations in anaerobic degradation processes. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01167.x>
219. Rosato, A., Barone, M., Negroni, A., Brigidi, P., Fava, F., Xu, P., Candela, M., & Zanolli, G. (2020). Microbial colonization of different microplastic types and



- biotransformation of sorbed PCBs by a marine anaerobic bacterial community. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135790>
220. Roschanski, N., Fischer, J., Guerra, B., & Roesler, U. (2014). Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-type ampcs in enterobacteriaceae. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100956>
221. Sabatino, R., Cabello-Yeves, P. J., Eckert, E. M., Corno, G., Callieri, C., Brambilla, D., Dzhenbekova, N., Moncheva, S., & Di Cesare, A. (2022). Antibiotic resistance genes correlate with metal resistances and accumulate in the deep water layers of the Black Sea. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120033>
222. Sabatino, R., Di Cesare, A., Dzhenbekova, N., Fontaneto, D., Eckert, E. M., Corno, G., Moncheva, S., Bertoni, R., & Callieri, C. (2020). Spatial distribution of antibiotic and heavy metal resistance genes in the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111635>
223. Saez, J. M., Alvarez, A., Fuentes, M. S., Amoroso, M. J., & Benimeli, C. S. (2017). An overview on microbial degradation of lindane. *Environmental Science and Engineering (Subseries: Environmental Science)*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45156-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45156-5_9)
224. Sartoros, C., Yerushalmi, L., Béron, P., & Guiot, S. R. (2005). Effects of surfactant and temperature on biotransformation kinetics of anthracene and pyrene. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.061>
225. Scanlan, D. J., & West, N. J. (2002). Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 40(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00217-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00217-3)
226. Seeger, M., Hernández, M., Méndez, V., Ponce, B., Córdova, M., & Gonzalez, M. (2010). Bacterial degradation and bioremediation of chlorinated herbicides and biphenyls. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100007>
227. Seshadri, R., Adrian, L., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Phillippy, A. M., Methe, B. A., Ward, N. L., Nelson, W. C., Deboy, R. T., Khouri, H. M., Kolonay, J. F., Dodson, R.

- J., Daugherty, S. C., Brinkac, L. M., Sullivan, S. A., Madupu, R., Nelson, K. E., Kang, K. H., Impraim, M., ... Heidelberg, J. F. (2005). Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1102226>
228. Shamsavari, E., Aburto-Medina, A., Taha, M., & Ball, A. S. (2016). A quantitative PCR approach for quantification of functional genes involved in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils. *MethodsX*. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2016.02.005>
229. Shapleigh, J. P. (2009). Dissimilatory and Assimilatory Nitrate Reduction in the Purple Photosynthetic Bacteria. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5\\_31](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_31)
230. Sharma, P., Raina, V., Kumari, R., Malhotra, S., Dogra, C., Kumari, H., Kohler, H. P. E., Buser, H. R., Holliger, C., & Lal, R. (2006). Haloalkane dehalogenase LinB is responsible for  $\beta$ - and  $\delta$ -hexachlorocyclohexane transformation in *Sphingobium indicum* B90A. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00192-06>
231. Sheik, C. S., Jain, S., & Dick, G. J. (2014). Disentangling the ecophysiological role of SAR324. *Environmental Microbiology*, 16, 304–317. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12165>
232. Sherry, A., Gray, N. D., Ditchfield, A. K., Aitken, C. M., Jones, D. M., Röling, W. F. M., Hallmann, C., Larter, S. R., Bowler, B. F. J., & Head, I. M. (2013). Anaerobic biodegradation of crude oil under sulphate-reducing conditions leads to only modest enrichment of recognized sulphate-reducing taxa. *International Biodeterioration and Biodegradation*. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.04.009>
233. Shevchenko LV, Dobrozhan TV, Mykhalska VM, Osipova TY, Solomon VV (2019) Contamination of hen manure with nine antibiotics in poultry farms in Ukraine. *Regul Mech Biosyst* 10(4):532–537. <https://doi.org/10.15421/021978>
234. Shimkus, K. M., & Trimonis, E. S. (1974). Modern Sedimentation in Black Sea<sup>1</sup>. In E. T. Degens & D. A. Ross (Eds.), *The Black Sea—Geology, Chemistry, and Biology* (Vol. 20, p. 0). American Association of Petroleum Geologists. <https://doi.org/10.1306/M20377C23>

235. Siddiquee, S., Rovina, K., & Azad, S. Al. (2015). Heavy Metal Contaminants Removal from Wastewater Using the Potential Filamentous Fungi Biomass: A Review. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000243>
236. Slobodkina, G. B., Mardanov, A. V., Ravin, N. V., Frolova, A. A., Chernyh, N. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Slobodkin, A. I. (2017). Respiratory ammonification of nitrate coupled to anaerobic oxidation of elemental sulfur in deep-sea autotrophic thermophilic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8, 87. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00087>
237. Slobodnik, J., Alexandrov, B., Komorin, V., Mikaelyan, A., Guchmanidze, A., Arabidze, M., Korshenko, A. National Pilot Monitoring Studies and Joint Open Sea Surveys in Georgia, Russian Federation and Ukraine, 2017: Final Scientific Report / J. Slobodnik, B. Alexandrov, V. Komorin, A. Mikaelyan, A. Guchmanidze, M. Arabidze, A. Korshenko. – Dnipro: Seredniak T.K., 2020b
238. Slobodnik, J., Alexandrov, B., Komorin, V., Mikaelyan, A., Guchmanidze, A., Arabidze M., Korshenko, A., Moncheva S. National Pilot Monitoring Studies and Joint Open Sea Surveys in Georgia, Russian Federation and Ukraine, 2016: Final Scientific Report / J. Slobodnik, B. Alexandrov, V. Komorin, A. Mikaelyan, A. Guchmanidze, M. Arabidze, A. Korshenko, S. Moncheva. – Dnipro: Seredniak T.K., 2020a
239. Smith, J. M., Chavez, F. P., & Francis, C. A. (2014). Ammonium uptake by phytoplankton regulates nitrification in the sunlit ocean. *PLoS One*, 9(9), e108173. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108173>
240. Smith, J. N., Lee, K., Gobeil, C., & Macdonald, R. W. (2009). Natural rates of sediment containment of PAH, PCB and metal inventories in Sydney Harbour, Nova Scotia. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.05.029>
241. Song, J. H., Lee, N. Y., Ichiyama, S., Yoshida, R., Hirakata, Y., Fu, W., Chongthaleong, A., Aswapokee, N., Chiu, C. H., Lalitha, M. K., Thomas, K., Perera, J., Yee, T. T., Jamal, F., Warsa, U. C., Vinh, B. X., Jacobs, M. R., Appelbaum, P. C., & Pai, C. H. (1999). Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian

