
... ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ ... ZOOLOGY AND ECOLOGY ...

УДК: 574.64+597.551.2:579.852.11

До питання про стан мікробоценозів риб та роль мікроорганізмів роду *Bacillus* при гербіцидному забрудненні водойм*
О.В.Барбухо

Чернігівський національний технологічний університет (Чернігів, Україна)
lena-gun@mail.ru

Відмічено суттєве зниження кількості представників роду *Bacillus* у складі мікробоценозу кишкового тракту, шкіри і зябер коропа при різному рівні токсичності середовища, обумовленому забрудненням гліфосатом, і встановлена їх індикаторна значимість. Проведено кореляційний аналіз, який показав, що найбільш тісний зв'язок між концентрацією гліфосату у воді та кількістю клітин роду *Bacillus* у складі мікрофлори риб характерний для шкіри та зябер коропа, а тому для оцінки рівня токсичного забруднення гідроекосистем доцільно використовувати ці тканини. В результаті проведення регресійного аналізу представлено моделі регресії, зокрема й множинну регресійну модель з двома незалежними змінними, що дозволяють спрогнозувати концентрацію гліфосату у воді за експериментально встановленими показниками кількості клітин роду *Bacillus* у цих тканинах. Запропоновані моделі можуть використовуватись для визначення гербіцидного забруднення водойм, зокрема розрахунку кількості гліфосату у воді, за умови акваріумного утримання риб та відповідності значення усіх факторів, що можуть вплинути на чисельність бактерій, умовам експерименту. Запропоновано використовувати мікроорганізми роду *Bacillus* на шкірі і зябрах риб як індикаторний показник для діагностики токсикологічної обстановки у водоймах.

Ключові слова: гербіцид, гліфосат, дворічки коропа, мікробоценоз, зябра, шкіра, кишковик, слиз кишковика, мікроорганізми роду *Bacillus*.

К вопросу о состоянии микробоценозов рыб и роли микроорганизмов рода *Bacillus* при гербицидном загрязнении водоемов
Е.В.Барбухо

Отмечено существенное снижение количества представителей рода *Bacillus* в составе микробоценоза кишечного тракта, кожи и жабр карпа при разном уровне токсичности среды, обусловленном загрязнением глифосатом, и установлена их индикаторная значимость. Проведен корреляционный анализ, который показал, что наиболее тесная связь между концентрацией глифосата в воде и количеством клеток рода *Bacillus* в составе микрофлоры рыб характерна для кожи и жабр карпа, а поэтому для оценки уровня токсического загрязнения гидроекосистем целесообразно использовать эти ткани. В результате проведения регрессионного анализа представлены модели регрессии, в частности и модель множественной регрессии с двумя независимыми переменными, которые дают возможность спрогнозировать концентрацию глифосата в воде по экспериментально установленным показателям количества клеток рода *Bacillus* в этих тканях. Предложенные модели могут использоваться для установления гербицидного загрязнения водоемов, в частности расчета количества глифосата в воде, при условии аквариумного содержания рыб и соответствия значения всех факторов, которые могут повлиять на численность бактерий, условиям эксперимента. Предложено использовать микроорганизмы рода *Bacillus* на коже и жабрах рыб как индикаторный показатель для диагностики токсикологической обстановки в водоемах.

Ключевые слова: гербицид, глифосат, двухлетки карпа, микробоценоз, жабры, кожа, кишечник, слиз кишечника, микроорганизмы рода *Bacillus*.

On the question of microbial cenoses of fish and the role of microorganisms of the genus *Bacillus* under herbicidal water pollution
O.V.Barbukho

Substantial reduction in the number of *Bacillus* as part of microbocenosis of fish intestines, skin and gills at different level of toxicity of the environment caused by pollution with glyphosate has been detected and their

* Робота виконувалась в рамках держбюджетної науково-дослідної роботи МОНмолодьспорту України (№ д/р 0111U001178, 2011–2012 рр.).

indicator significance has been determined. Correlation analysis has been done, which showed that the most close relationship between the concentration of glyphosate in water and the number of *Bacillus* cells as a part of fish microflora is typical for the skin and gills of carp, and therefore in order to assess the level of toxic contamination of hydroecosystems it's appropriate to use these tissues. As a result of regression analysis, regression models are presented, and in particular a multiple regression model with two independent variables, that allow to predict the concentration of glyphosate in water by experimentally established *Bacillus* cell number in these tissues. Proposed models can be used to establish herbicidal water pollution, in particular for calculation of the amount of glyphosate in water in conditions of aquarium fish keeping and if all the factors that may affect the number of bacteria correspond with conditions of experiment. Authors have proposed to use genus *Bacillus* microorganisms on the skin and gills of fish as an indicator for the diagnosis of toxicological situation in the reservoirs.

Key words: *herbicide, glyphosate, two-year carps, microocenosis, gills, skin, intestine, intestinal mucus, microorganisms of the genus Bacillus.*

Вступ

Впродовж останніх років на теренах України спостерігається інтенсивна хімізація агроєкосистем, з дедалі більшим застосуванням гліфосатвмісних гербіцидів. Неминучим результатом цього є надходження значної частки ксенобіотиків до водойм. Головна небезпека гербіцидів, у цьому випадку, зумовлена здатністю зазначених токсикантів до акумуляції в гідробіонтах, першу чергу рибі, як вищій ланці трофічних ланцюгів в гідробіоценозах. Як правило, оцінка ступеня токсичного впливу ксенобіотиків на риб ґрунтується на визначенні низки параметрів, серед них найбільш поширеними є біохімічні, імунологічні, гістологічні дослідження. І це щораз підтверджується роботами багатьох дослідників (Жиденко и др., 2010; Коваленко, Жиденко, 2005; Онисковець, 2012). Разом з тим, така оцінка повинна здійснюватись з врахуванням найбільш інформативних біологічних показників, серед яких однією із найчутливіших є мікробіота риб, що швидко реагує, кількісними та якісними порушеннями, навіть на незначні зміни середовища. В доступних літературних джерелах відомості про стан мікрофлори риб за дії різних стрес-чинників є досить обмежені, зокрема й при гербіцидному забрудненні водойм. Тож дане питання є відкритим, що свідчить про актуальність його вирішення.

Мікроорганізми роду *Bacillus* викликають найбільший інтерес в екологічних дослідженнях, з огляду на їх широке розповсюдження в компонентах водних екосистем (на їх частку припадає до 20% складу мікробних угруповань) (Сусллова, 2007). Відзначено, що у більшості прісноводних риб у складі їх мікрофлори грампозитивні бактерії роду *Bacillus* становлять значну частку, поряд з грамнегативними мікроорганізмами родів *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacter* тощо, а також анаеробними – *Vibrio* і *Clostridium* (Зубкова, 1965, 1966; Margolis, 1953; Trust, Sparrow, 1974; Trust et al., 1979). При цьому, за даними Л.А.Зубкової (Зубкова, 1965, 1966) грампозитивні форми кількісно переважають саме в кишковикі сазана (70% від загального числа мікроорганізмів), в той час як у судака на їх долю припадає 36%. Бактеріям роду *Bacillus* належить визначальна роль в аспекті бар'єрної складової мікробіоти з огляду на їх виражені адгезивні й антагоністичні властивості. Ці мікроорганізми виконують низку важливих функцій, зокрема колонізаційно-резистентну (міжмікробний антагонізм та активація імунної системи), синтетичну, детоксикаційну тощо (Смирнов и др., 1982, 2001; Смирнов, Косюк, 1997; Tzannetis, Papavassiliou, 1992), що робить цей компонент мікробіоценозу риб пріоритетним для досліджень.

Відомостей про вміст гліфосату в поверхневих водах України у вітчизняних літературних джерелах нами не виявлено. Звичайно, не можна не брати до уваги ту обставину, що відсутність об'єктивної інформації щодо наявності залишків гліфосату у воді обумовлена наявністю технічних недоліків існуючих аналітичних методів, що пов'язані з недостатньою чутливістю виявлення цього токсиканту (Кузнецова, Чміль, 2010). Небезпека посилюється й тим, що в країні відсутній систематичний контроль на вміст залишків гліфосату в об'єктах системи «вода–донні відкладення–біота», а також належний моніторинг забруднення водойм гербіцидами, незважаючи на законодавчо врегульований контроль при їх застосуванні з пріоритетністю охорони навколишнього природного середовища. Ускладнює ситуацію й те, що більшість методик визначення залишкових кількостей гліфосату в об'єктах довкілля є досить складними і копіткими, вимагають значних затрат часу та матеріального забезпечення, високоспеціалізованих лабораторій, через що не завжди є доступними. З огляду на це, очевидною і нагальною є потреба пошуку принципово інших підходів щодо визначення вмісту гліфосату у воді, за принципом їх надійності, доступності і економічності. Перспективним напрямком в цьому відношенні є біоіндикація. Відзначено, що саме мікрофлора риб

є високочутливою системою і беззаперечним біоіндикатором ступеня токсичного забруднення водного середовища (Бычкова и др., 2000; Вовк, 2002; Ларцева, Катунин, 1993). Відгуки компонентів мікробоценозу риб на вплив ксенобіотиків вагомі для моніторингу, оскільки є найбільш чутливими і з'являються першочергово за реакції на шкідливий ефект стресора. Це дає змогу розглядати мікроорганізми як перспективний індикаторний показник при проведенні моніторингу забруднення водойм гербіцидами.

Метою дослідження було встановити кількісні зміни мікроорганізмів роду *Bacillus* у складі мікробоценозів зябер, шкіри, кишкового й слизу кишкового дворічка коропа під впливом гліфосату та оцінити можливість використання цієї групи бактерій як індикаторів у моніторингу гербіцидного забруднення водойм.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктом досліджень були мікроорганізми роду *Bacillus*, що населяють зябра, шкіру, кишковику й слизу кишкового дворічка коропа (*Cyprinus carpio* L.). Зазначена група бактерій розглядається як важлива складова мікофлори риб в силу вираженого природного антагонізму та імуномодуючих властивостей. Для досліджень обрано саме коропа, оскільки якраз на цих рибах проводиться переважна більшість токсикологічних дослідів, а також беручи до уваги рибогосподарське значення цього виду. Було використано модельні умови: рибу розміщували з розрахунку 1 екз. на 40 л води в 200-літрових акваріумах, обладнаних газорегуляторами для підтримання стандартного рівня гідрохімічних показників (вміст O_2 у воді становив $5,9 \pm 0,3$ мг/дм³, рН 7,6–7,8). Температуру води в акваріумах під час проведення дослідів підтримували на рівні $8,0 \pm 0,2$ °С шляхом штучного охолодження. Акваріуми заповнювали природною водою, яку відбирали зі ставка ПрАТ «Чернігіврибгосп». З метою адаптації риб до штучних умов до початку дослідів проводилось їх витримання в акваріумах впродовж 3 тижнів. Тривалість експерименту становила 14 діб, що є достатнім для формування адаптивних механізмів до дії абіотичних чинників водного середовища (Хлебович, 1981). В експерименті використано гербіцид, діючою речовиною якого є гліфосат (торгова назва препарату Раундап®) (Доповнення..., 2009; Перелік пестицидів..., 2012) в концентраціях 1 ГДК (0,02 мг/дм³), 1,5 ГДК, 2 ГДК, які створювали шляхом внесення у воду розрахованої кількості 36%-го розчину гліфосату. З метою підтримання постійної концентрації гліфосату воду в акваріумах змінювали щотридобово з додаванням відповідної кількості пестициду. В Україні зареєстровано і дозволено до використання близько 30 найменувань гербіцидів на основі гліфосату (Кузнецова, Чміль, 2010). Як контроль (0 ГДК) використовували риб, що утримувались в акваріумах без додавання гербіциду.