- countries: Asian network for surveillance of resistant pathogens (ANSORP) study. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1086/514783>
242. Song, M., Jiang, L., Zhang, D., Luo, C., Wang, Y., Yu, Z., Yin, H., & Zhang, G. (2016). Bacteria capable of degrading anthracene, phenanthrene, and fluoranthene as revealed by DNA based stable-isotope probing in a forest soil. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.009>
243. Sorokin, D. Y., Merkel, A. Y., & Muyzer, G. (2020). *Thiohalorhabdus*. In M. E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, & W. B. Whitman (Eds.), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria* (1–6). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01940>
244. Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., Jézéquel, R., Barantal, S., Cuny, P., Gilbert, F., Cagnon, C., Militon, C., Amouroux, D., Mahdaoui, F., Bouyssiére, B., Stora, G., Merlin, F. X., & Duran, R. (2013). Impact of Oil on Bacterial Community Structure in Bioturbated Sediments. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065347>
245. Stoeck, T., Frühe, L., Forster, D., Cordier, T., Martins, C. I. M., & Pawlowski, J. (2018). Environmental DNA metabarcoding of benthic bacterial communities indicates the benthic footprint of salmon aquaculture. *Marine Pollution Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.11.065>
246. Stoica, E., & Herndl, G. J. (2007). Bacterioplankton community composition in nearshore waters of the NW Black Sea during consecutive diatom and coccolithophorid blooms. *Aquatic Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00027-007-0885-2>
247. Suar, M., Van Der Meer, J. R., Lawlor, K., Holliger, C., & Lal, R. (2004). Dynamics of multiple *lin* gene expression in *Sphingomonas paucimobilis* B90A in response to different hexachlorocyclohexane isomers. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6650-6656.2004>
248. Sun, M.Y., Dafforn, K.A., Johnston, E.L., Brown, M.V., 2013. Core sediment bacteria drive community response to anthropogenic contamination over multiple environmental gradients. *Environ. Microbiol.* 15, 2517–2531
- Mee, L. D. (1992). The Black Sea in crisis: a need for concerted international action. *Ambio*. <https://doi.org/10.2307/4313943>

249. Sun, W., Xiao, T., Sun, M., Dong, Y., Ning, Z., Xiao, E., Tang, S., & Li, J. (2015). Diversity of the sediment microbial community in the aha watershed (Southwest China) in response to acid mine drainage pollution gradients. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00935-15>
250. Sun, X., Ji, Q., Jayakumar, A., & Ward, B. B. (2017). Dependence of nitrite oxidation on nitrite and oxygen in low-oxygen seawater. *Geophysical Research Letters*, 44, 7883–7891. <https://doi.org/10.1002/2017GL074355>
251. Suominen, S., Dombrowski, N., Sinninghe Damsté, J. S., & Villanueva, L. (2019). A diverse uncultivated microbial community is responsible for organic matter degradation in the Black Sea sulphidic zone. *Environmental Microbiology*, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14902>
252. Syrogiannopoulos, G. A., Grivea, I. N., Tait-Kamradt, A., Katopodis, G. D., Beratis, N. G., Sutcliffe, J., Appelbaum, P. C., & Davies, T. A. (2001). Identification of an erm(A) erythromycin resistance methylase gene in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.342-344.2001>
253. Thrash, J. C., Seitz, K. W., Baker, B. J., Temperton, B., Gillies, L. E., Rabalais, N. N., Henrissat, B., & Mason, O. U. (2017). Metabolic roles of uncultivated bacterioplankton lineages in the northern gulf of Mexico “dead zone”. *MBio*, 8(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01017-17>
254. Tiedje, J. M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Environmental Microbiology of Anaerobes*
255. Tripp, H. J., Kitner, J. B., Schwalbach, M. S., Dacey, J. W. H., Wilhelm, L. J., & Giovannoni, S. J. (2008). SAR11 marine bacteria require exogenous reduced sulphur for growth. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06776>
256. Tuncer, G., Karakas, T., Balkas, T. I., Gökçay, C. F., Aygnn, S., Yurteri, C., & Tuncel, G. (1998). Land-based sources of pollution along the Black Sea coast of Turkey: concentrations and annual loads to the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 36, 409.

257. Upadhyay, L. S. B., & Dutt, A. (2018). Microbial detoxification of residual organophosphate pesticides in agricultural practices. In *Microbial Biotechnology*. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6847-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6847-8_10)
258. Uttley, A. H. C., Collins, C. H. , Naidoo, J. , George, R. C. (1988). Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet I*, 57-58
259. Uyaguari, M. I., Fichot, E. B., Scott, G. I., & Norman, R. S. (2011). Characterization and quantitation of a novel  $\beta$ -lactamase gene found in a wastewater treatment facility and the surrounding coastal ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02732-10>
260. Van den Berg, E. M., Rombouts, J. L., Kuenen, J. G., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2017). Role of nitrite in the competition between denitrification and DNRA in a chemostat enrichment culture. *AMB Express*. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0398-x>
261. Verma, J. P., Jaiswal, D. K., & Sagar, R. (2014). Pesticide relevance and their microbial degradation: a-state-of-art. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9341-7>
262. Vetriani, C., Tran, H. V., & Kerkhof, L. J. (2003). Fingerprinting Microbial Assemblages from the Oxic/Anoxic Chemocline of the Black Sea. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6481-6488.2003>
263. Vila, J., Tauler, M., & Grifoll, M. (2015). Bacterial PAH degradation in marine and terrestrial habitats. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.01.006>
264. Vuillemin, A., Kerrigan, Z., D'Hondt, S., & Orsi, W. D. (2020). Chloroflexi persisting for millions of years in oxic and anoxic deep-sea clay. *BioRxiv*.
265. Wakeham, S. G., Lewis, C. M., Hopmans, E. C., Schouten, S., & Sinninghe Damsté, J. S. (2003). Archaea mediate anaerobic oxidation of methane in deep euxinic waters of the Black Sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)01220-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)01220-6)
266. Wang, B., Lai, Q., Cui, Z., Tan, T., & Shao, Z. (2008). A pyrene-degrading consortium from deep-sea sediment of the West Pacific and its key member

- Cycloclasticus sp. P1. Environmental Microbiology. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01611.x>
267. Water Framework Directive (Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy, Official Journal (OJ L 327) on 22 December 2000
268. West, N. J., Lepère, C., Manes, C.-L., Catala, P., Scanlan, D. J., & Lebaron, P. (2016). Distinct spatial patterns of SAR11, SAR86, and Actinobacteria diversity along a transect in the ultra-oligotrophic South Pacific Ocean. *Frontiers in Microbiology*, 7, 234. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00234>
269. Wiegel, J., & Wu, Q. (2000). Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiology Ecology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00014-3)
270. Williams, T. J., Wilkins, D., Long, E. et al. (2013). The role of planktonic Flavobacteria in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. *Environmental Microbiology*, 15(5), 1302–1317. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12017>
271. Wilson, B., Müller, O., Nordmann, E.-L., Seuthe, L., Bratbak, G., & Øvreås, L. (2017). Changes in marine prokaryote composition with season and depth over an Arctic polar year. *Frontiers in Marine Science*, 4, 95. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00095>
272. World Health Organization. (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/193736>
273. Wu, G., Kang, H., Zhang, X., Shao, H., Chu, L., & Ruan, C. (2010). A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. In *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.09.113>
274. Wu, P., Wang, Y. S., Sun, F. L., Wu, M. L., & Peng, Y. L. (2014). Bacterial polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenases in the sediments from the Pearl River estuary, China. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4854-5>

275. Xi, C., Zhang, Y., Marrs, C. F., Ye, W., Simon, C., Foxman, B., & Nriagu, J. (2009). Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00382-09>
276. Yakovlieva, L., and Bahlai, T. (2019). B-Lactam antibiotics in Ukraine: market and consumption analysis in 2013-2018. *ScienceRise: Pharm. Sci.* 2 (18), 16–21. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2019.165682>
277. Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y. 2006. *Anaerolinea thermolimosa* sp nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp nov and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., so. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes anaerolineae classis nov and Caldilineae classis nov in the bacterial phylum Chloroflexi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, pp. 1331-1340. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64169-0>
278. Yang, Y., Li, M., Li, H., Li, X. Y., Lin, J. G., Denecke, M., & Gu, J. D. (2020). Specific and effective detection of anammox bacteria using PCR primers targeting the 16S rRNA gene and functional genes. *Science of the Total Environment*, 734, 139387. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139387>
279. Yang, Y., Li, Z., Song, W., Du, L., Ye, C., Zhao, B., Liu, W., Deng, D., Pan, Y., Lin, H., & Cao, X. (2019). Metagenomic insights into the abundance and composition of resistance genes in aquatic environments: Influence of stratification and geography. *Environment International*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.062>
280. Yoshida, N., Ye, L., Baba, D., & Katayama, A. (2009). Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls and Dibenzo-p-Dioxins in an enrichment culture containing *Dehalobacter* species. *Microbes and Environments*. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09132>
281. Zeng, J., Zhu, Q., Wu, Y., Chen, H., & Lin, X. (2017). Characterization of a polycyclic aromatic ring-hydroxylation dioxygenase from *Mycobacterium* sp. NJS-P. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.001>