Чисельність спорутворюючих мікроорганізмів роду *Bacillus* визначали в кишковику, слизу кишкового, на шкірі і зябрах дворічка коропа методом десятикратних розведень з висівом на м'ясопептонний агар (МПА) (Методы общей..., 1984; Смирнов и др., 1983; Теппер и др., 1987). Саме це середовище, з огляду на методи підготовки біологічного матеріалу до посіву та умови культивування досліджуваної групи бактерій, в даному випадку є оптимальним. Ідентифікацію мікроорганізмів роду *Bacillus* проводили з врахуванням морфологічних і культуральних ознак (Смирнов и др., 1983). Мікробіологічні дослідження проводили на базі лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України впродовж 2011 і 2012 рр. відповідно до договору №3/2011 «Про наукову співпрацю» (від 01.02.2011 р.).

При проведенні мікробіологічних досліджень посіви виконували на 14-у добу експерименту. Відбір проб біологічного матеріалу проводили відповідно до існуючих рекомендацій (Мусселиус и др., 1983) у нашій модифікації. Для цього асептично ізольовані з переднього та заднього відділу кишкового шматочки тканини (звільнені від слизу шляхом його зіскобу), шматочки зябер та шкіри розміром 1 × 1 см поміщали у стерильний фізіологічний розчин, збовтували 10 хв, брали 1 см³ отриманої суспензії і готували ряд послідовних десятикратних розведень від 10^{-1} до 10^{-6} , які у кількості 0,1 см³ вносили на поверхню живильного середовища МПА (висіви робили з усіх розведень). Для визначення кількості мікроорганізмів роду *Bacillus* у слизу кишкового в пробірці зі стерильним фізіологічним розчином у співвідношенні 1 : 10 (маса : об'єм) вносили по 1 г зіскобів зі слизової оболонки переднього і заднього відділів кишкового, після чого робили ряд розведень. З метою знищення неспорівної мікрофлори перед посівом проби прогрівали на водяній бані впродовж 15 хв при 75°С відповідно до методичних рекомендацій.

Чашки інкубували за температури 37°C. Після термостатування проб підраховували кількість колоній, що виростили на чашках. Відбір колоній баціл проводили з врахуванням культурально-морфологічних ознак, характерних для роду *Bacillus* (Краткий определитель..., 1980). Результат представляли у вигляді КУО/см² (колонієутворюючих одиниць на 1 см² тканини кишковика, поверхні шкіри і зябер) та КУО/г (в 1 г слизу кишковика). Для підрахунку брали ті чашки, в яких кількість колоній не менше 30 і не більше 200. Різниця в кількості колоній на чашках з одного й того ж розведення не була більшою ніж, у два рази. Типовість виділених бактеріальних культур перевіряли під мікроскопом ЛОМО Мікмед-5 у пофарбованих за Грамом мазках, спостерігаючи типові для аеробних (враховуючи аеробні умови культивування і ріст колоній виключно на поверхні агару) баціл клітини – грампозитивні палички з центрально розташованими незафарбованими спорами. Для досліджень з кожної проби робили по 3 мазки. Кількість мікроорганізмів роду *Bacillus* в досліджуваній суспензії обчислювали за формулою (Теппер и др., 1987):

$$C = A \cdot P / V,$$

- де С – кількість мікроорганізмів роду *Bacillus*, КУО/см³;
 А – середнє арифметичне числа колоній, що виростили на чашках Петрі;
 Р – величина, зворотна розведенню;
 V – кількість рідини, що взята для посіву на одну чашку, см³.

Аналіз отриманих результатів проводили методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стюдента (Лакин, 1990). Ступінь зв'язку між показниками оцінювали за допомогою кореляційного аналізу (Рокицкий, 1973). Прогнозування залежності між величиною показника чисельності мікроорганізмів роду *Bacillus* та концентрацією гліфосату здійснювали за допомогою регресійного аналізу з використанням програми SPSS Statistics. Для побудови регресійної моделі застосовувалася покрокова множинна регресія. Для виконання аналізу був обраний метод включення незалежних змінних в регресійній моделі Forward STEPWISE.

Результати та обговорення

В результаті досліджень було встановлено, що впродовж 14 діб перебування дворічок коропа в умовах гербіцидного навантаження (дія 1; 1,5 та 2 ГДК гліфосату) відбувається статистично значуще зниження чисельності представників роду *Bacillus* у складі мікробіоценозу кишковика та слизу кишковика риб відносно контролю (рис. 1).

Так, при початковому значенні чисельності бактерій роду *Bacillus* у змивах з тканини переднього відділу кишковика риб контрольної групи на рівні $(3,6 \pm 0,71) \cdot 10^2$ КУО/см², у риб, які зазнавали дії 1 ГДК гліфосату, їх кількість знижується до $(7,7 \pm 1,4) \cdot 10$ КУО/см², або у 4,7 рази щодо контролю (див. рис. 1, А). Істотне скорочення чисельності представників досліджуваної групи бактерій в зазначеному кишковому біотопі, зі зменшенням на 1–2 порядки порівняно з контролем, відмічається у особин, що в досліді зазнавали підвищеного токсичного навантаження, зокрема 1,5 та 2 ГДК гліфосату. В даному випадку таке зменшення може свідчити як про інгібуючу дію гліфосату безпосередньо на представників мікробіоти риб, так і про зміну умов існування цієї групи бактерій, насамперед фізіологічних змін в організмі риб, спричинених токсичною дією досліджуваного гербіциду. При дослідженні мікробіоценозу кишковика заднього відділу риб також спостерігається тенденція до скорочення чисельності мікроорганізмів роду *Bacillus* за дії на риб досліджуваного ксенобіотику. Зокрема, при перебуванні останніх у середовищі з вмістом гліфосату на рівні 1 ГДК – до $(4,7 \pm 0,4) \cdot 10^1$ КУО/см² проти $(3,8 \pm 0,22) \cdot 10^2$ КУО/см² в контролі (різниця становить 8,1 рази), за збільшення токсичності середовища до 2 ГДК – у 190 разів. Можна припустити, що має місце суттєве зниження захисних властивостей, а разом з тим – порушення процесів детоксикації гербіциду в організмі риб, адже відомо, що порушення у складі бактеріальної популяції кишкового тракту призводить до структурних змін як самої слизової оболонки кишковика, так і її клітин (скорочення їх кількості та розмірів) (Чахава и др., 1982; Haenel, Schulze, 1979), а також до зниження функціональної активності клітин слизової оболонки, що продукують імуноглобуліни (Crabbé et al., 1970).