282. Zenkevich, L. A., & Brotskaya, B. A. (1937). Materials in the ecology of the leading forms of benthos of Barents Sea. Scientific Notes of the Moscow State University. Zoology, 13(3), 203–225
283. Zhang, J., Shi, J., Gao, S., Huo, Y., Cui, J., Shen, H., Liu, G., & He, P. (2019). Annual patterns of macroalgal blooms in the Yellow Sea during 2007–2017. PLoS One, 14(1), 2007–2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210460>
284. Zhang, Y., Chen, L., Sun, R., Dai, T., Tian, J., Liu, R., et al., 2014. Effect of wastewater disposal on the bacterial and archaeal community of sea sediment in an industrial area in China. FEMS Microbiol. Ecol. 88 (2):320–332. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12298>
285. Zheng, D., Yin, G., Liu, M., Chen, C., Jiang, Y., Hou, L., & Zheng, Y. (2021). A systematic review of antibiotics and antibiotic resistance genes in estuarine and coastal environments. In Science of the Total Environment. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146009>
286. Zhu, X., Liu, C., Gao, S., Lu, Y., Chen, Z., & Sun, Z. (2015). Vancomycin intermediate-Resistant Staphylococcus aureus (VISA) Isolated from a patient who never received Vancomycin treatment. International Journal of Infectious Diseases. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.12.038>
287. Прекрасна, Є. П. Стійкість мікроорганізмів природних екосистем до репрезентативних токсичних металів [Текст] : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.07 / Прекрасна Євгенія Петрівна ; НАН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного. - Київ, 2016. - 22 с. : рис.

## ДОДАТКИ

## Додаток 1

**Координати та глибина станцій відбору матеріалу  
під час дослідницького рейсу в травні-червні 2016 року**

Станція	Широта, °N	Довгота, °E	Глибина, м	Станція	Широта, °N	Довгота, °E	Глибина, м
<b>1</b>	43°45,227'	31°42,629'	1702	<b>13</b>	43°31,558'	36°04,183'	2100
<b>2</b>	43°33,222'	31°44,939'	1853	<b>14</b>	43°32,982'	35°35,274'	2157
<b>3</b>	43°22,049'	31°49,994'	1933	<b>15</b>	43°26,192'	34°55,535'	2169
<b>4</b>	43°21,942'	32°34,388'	2032	<b>16</b>	43°20,674'	34°21,792'	2170
<b>5</b>	42°10,624'	40°06,815'	1855	<b>17</b>	43°18,191'	34°02,408'	2159
<b>6</b>	42°05,966'	40°20,649'	2040	<b>18</b>	43°20,587'	33°28,306'	2173
<b>7</b>	42°01,032'	40°34,719'	1672	<b>19</b>	43°25,042'	32°51,659'	2106
<b>8</b>	41°55,966'	40°49,516'	1553	<b>20</b>	43°57,714'	31°39,724'	1428
<b>9</b>	41°49,952'	41°01,713'	1266	<b>21</b>	44°09,492'	31°34,047'	1120
<b>10</b>	41°47,047'	41°12,814'	1013	<b>22</b>	44°24,061'	31°28,005'	974
<b>11</b>	41°42,246'	41°24,321'	473	<b>23</b>	44°38,163'	31°23,298'	391
<b>12</b>	42°14,070'	39°53,161'	1909	<b>24</b>	44°49,861'	31°19,862'	65
				<b>25</b>	45°03,086'	31°09,735'	60

**Додаток 2**  
**Координати та глибина станцій відбору матеріалу**  
**під час дослідницького рейсу в серпні-вересні 2017 року**

Станція	Широта, °N	Довгота, °E	Глибина, м	Опис
1В	45°09'	29° 49'	23	Дельта Дунаю
1А	45° 12'	29° 49'	22	Дельта Дунаю
1Б	46°12'	30° 49,9'	23	Дельта Дністра
1	46°23'	31° 01'	25	ПЗЧМ
2	45°13'	31° 14'	53	ПЗЧМ
3	44°51'	31° 20'	62	Відкриті води
4	44°06'	31° 34'	1165	Відкриті води
5	43°24'	31° 50'	1919	Відкриті води
6	43°25'	32° 52'	2088	Відкриті води
7	43°22'	34° 46'	2150	Відкриті води
8	43°32'	36° 04'	2131	Відкриті води
9	42°14'	39°53'	1905	Відкриті води
10	42°06'	40°20'	1795	Відкриті води
11	41°56'	40°50'	1543	Відкриті води
12	41°47'	41°13'	1130	Відкриті води
1С	45°20'	29° 50'	21	Дельта Дунаю

**Додаток 3**  
**Координати та глибина станцій відбору матеріалу**  
**під час дослідницького рейсу в липні-серпні 2019 року**

Станція	Широта, °N	Довгота, °E	Глибина, м	Опис
1	46° 26'	31° 01'	20	Дельта Дунаю
2	45° 13'	31° 14'	50	ПЗЧМ
3	44° 51'	31° 18'	70	Відкриті води
4	44° 07'	31° 34'	>1000	Відкриті води
5	43° 22'	31° 50'	>1000	Відкриті води
6	43° 25'	32° 52'	>1000	Відкриті води
7	43° 22'	34° 46'	>1000	Відкриті води
8	43° 32'	36° 04'	>1000	Відкриті води
9	42° 14'	39° 53'	>1000	Відкриті води
10	42° 06'	40° 20'	>1000	Відкриті води
11	41° 56'	40° 50'	>1000	Відкриті води
12	41° 47'	41° 13'	>1000	Відкриті води

## Додаток 4

### Відбір клітин прокаріотів з морської води для подальшого молекулярно-генетичного аналізу

Необхідне обладнання:

Перистальтичний насос (Masterflex Easy-Load Peristaltic Pump (Millipore))

Фільтри з розміром пор 0.22 мкм (Millipore Sterivex filter unit 0.22  $\mu\text{m}$ )

Пластикові каністри на 5 л та на 2.5 л

Стерильні шприци на 50 мл з приєднувальним конусом Луер-лок

Стерильний пластиковий контейнер

Латексні/нітрилові рукавички

0,1% розчин HCl

Дистильована H<sub>2</sub>O

Розчин для стерилізації поверхонь RNase-Away

Плівка Parafilm

Пробірки Falcon tube на 50 мл

Стерильні шприци на 2.5 мл

Буферний розчин для збереження ДНК/РНК RNA later

NB! Під час відбору та обробки зразків необхідно одягати рукавички. Рукавички потрібно змінювати щоразу перед кожним наступним зразком. Всі поверхні потрібно регулярно (між зразками) обробляти розчином RNase-Away.