В умовах забруднення гліфосатом водного середовища закономірне зниження чисельності мікроорганізмів роду *Bacillus* спостерігається також у слизу переднього та заднього відділів кишковика дослідних риб (див. рис. 1, В). При цьому слід відмітити, що зниження їх кількості у слизу, відповідно в 4,8–12,6 рази відносно контролю, відбувається навіть за найменшої з досліджуваних концентрацій токсиканту у воді (0,02 мг/дм³), яка є допустимою і відповідає

встановленому нормативу ГДК (Справочник..., 1986). При підвищенні рівня гербіциду у воді до 2 ГДК має місце різке скорочення чисельності зазначеної групи бактерій у слизу кишковика риб, як переднього, так і заднього відділів, до значень відповідно $(2,3 \pm 0,09) \cdot 10^1 - (1,1 \pm 0,09) \cdot 10^1$ КУО/г (різниця щодо контролю 17,8–21,8 раза), що, в даному випадку, можна пояснити прямим впливом досліджуваного токсиканта на мікроорганізми роду *Bacillus*, про що свідчить закономірне зниження їх кількості за підвищення токсичності середовища.

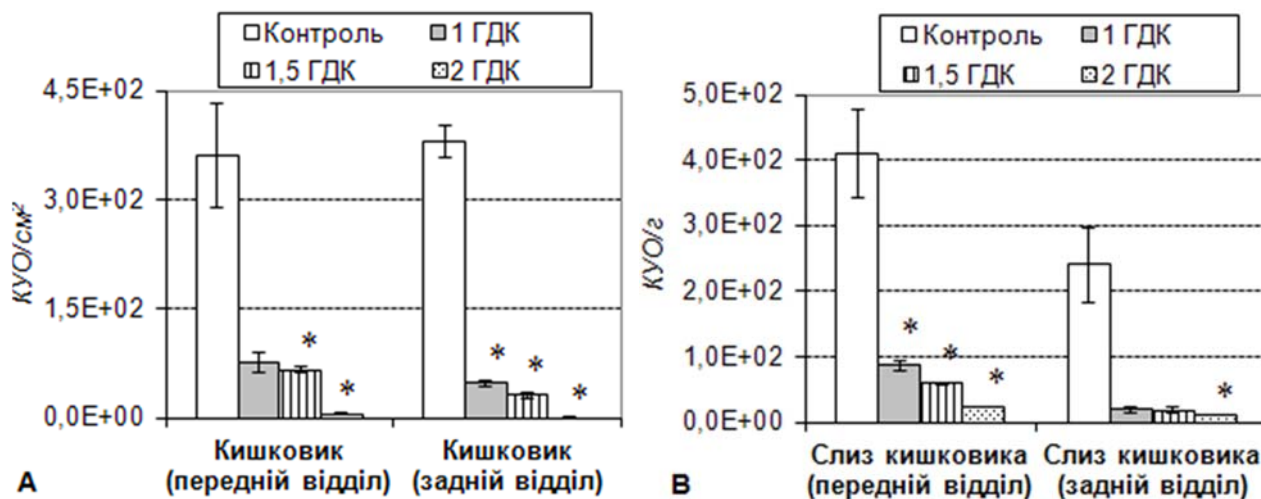


Рис. 1. Кількість мікроорганізмів роду *Bacillus* у змивах кишковика (А) та слизу кишковика (В) дворічок коропа за дії гліфосату. Тут і на рис. 2: експозиція – 14 діб; $M \pm m$, $n=10$; * – різниця середніх величин досліду і контролю статистично значуща, $p < 0,01$

В цілому, кількісні зміни у складі мікробіоценозу кишкового тракту риб, що спричинені перебуванням останніх у токсичних умовах, можуть вкрай негативно позначитись на природній резистентності макроорганізму, адже бактерії нормальної кишкової мікрофлори виконують важливі функції – стимуляцію імунної та антиоксидантної системи, за рахунок взаємодії зі специфічними рецепторами на внутрішній поверхні кишкового тракту та продукції ними низки біологічно активних речовин (Кузьміна, 1995). Окрім цього, стресова ситуація може призвести до зменшення колонізаційної резистентності кишкового тракту за рахунок зниження адгезивних властивостей мікроорганізмів і здатності епітеліальних клітин до їх утримання, що, в свою чергу, може призвести до посиленої транслокації мікроорганізмів, в тому числі й патогенних, у кров і внутрішні органи риб (Панин, 1985).

Відомо, що при взаємодії організму риб з оточуючим середовищем основними органами, окрім кишкового тракту, є зябра і шкіра. У зв'язку з цим основну увагу приділяли вивченню кількісного вмісту мікроорганізмів роду *Bacillus*, як одних з представників мікрофлори, що населяють зябра і зовнішні покриви тіла риб, при перебуванні останніх в умовах токсичного гербіцидного навантаження.

Мікрофлора шкіри прісноводних риб є надзвичайно різноманітною, оскільки саме шкіра є тим захисним органом, що постійно контактує з оточуючим середовищем. Якісний склад мікрофлори зовнішніх покривів риб є видоспецифічним, кількісний – залежить від мікробіоценозу водойми, екологічної обстановки тощо. Основна функція спорової складової шкіри прісноводних риб, з огляду на виражену антагоністичну активність досліджуваної групи бактерій, – це захист поверхні тіла від патогенних мікроорганізмів.

Щодо вмісту мікроорганізмів роду *Bacillus* на шкірі риб контрольної групи, тут їх кількість становила $(1,1 \pm 0,03) \cdot 10^3$ КУО/см², тоді як гліфосат сприяв зниженню цього показника до значень $(3,1 \pm 0,24) \cdot 10^2 - (9,7 \pm 1,0) \cdot 10$ КУО/см² за дії 1,5 та 2 ГДК гербіциду відповідно, що менше за контроль в 3,5–11,3 раза (рис. 2).

Такий інтенсивний вплив гліфосату на мікробіоценоз шкіри можна пояснити тим, що шкіра одна з перших піддається негативній дії токсиканта, що супроводжується зміною не лише її структури, але й умов для заселення її поверхні представниками спорової складової мікрофлори. Можна припустити, що зменшення кількості клітин цієї групи бактерій саме на шкірі риб може призвести до порушення механізму формування захисних функцій організму останніх, в тому числі й функції колонізаційної резистентності. Як наслідок – ймовірність зниження захисту риб від низки патогенів, що узгоджується з літературними даними (Грищенко, Смирнов, 1997; Просяная, Хуторной, 1979; Bowers, Alexander, 1982).

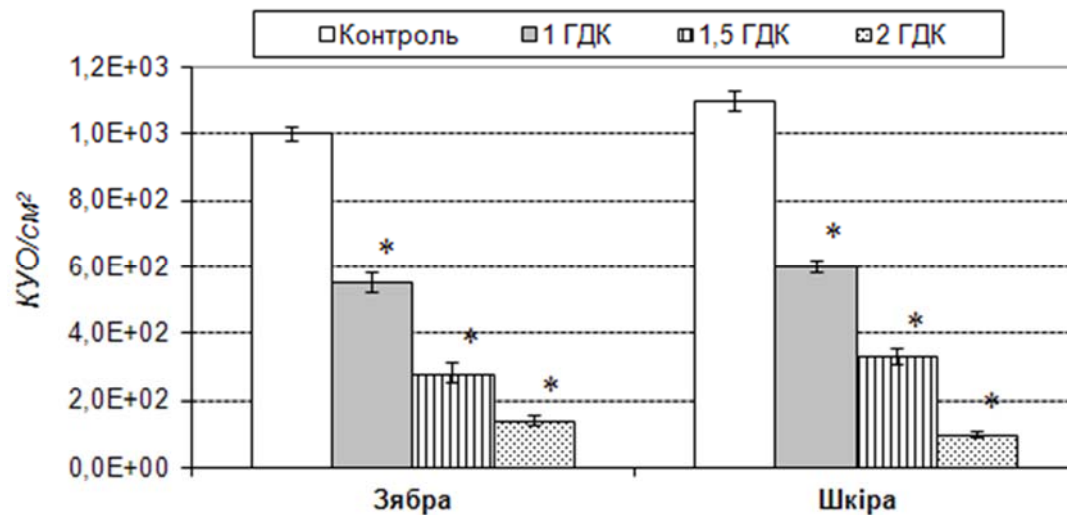


Рис. 2. Кількість мікроорганізмів роду *Bacillus* у змивах із зябер та шкіри дворічок коропа за дії гліфосату

Зябра прісноводних риб заселяються бактеріями двома шляхами: за рахунок безпосереднього надходження з навколишнього середовища та з травного тракту через кров, за рахунок явища бактеріальної транслокації. Останнє характерне саме для аеробних спороутворюючих бактерій (Никитенко и др., 2004). Враховуючи антагоністичні властивості бактерій роду *Bacillus* (Смирнов и др., 1982, 2001), можна припустити, що аеробна спорова складова мікробіоценозу зябер також виконує функцію забезпечення колонізаційної резистентності, перешкоджаючи проникненню у кров патогенних мікроорганізмів через цей найменш захищений орган.

Істотні зміни в кількісному складі зазначеної групи бактерій були також характерні для зябер риб (див. рис. 2). При цьому, у дослідних варіантах, з концентраціями гербіциду від 1 до 2 ГДК чисельність представників роду *Bacillus* на зябрах риб була на рівні відповідно $(5,5 \pm 0,3) \cdot 10^2$ – $(1,4 \pm 0,15) \cdot 10^2$ КУО/см² порівняно з $(1,0 \pm 0,02) \cdot 10^3$ КУО/см² в контролі (різниця становить 1,8–7,1 раза).

Отже, забруднення водного середовища гліфосатом негативно впливає на збереження екологічної стабільності мікробіоценозу кишкового тракту, шкіри і зябер коропа, навіть за вмісту гліфосату у воді на рівні, визначеному як допустимий (1 ГДК). Це ставить на потребу доцільність перегляду значення ГДК для гліфосату в напрямку істотного її зниження.

Також було проведено перевірку можливості використання мікроорганізмів роду *Bacillus* як біоіндикаторів у моніторингу забруднення водойм гліфосатом, шляхом виявлення статистичної залежності між величиною показника чисельності цих мікроорганізмів і концентрацією гербіциду.

Для встановлення зв'язку між кількістю клітин роду *Bacillus* у складі мікробіоценозів (зябер, шкіри, кишковика, слизу кишковика) дворічок коропа і концентрацією гліфосату (0 ГДК, 1 ГДК, 1,5 ГДК, 2 ГДК) та прогнозування подальших взаємозалежних змін цих величин було проведено кореляційний та регресійний аналізи.