1. Відібрати зразок морської води у 5л батометр. Глибини, на яких здійснюється відбір, визначаються за даними CTD зонда. Перелити зразок з батометра до попередньо промаркованої стерильної каністри на 5л. Використовуйте стерильні трубки та промийте каністру невеликою кількістю води зі зразка перш ніж переливати зразок повністю.

2. Розділіть 5-літровий зразок на 2 зразки по 2.5 л, які будуть використані як реплікати (повтори).

3. Каністри на 5 л та на 2.5 л, які використовуються для відбору та зберігання зразків, необхідно промивати 0,1N розчином HCl та дистильованою водою перед кожним наступним зразком.

4. Перед початком фільтрації потрібно промити трубки помпи 0,1N розчином HCl та дистильованою водою.

5. Поставити 2.5-літрову каністру до стерильного пластикового контейнеру.

6. Вставити один із кінців трубки насоса до каністри зі зразком, прикрити отвір каністри фольгою, увімкнути помпу та пропустити ~100 мл води зі зразка через трубку.

6. Вимкнути насос та приєднати до іншого кінця трубки фільтр Sterivex, після чого опустити трубку з фільтром до іншої стерильної каністри (промитої 0.1N розчином HCl та дистильованою водою) для збору фільтрату. Увімкніть насос та пропустіть воду зі зразку крізь фільтр на швидкості 1. Під час фільтрації слідкуйте, щоб капсула із фільтром не торкалась фільтрату у каністрі.

7. Після завершення фільтрації 2.5 л зразку вимкніть насос та зніміть фільтр.

8. Витисніть залишки води з капсули фільтра шляхом проштовхування повітря крізь капсулу 50 мл шприцом Луер-лок.

9. Загорніть отвори капсули плівкою Parafilm.

10. Підпишіть капсулу (дата, номер станції. номер зразку) та зберігайте у промаркованому 50 мл Falcon tube за температури -80C.

У разі відсутності можливості збереження за температури -80C:

1. Витисніть залишки води з капсули фільтра шляхом проштовхування повітря крізь капсулу 50 мл шприцом Луер-лок.

2. Загорніть отвір капсули плівкою Parafilm. Залийте 2.5 мл розчину RNA later до капсули через незагорнутий отвір з адаптером Луер-лок за допомогою стерильного шприца на 2.5 мл.

3. Підпишіть капсулу (дата, номер станції. номер зразку) та зберігайте у промаркованій пробірці на 50 мл за температури +4C протягом 24 годин, після чого перенесіть зразок до морозильної камери для тривалого зберігання за температури -20C.

## Додаток 5

### Відбір клітин прокаріот з донних відкладів

Необхідне обладнання:

Стерильні шприци на 5 мл

Латексні/нітрилові рукавички

Плівка Parafilm

Зразки донних відкладів для подальшої екстракції ДНК та РНК відбирають із непорушеної колонки мультикорера.

Відібрати один зразок із верхніх 5 см колонки мультикорера.

Для відбору зразків використовувати стерильні шприци на 5мл із відрізними носиками.

Загорнути шприц у парафільм.

Підписати шприц відповідним чином.

Зберігати за температури -80С до моменту екстракції ДНК.



### Додаток 6

#### Термічні умови реакції ампліфікації гену *brh* (біфеніл-2,3-диоксигенази)

Етап	Температура, °C	Час, сек	К-ть циклів
Початкова денатурація	95	600	35
Денатурація	95	60	
Віджиг	57	60	
Елонгація	72	120	
Фінальна елонгація	72	600	

**Крива плавлення:** 95°C = 1хв -> 52°C (+0,2°C/сек) -> 95°C

#### Термічні умови реакції ампліфікації гену *Nah* (нафталендиоксигенази)

Етап	Температура, °C	Час, сек	К-ть циклів
Початкова денатурація	95	600	30
Денатурація	95	60	
Віджиг	47	60	
Елонгація	72	120	
Фінальна елонгація	72	600	

**Крива плавлення:** 95°C = 1хв -> 45°C (+0,2°C/сек) -> 95°C

**Термічні умови реакції ампліфікації генів LinA/LinB  
(дехлоринази/ галідогідролаза)**

Етап	Температура, °C	Час, сек	К-ть циклів
Початкова денатурація	95	600	
Денатурація	95	15	45
Віджиг	60	60	
Елонгація	72	120	
Фінальна елонгація	72	600	

**Крива плавлення:** 95°C = 1хв -> 58°C (+0,2°C/сек) -> 95°C

**Термічні умови реакції ампліфікації генів RhD-  
(гідроксилювання кільця ПАВ - грам-негативні бактерії)**

Етап	Температура, °C	Час, сек	К-ть циклів
Початкова денатурація	95	300	
Денатурація	95	10	40
Віджиг	57	30	
Елонгація	72	30	
Фіксація сигналу	80	10	
Фінальна елонгація	72	600	

**Крива плавлення:** 95°C = 1хв -> 55°C (+0,2°C/сек) -> 95°C

**Термічні умови реакції ампліфікації генів RhD+  
(гідроксилювання кільця ПАВ - грам-позитивні бактерії)**

Етап	Температура, °C	Час, сек	К-ть циклів
Початкова денатурація	95	300	
Денатурація	95	10	40
Віджиг	54	30	
Елонгація	72	30	
Фіксація сигналу	80	10	
Фінальна елонгація	72	600	