Нашими дослідженнями встановлено кореляцію між кількістю клітин роду *Bacillus* у складі мікрофлори зябер, шкіри, кишковика, слизу кишковика коропа і концентрацією гліфосату у воді

(табл. 1). При цьому найбільш тісний зв'язок між досліджуваними показниками характерний саме для шкіри ($r=-0,994$) та зябер ($r=-0,993$), статистично значуща ($p<0,001$) дуже сильна негативна кореляція. Виходячи з цього, було проведено регресійний аналіз залежності між кількістю клітин зазначеної групи бактерій на цих тканинах та рівнем забруднення води гліфосатом.

Таблиця 1.
Кореляційна матриця залежності між концентрацією гліфосату у воді та кількістю клітин роду *Bacillus* у складі мікробоценозів дворічок коропа

	Гліфосат	Зябра	Шкіра	Кишкови́к (передній відділ)	Кишкови́к (задній відділ)	Слиз кишко́вика (передній відділ)	Слиз кишко́вика (задній відділ)
Гліфосат	1						
Зябра	-0,993	1					
Шкіра	-0,994	0,986	1				
Кишкови́к (передній відділ)	-0,842	0,844	0,817	1			
Кишкови́к (задній відділ)	-0,913	0,912	0,916	0,942	1		
Слиз кишко́вика (передній відділ)	-0,861	0,872	0,848	0,973	0,870	1	
Слиз кишко́вика (задній відділ)	-0,770	0,775	0,736	0,803	0,831	0,804	1

Оскільки для виконання аналізу був обраний метод включення незалежних змінних в регресійну модель STEPWISE, в результаті отримано дві регресійні моделі. В зведеній таблиці моделі (табл. 2) представлені показники, які характеризують якість побудованих регресійних моделей.

Зведена таблиця моделі

Таблиця 2.

Модель	N	R-квадрат	Скориго- ваний R-квадрат	Стандартна помилка оцінки	Зміни статистик			
					зміни F	стандартне зведення 1	стандартне зведення 2	значення зміни F
1	0,994 ^a	0,988	0,987	0,00193	1057,372	1	13	0,000
2	0,997 ^b	0,994	0,993	0,00146	10,705	1	12	0,007

Примітка. Предиктори: a – (константа) шкіра; b – (константа) шкіра, зябра.

У табл. 3 представлені нестандартизовані коефіцієнти регресії. Вони є найбільш важливими показниками результатів аналізу, оскільки використовуються для побудови регресійних моделей.

Для першої моделі в процесі покрокової множинної регресії в якості незалежної змінної в рівнянні було обрано кількість клітин роду *Bacillus* на шкірі, що пояснює наближено 98,8% дисперсії концентрації гліфосату у воді.

Це рівняння має наступний вигляд:

$$C_g = 0,044 - 3,986 \cdot 10^{-5} \cdot X_1$$

де C_g – концентрація гліфосату (мг/дм³) у водному середовищі.

Коефіцієнти статистично значущі, $p<0,001$;

X_1 – кількість клітин роду *Bacillus* на шкірі коропа (КУО/см²).

Таблиця 3.

Коефіцієнти регресійного рівняння^a

Модель	Нестандартизовані коефіцієнти		Стандартизовані коефіцієнти	t	Значимість	
	B	Стандартна помилка	β (Бета)			
1	(Константа)	0,044	0,001	49,482	0,000	
	Шкіра	-3,986E-5	0,000	-0,994	-32,517	0,000
2	(Константа)	0,045	0,001	58,723	0,000	
	Шкіра	-2,169E-5	0,000	-0,541	-3,850	0,002
	Зябра	-2,122E-5	0,000	-0,459	-3,272	0,007

Примітка: a – залежна змінна: концентрація гліфосату у воді, мг/дм³.

Основним результатом аналізу є друга регресійна модель, яка включає дві незалежні змінні – кількість клітин роду *Bacillus* на шкірі та зябрах. У цьому випадку найбільшу значущість має перша незалежна змінна ($\beta = -0,541$, див. табл. 3). Це означає, що концентрація гліфосату в більшій мірі визначається значенням кількості клітин роду *Bacillus* на шкірі з поправкою на значення чисельності клітин цієї групи бактерій на зябрах. Як видно з табл. 2, значення коефіцієнта Н складає 0,997 (можливі значення від нуля до одиниці), що свідчить про наявність сильного лінійного взаємозв'язку між показником концентрації гліфосату та кількістю клітин роду *Bacillus* на шкірі та зябрах. Високий коефіцієнт детермінації (R-квадрат), що дорівнює 0,994, свідчить про те, що зміни значення залежної змінної великою мірою пояснюються саме змінами у відібраних факторах. Показники коефіцієнта Н та коефіцієнту детермінації для першої моделі нижчі, ніж для другої. Також значення стандартної помилки розрахунків першої моделі вище, ніж другої. Це вказує на доцільність включення в другу регресійну модель зазначених незалежних змінних. Її представлено наступним рівнянням регресійної залежності:

$$C_g = 0,045 - 2,169 \cdot 10^{-5} \cdot X_1 - 2,122 \cdot 10^{-5} \cdot X_2$$

де C_g – концентрація гліфосату (мг/дм³) у водному середовищі.

Коефіцієнти статистично значущі, $p < 0,01$;

X_1 – кількість клітин роду *Bacillus* на шкірі коропа (КУО/см²);

X_2 – кількість клітин роду *Bacillus* на зябрах коропа (КУО/см²).

Розрахункові параметри моделі на 99,4% пояснюють залежність між досліджуваними показниками, а чим вище коефіцієнт детермінації, тим якісніше модель. Вона може бути запропонована для розрахунку рівня гліфосату у воді на основі значень кількості клітин роду *Bacillus* у складі мікробоценозів шкіри та зябер коропа, лише в умовах акваріумного утримання риб й у разі відповідності значення усіх чинників, що можуть вплинути на кількість мікроорганізмів, умовам експерименту.