**Крива плавлення:** 95°C = 1хв -> 52°C (+0,2°C/сек) -> 95°C

## Додаток 7

**Термічні умови реакції ампліфікації генів *blaTEM* та *blaSHV*  
( $\beta$ -лактамази)**

Етап	Температура, °C	Час, сек	К-ть циклів
Початкова денатурація	95	900	
Денатурація	95	15	40
Віджиг	50	15	
Елонгація	70	20	
Фінальна елонгація	70	600	

**Крива плавлення:** 95°C = 1хв -> 48°C (+0,2°C/сек) -> 95°C

**Термічні умови реакції ампліфікації гену *erm(B)* (*erm(B)* метилаза)**

Етап	Температура, °C	Час, сек	К-ть циклів
Початкова денатурація	95	180	
Денатурація	95	15	40
Віджиг	58	20	
Елонгація	72	20	
Фінальна елонгація	72	600	

**Крива плавлення:** 95°C = 1хв -> 56°C (+0,2°C/сек) -> 95°C

**Термічні умови реакції ампліфікації генів *VanA/VanB*  
(д-аланін-(р)-лактат лігаза)**

Етап	Температура, °C	Час, сек	К-ть циклів
Початкова денатурація	95	180	
Денатурація	95	15	35
Віджиг	60	15	
Елонгація	72	60	
Фінальна елонгація	72	600	

**Крива плавлення:** 95°C = 1хв -> 58°C (+0,2°C/сек) -> 95°C

**Термічні умови реакції ампліфікації гену *msr-1* (стійкість до колістину)**

Етап	Температура, °C	Час, сек	К-ть циклів
Початкова денатурація	95	600	
Денатурація	95	15	40
Віджиг	60	60	
Елонгація	72	60	
Фінальна елонгація	72	600	

**Крива плавлення:** 95°C = 1хв -> 58°C (+0,2°C/сек) -> 95°C

**Додаток 8**  
**Глибина сиквенування та кількість Операційний Таксономічних Одиниць (ОТО) на зразок**

Станція	Горизонт	К-ть послідовностей	К-ть ОТО
4.1	поверхня	112818	234
6.1	поверхня	122869	247
11.1	поверхня	165791	243
12.1	поверхня	120003	251
10.1	поверхня	101991	249
9.1	поверхня	112285	270
8.1	поверхня	66287	279
7.1	поверхня	135270	240
3.1	поверхня	115907	261
2.1	поверхня	97151	256
1.1	поверхня	61639	203
5.1	поверхня	108026	262
5.2	термоклин	118665	240
6.2	термоклин	106002	239
11.2	термоклин	126090	243
4.2	термоклин	131693	252
12.2	термоклин	66894	243
10.2	термоклин	108356	213
9.2	термоклин	92497	284
8.2	термоклин	148730	253
7.2	термоклин	114979	233
3.2	термоклин	116231	253
2.2	термоклин	110929	268
1.2.1	термоклин	94118	241
1.2	термоклин	84905	299

## Продовження Додатку 8

Станція	Горизонт	К-ть послідовностей	К-ть ОТО
6.3	ГМХ	103662	326
11.3	ГМХ	156306	304
12.3	ГМХ	96783	319
12.3	ГМХ	77813	335
10.3.1	ГМХ	66791	290
10.3.2	ГМХ	54802	352
4.3	ГМХ	121075	289
9.3	ГМХ	87731	270
8.3	ГМХ	103168	294
7.3	ГМХ	74679	315
3.3	ГМХ	81552	299
2.3	ГМХ	113777	274
1.3	ГМХ	79565	306
1.3	ГМХ	82511	274
5.3	ГМХ	119752	340
6.4	субоксична зона	139774	259
11.4.1	субоксична зона	117976	351
11.4.2	субоксична зона	100963	312
12.4	субоксична зона	119660	253
10.4.1	субоксична зона	80871	362
10.4.2	субоксична зона	66927	324
9.4.1	субоксична зона	99754	304
9.4.2	субоксична зона	107021	302
4.4	субоксична зона	100684	312
8.4.1	субоксична зона	84677	299
8.4.2	субоксична зона	92986	258
4.5	субоксична зона	108267	230
7.4	субоксична зона	127979	350

*Продовження Додатку 8*

<b>Станція</b>	<b>Горизонт</b>	<b>К-ть послідовностей</b>	<b>К-ть ОТО</b>
3.4	субоксична зона	81275	299
5.4	субоксична зона	142752	259
2.4	субоксична зона	44524	324
5.4	субоксична зона	121457	307
5.5	безкиснева зона	103587	339
10.5.1	безкиснева зона	90805	246
10.5.2	безкиснева зона	79906	339
10.5.3	безкиснева зона	91763	326
9.5	безкиснева зона	116374	249
8.5	безкиснева зона	100811	274
7.5.1	безкиснева зона	95154	368
7.5.2	безкиснева зона	108401	310
3.5.1	безкиснева зона	90621	341
3.5.2	безкиснева зона	89964	337