Таким чином, при проведенні моніторингу гербіцидного забруднення водойм інформативним показником може виступати кількість мікроорганізмів роду *Bacillus* на шкірі та зябрах коропа, що підтверджується відповідним статистичним аналізом. Запропонований підхід до оцінки забруднення гідроекосистем гліфосатом є перспективним, але потребує подальшого доопрацювання і вдосконалення для виявлення високоспецифічної реакції мікрофлори риб саме на дію гліфосату на тлі можливого впливу інших чинників, в тому числі й пестицидів різного хімічного складу.

Висновки

У ході досліджень виявлено кількісні зміни у складі мікробоценозів кишкового тракту, шкіри і зябер дворічок коропа під впливом гліфосату, про що свідчить статистично значуще зменшення чисельності клітин роду *Bacillus*: за дії 1 ГДК гербіциду у 1,8–12,6 раза (залежно від тканини), за 1,5 та 2 ГДК – у 7,1–190 разів. Кореляційний аналіз показав, що найбільший зв'язок між концентрацією гліфосату у воді та кількістю клітин роду *Bacillus* характерний для шкіри ($r = -0,994$) та зябер ($r = -0,993$) коропа, а тому для оцінки рівня токсичного забруднення гідроекосистем та для моніторингу забруднення водойм гліфосатом доцільно використовувати ці тканини. На основі проведення

статистичного аналізу запропоновано регресійні моделі різної складності, в тому числі множинну регресійну модель з двома незалежними змінними, що дозволяють спрогнозувати концентрацію гліфосату у воді за експериментально встановленими показниками кількості клітин роду *Bacillus* у цих тканинах. Використання такого методу можливе лише за умови акваріумного утримання риб та відповідності значення усіх факторів, що можуть вплинути на чисельність бактерій, умовам експерименту. Отже, чисельність мікроорганізмів роду *Bacillus* у складі мікробоценозів шкіри та зябер коропа може виступати інформативним показником оцінки рівня гербіцидного забруднення водойм і стати складовою частиною біомоніторингу водойм.

Список літератури

- Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Можарова А.И. Микробиоценоз как индикатор экологического состояния водной среды и рыбы // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре. Науч.-практ. конф.: тез. докл. – М., 2000. – С. 42–43. /Bychkova L.I., Yukhimenko L.N., Mozharova A.I. Mikrobiotsenoz kak indikator ekologicheskogo sostoyaniya vodnoy sredy i ryby // Problemy okhrany zdorovya ryb v akvakulture. Nauch.-prakt. konf.: tez. dokl. – M., 2000. – S. 42–43./
- Вовк Н.І. Іхтіопатологічний моніторинг рибогосподарських водойм України. Автореф. дис. ... д-ра с.-г. наук / 03.00.16 – екологія. – Київ, 2002. – 36с. /Vovk N.I. Ikhtopatologichny monitoryng rybogospodars'kykh vodoym Ukrayiny: avtoref. dis. ... d-ra s.-g. nauk / 03.00.16 – ekologiya. – Kyiv, 2002. – 36s./
- Грищенко Л.К., Смирнов В.Б. Микрофлора карпов при выращивании в тепловодных хозяйствах // Итоги научно-практических работ в ихтиологии. – М.: Россельхозакадемия, 1997. – С. 48–50. /Grishchenko L.K., Smirnov V.B. Mikroflora karpov pri vyrashchivanii v teplovodnykh khozyaystvakh // Itogi nauchno-prakticheskikh rabot v ikhtologii. – M.: Rossel'khozakademiya, 1997. – S. 48–50./
- Доповнення до переліку пестицидів та агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. Міністерство охорони навколишнього природного середовища України. – Київ, 2009. – 304с. /Dopovnennya do pereliku pestytsydiv ta agrokhimikativ, dozvolenykh do vykorystannya v Ukrayini. Ministerstvo okhorony navkolyshn'yogo pryrodnoho seredovishcha Ukrayiny. – Kyiv, 2009. – 304s./
- Жиденко А.А., Мищенко Т.В., Полетай В.М. Влияние гербицидов различной химической структуры на липидный обмен в печени карпа // Укр. биохим. журнал. – 2010. – Т.82, №42. – С. 179. /Zhidenko A.A., Mishchenko T.V., Poletay V.M. Vliyaniye gerbitsidov razlichnoy khimicheskoy struktury na lipidnyy obmen v pecheni karpa // Ukr. biokhim. zhurnal. – 2010. – T.82, №42. – S. 179./
- Зубкова Л.А. Бактериальная флора органов и тканей сазана (*Cyprinus carpio*) // Труды Касп. НИИРХ. – 1965. – Т.20. – С. 117–121. /Zubkova L.A. Bakterial'naya flora organov i tkaney sazana (*Cyprinus carpio*) // Trudy Kasp. NIIRKh. – 1965. – T.20. – S. 117–121./
- Зубкова Л.А. К вопросу о нормальной микрофлоре волжского судака (*Lucioperca lucioperca*) // Труды Касп. НИИРХ. – 1966. – Т.22. – С. 81–85. /Zubkova L.A. K voprosu o normal'noy mikroflоре volzhskogo sudaka (*Lucioperca lucioperca*) // Trudy Kasp. NIIRKh. – 1966. – T.22. – S. 81–85./
- Коваленко О.М., Жиденко А.О. Гістологічні зміни в організмі риб під впливом пестицидів // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Серія: біологія. – 2005. – Т.26, №3. – С. 208–210. /Kovalenko O.M., Zhidenko A.O. Gistologichni zminy v organizmi ryb pid vplyvom pestytsydiv // Naukovi zapysky Ternopil'skogo natsional'nogo pedagogichnogo universytetu im. V. Gnatyuka. Seriya: biologiya. – 2005. – T.26, №3. – S. 208–210./
- Краткий определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулт. – Москва: Мир, 1980. – 495с. /Kratkiy opredelitel' bakteriy Berdzhii / Pod red. Dzh. Hoult. – Moskva: Mir, 1980. – 495s./
- Кузнецова Е.М., Чмиль В.Д. Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков // Современные проблемы токсикологии. – 2010. – №1. – С. 87–95. /Kuznetsova Ye.M., Chmil' V.D. Glifosat: povedeniye v okruzhayushchey srede i urovni ostatkov // Sovremennyye problemy toksikologii. – 2010. – №1. – S. 87–95./
- Кузьмина В.В. Защитная функция пищеварительного тракта рыб // Вопросы ихтиологии. – 1995. – Т.35, №1. – С. 86–93. /Kuz'mina V.V. Zashchitnaya funktsiya pishchevaritel'nogo trakta ryb // Voprosy ikhtologii. – 1995. – T.35, №1. – S. 86–93./
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – Москва: Высшая школа, 1990. – 352с. /Lakin G.F. Biometriya. – Moskva: Vysshaya shkola, 1990. – 352s./
- Ларцева Л.В., Катунин Д.Н. Микрофлора рыб – биоиндикатор загрязнения дельты Волги // Водные биоресурсы, воспроизводство и экология гидробионтов. – Москва: ВНИИПРХ, 1993. – Вып.69. – С. 155–163. /Lartseva L.V., Katunin D.N. Mikroflora ryb – bioindikator zagryazneniya del'ty Volgi // Vodnyye bioresursy, vosproizvodstvo i ekologiya gidrobiontov. – Moskva: VNIIPRKh, 1993. – Vyp.69. – S. 155–163./
- Методы общей бактериологии. Т.3 / Под ред. Ф.Герхардта. – Москва: Мир, 1984. – 264с. /Metody obshchey bakteriiologii. T.3 / Pod red. F.Gerkhardta. – Moskva: Mir, 1984. – 264s./
- Мусселиус В.А., Ванятинский В.Ф., Вихман А.А. и др. Лабораторный практикум по болезням рыб. – Москва: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 296с. /Musselius V.A., Vanyatinskiy V.F., Vikhman A.A. i dr. Laboratornyy praktikum po boleznyam ryb. – Moskva: Legkaya i pishchevaya promyshlennost', 1983. – 296s./