**Додаток 9**  
**Гідрохімічні параметри середовища Чорного моря**  
**на момент відбору матеріалу у 2016 році**

Станція	Глибина, м	Розч О <sub>2</sub> , мг/л	Флуорисценція	H <sub>2</sub> S, г/л	T °C	NO <sub>3</sub> , мкг/л	NO <sub>2</sub> , мкг/л	Nорг, мкг/л	Pорг, мкг/л	PO <sub>4</sub> , мкг/л	Si, мкг/л	Nзаг мкг/л	Pзаг, мкг/л
1	0,0	8,9	0,3	-	21,4	1,9	<LoQ	306,0	8,2	<LoQ	410,0	308,0	8,2
1	5,0	8,8	0,7	-	21,2	1,5	<LoQ	266,0	7,5	<LoQ	400,0	268,0	7,5
1	17,0	9,6	1,9	-	9,7	11,9	2,3	253,8	5,6	<LoQ	520,0	268,0	5,6
1	25,0	9,3	1,1	-	8,7	27,4	0,6	219,9	<LoQ	<LoQ	630,0	248,0	<LoQ
1	60,0	6,1	0,6	-	8,7	34,9	<LoQ	99,1	4,4	12,6	460,0	134,0	17,0
2	0,0	8,7	0,5	-	21,2	3,9	<LoQ	254,0	6,0	<LoQ	27,9	258,0	6,0
2	12,0	10,0	0,6	-	16,0	0,5	<LoQ	282,0	<LoQ	<LoQ	35,9	283,0	<LoQ
2	40,0	9,7	1,1	-	9,9	2,5	0,6	244,9	<LoQ	<LoQ	51,8	248,0	<LoQ
2	123,0	0,7	0,1	-	8,7	52,8	<LoQ	453,2	3,1	40,3	1020,0	506,0	43,4
3	0,0	9,2	0,3	-	19,9	1,0	<LoQ	451,0	8,8	<LoQ	39,8	452,0	8,8
3	12,0	9,5	0,5	-	16,5	1,5	<LoQ	266,0	<LoQ	<LoQ	54,5	268,0	<LoQ
3	40,0	9,1	0,9	-	9,3	49,8	<LoQ	228,0	8,0	<LoQ	130,0	278,0	8,0
3	121,0	0,7	0,1	0,9	8,6	60,3	<LoQ	212,7	8,1	41,8	1070,0	273,0	49,9
3	135,0	-	0,1	1,1	8,6	-	-	-	-	-	-	-	-
3	144,0	-	0,1	1,2	8,7	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0,0	8,9	0,3	-	18,0	2,5	<LoQ	146,5	<LoQ	<LoQ	80,9	149,0	<LoQ

## Продовження Додатку 9

Станція	Глибина, м	Розч О <sub>2</sub> , мг/л	Флуорисценція	Н <sub>2</sub> S, г/л	Т °С	NO <sub>3</sub> , мкг/л	NO <sub>2</sub> , мкг/л	Норг, мкг/л	Рорг, мкг/л	PO <sub>4</sub> , мкг/л	Si, мкг/л	Nзаг мкг/л	Pзаг, мкг/л
4	8,2	9,6	0,3	-	17,0	3,0	<LoQ	389,0	<LoQ	<LoQ	82,2	392,0	<LoQ
4	44,5	9,4	1,0	-	8,8	7,0	0,7	592,4	3,3	6,3	160,0	600,0	9,6
4	59,8	0,9	0,4	-	8,6	149,0	0,8	560,2	5,9	40,6	830,0	710,0	46,6
4	99,3	0,2	0,1	-	8,7	4,0	0,6	1251,4	1,2	1,2	1470,0	1256,0	109,2
5	0,0	9,1	0,2	-	18,1	0,5	<LoQ	718,5	7,2	<LoQ	67,6	719,0	7,2
5	15,3	9,3	0,3	-	16,0	1,0	<LoQ	669,0	12,8	<LoQ	69,0	670,0	12,8
5	45,8	6,9	0,9	-	8,5	99,6	0,7	484,6	1,3	15,6	370,0	585,0	16,7
5	96,3	1,1	0,1	1,5	8,7	64,7	<LoQ	412,3	1,2	118,6	1430,0	477,0	119,8
5	110,9	-	0,1	0,8	8,7	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0,0	9,4	0,4	-	17,6	2,0	<LoQ	464,0	9,8	<LoQ	87,5	466,0	9,5
6	12,5	9,4	0,5	-	14,8	2,0	<LoQ	454,0	0,0	<LoQ	91,5	456,0	<LoQ
6	55,0	6,9	1,1	-	8,4	74,7	0,5	609,8	3,5	16,5	370,0	685,0	20,0
6	98,8	0,7	-	-	8,6	1,0	0,5	627,0	13,2	148,0	1490,0	628,0	161,2
7	0,0	8,6	0,3	-	20,0	1,0	<LoQ	257,0	<LoQ	<LoQ	79,5	258,0	<LoQ
7	8,0	8,6	0,3	-	19,8	1,0	<LoQ	287,0	<LoQ	<LoQ	75,6	288,0	<LoQ
7	50,0	5,0	1,2	-	8,4	37,4	0,5	250,0	2,1	21,9	490,0	288,0	24,0
7	58,0	2,0	0,3	1,3	8,6	66,2	0,6	181,1	4,2	31,0	750,0	248,0	35,2
7	86,5	-	0,1	1,3	8,6	-	-	-	-	-	-	-	-

## Продовження Додатку 9

Станція	Глибина, м	Розч О <sub>2</sub> , мг/л	Флуорисценція	H <sub>2</sub> S, г/л	Т °С	NO <sub>3</sub> , мкг/л	NO <sub>2</sub> , мкг/л	Норг, мкг/л	Рорг, мкг/л	PO <sub>4</sub> , мкг/л	Si, мкг/л	Nзаг мкг/л	Pзаг, мкг/л
7	100,0	-	0,1	1,2	8,6	-	-	-	-	-	-	-	-
8	0,0	8,8	0,4	-	19,9	5,5	<LoQ	222,5	<LoQ	<LoQ	82,2	228,0	<LoQ
8	15,0	9,9	0,7	-	13,3	4,9	<LoQ	253,0	6,0	<LoQ	84,8	258,0	6,0
8	48,0	8,6	0,8	-	8,6	61,8	1,6	209,6	4,6	12,0	210,0	273,0	16,6
8	62,0	0,6	0,3	1,2	8,6	47,3	0,7	154,9	10,5	41,8	820,0	203,0	52,3
8	82,0	0,2	0,1	1,4	8,6	30,4	2,6	239,9	7,7	<LoQ	1210,0	273,0	7,7
8	106,0	-	0,1	1,4	8,6	-	-	-	-	-	-	-	-
9	0,0	8,6	0,4	-	19,4	2,0	<LoQ	211,0	6,5	<LoQ	71,6	213,0	6,5
9	14,0	9,0	0,5	-	16,2	2,0	<LoQ	266,0	<LoQ	<LoQ	70,3	268,0	<LoQ
9	45,0	4,2	0,8	-	8,4	18,9	<LoQ	378,1	8,5	26,2	540,0	397,0	34,7
9	54,0	0,4	0,2	0,8	8,6	38,8	0,6	183,6	1,2	42,4	890,0	223,0	43,6
9	70,0	0,3	0,2	0,9	8,7	22,9	1,2	149,9	0,6	15,3	1230,0	174,0	15,9
9	83,0	-	0,1	1,2	8,6	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0,0	9,2	0,4		18,2	2,0	<LoQ	325,0	5,9	<LoQ	100,0	327,0	5,9
10	12,0	9,4	0,7	-	17,6	3,9	<LoQ	527,0	8,0	<LoQ	91,5	531,0	8,1
10	30,5	9,6	1,0	-	9,4	89,6	0,9	1298,5	6,5	<LoQ	110,0	1389,0	6,5
10	75,0	5,8	0,1	-	8,6	79,6	<LoQ	228,4	6,0	18,0	410,0	308,0	24,0
10	112,4	1,9	0,1	-	8,7	14,7	<LoQ	446,3	2,7	39,7	860,0	521,0	42,5

## Продовження Додатку 9

Станція	Глибина, м	Розч О <sub>2</sub> , мг/л	Флуорисценція	Н <sub>2</sub> S, г/л	Т °С	NO <sub>3</sub> , мкг/л	NO <sub>2</sub> , мкг/л	Норг, мкг/л	Рорг, мкг/л	PO <sub>4</sub> , мкг/л	Si, мкг/л	Нзаг мкг/л	Рзаг, мкг/л
10	129,7	0,6	0,1	0,2	8,7	59,8	<LoQ	287,2	3,6	49,6	1220,0	347,0	53,2
10	159,0	-	0,0	2,2	8,7	2540,0	<LoQ	3061,0	5,6	188,0	1420,0	5601,0	193,6
10	748,0	-	0,0	9,1	9,0	2490,0	<LoQ	1628,0	60,8	20,4	7280,0	4118,0	81,2
10	996,0	-	0,0	11,1	9,0	3,0	<LoQ	240,0	38,6	39,7	7500,0	243,0	78,3
11	0,0	8,9	0,6	-	18,7	2,0	<LoQ	570,0	13,1	<LoQ	67,6	572,0	13,1
11	8,9	9,3	0,6	-	18,4	3,9	0,7	565,3	9,7	<LoQ	71,6	570,0	9,7
11	35,4	9,6	1,2	-	9,3	59,8	1,3	390,9	13,8	<LoQ	70,3	452,0	13,8
11	134,0	1,3	0,1	-	8,6	110,0	0,6	467,4	0,5	42,1	810,0	578,0	42,6
11	165,0	0,3	0,1	-	8,7	139,0	0,7	136,3	2,2	90,0	1140,0	276,0	92,2
12	0,0	8,9	0,2	-	18,6	2,0	<LoQ	425,0	<LoQ	<LoQ	130,0	427,0	<LoQ
12	7,0	9,5	0,3	-	18,6	1,5	<LoQ	315,5	<LoQ	<LoQ	94,1	317,0	<LoQ
12	35,0	9,6	1,5	-	9,0	39,8	0,9	128,3	<LoQ	<LoQ	110,0	169,0	<LoQ
12	127,0	0,3	0,1	-	8,7	32,4	0,8	373,8	5,9	59,8	1430,0	407,0	65,7

### Додаток 10

	Глибинний максимум хлорофілу	Субоксична зона	Безкиснева зона
Поверхня	166: транспортери, метаболізм амінокислот, прокаріотична фіксація карбону, метаболізм сполук азоту та сульфору, розклад ксенобіотиків	175: транспортери, метаболізм амінокислот, фотосинтез, розклад ксенобіотиків, стійкість до бета-лактамів	211: транспортери, метаболізм амінокислот, фотосинтез, розклад ксенобіотиків, стійкість до бета-лактамів, метаболізм сполук азоту та сульфору
Термоклин	140: метаболізм амінокислот, метаболізм сполук азоту та сульфору, розклад ксеннобіотиків	154: метаболізм амінокислот, фотосинтез, фіксація карбону, розклад ксенобіотиків	203: транспортери, метаболізм амінокислот, фотосинтез, розклад ксенобіотиків, стійкість до бета-лактамів, метаболізм сполук азоту та сульфору
Глибинний максимум хлорофілу	-	37: метаболізм амінокислот, фотосинтез, розклад ксенобіотиків, стійкість до бета-лактамів	88: метаболізм амінокислот, фотосинтез, розклад ксенобіотиків, стійкість до бета-лактамів
Субоксична зона		-	
Безкиснева зона			-