- Никитенко В.И., Копылов В.А., Никитенко М.В. Транслокация бактерий из желудочно-кишечного тракта – естественный защитный механизм // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2004. – № 2–3. – С. 16–18. /Nikitenko V.I., Kopylov V.A., Nikitenko M.V. Translokatsiya bakteriy iz zheludочно-kishechnogo trakta – yestestvennyy zashchitnyy mekhanizm // Gastroenterologiya Sankt-Peterburga. – 2004. – № 2–3. – S. 16–18./
- Онисковець М. Показники імунного статусу риб у біомоніторингу важких металів у навколишньому середовищі // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2012. – Вип.60. – С. 190–197. /Onyskovets' M. Pokaznyky imunnogo statusu ryb u biomonitoryngu vazhkykh metaliv u navkolyshn'omu seredovyschi // Visnyk L'viv'skogo universytetu. Seriya biologichna. – 2012. – Vyp.60. – S. 190–197./
- Панин С.А. Эколого-токсикологические аспекты аквакультуры // Биологические основы аквакультуры в морях европейской части СССР. – Москва: Наука, 1985. – С. 65–72. /Panin S.A. Ekologo-toksikologicheskiye aspekty akvakul'tury // Biologicheskkiye osnovy akvakul'tury v moryakh yevropeyskoy chasti SSSR. – Moskva: Nauka, 1985. – S. 65–72./
- Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні: спец. вип. журналу «Пропозиція нова» / Під ред. В.У.Яшук, Д.В.Іванова, Р.М.Кривошея та ін.; Міністерство екології та природних ресурсів України. – Київ: Юнівест Медіа, 2012. – 831с. /Perelik pestytsydiv i agrokhimikativ, dozvolenykh do vykorystannya v Ukraini: spets. vyp. zhurnalu «Propozytsiya nova» / Pid red. V.U.Yashchuk, D.V.Ivanova, R.M.Kryvoshеya ta in.; Ministerstvo ekologiyi ta pryrodnykh resursiv Ukrainy. – Kyiv: Yunivest Media, 2012. – 831s./
- Просьяная В.В., Хуторной П.Б. Бактериальная флора белого амура в условиях неудовлетворительного гидрохимического режима // Сб. научных трудов. – Москва: ВНИИПРХ, 1979. – Вып.23. – С. 66–68. /Prosyayana V.V., Khutornoy P.B. Bakterial'naya flora belogo amura v usloviyakh neudovletvoritel'nogo gidrokhimicheskogo rezhima // Sb. nauchnykh trudov. – Moskva: VNIIPRKh, 1979. – Vyp.23. – S. 66–68./
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Москва: Высшая школа, 1973. – 320с. /Rokitskiy P.F. Biologicheskaya statistika. – Moskva: Vysshaya shkola, 1973. – 320s./
- Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ. – Киев: Наукова думка, 1982. – 280с. /Smirnov V.V., Reznik S.R., Vasilevskaya I.A. Sporoobrazuyushchiye aerobnye bakterii – produtsenty biologicheskii aktivnykh veshchestv. – Kiyev: Naukova dumka, 1982. – 280s./
- Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных. – Киев: Изд-во АН СССР, 1983. – 50с. /Smirnov V.V., Reznik S.R., Sorokulova I.B. Metodicheskkiye rekomendatsii po vydeleniyu i identifikatsii bakteriy roda *Bacillus* iz organizma cheloveka i zhivotnykh. – Kiyev: Izd-vo AN SSSR, 1983. – 50s./
- Смирнов В.В., Сорокулова И.Б., Пинчук И.В. Бактерии рода *Bacillus* – перспективный источник биологически активных веществ // Микробиологический журнал. – 2001. – Т.63, №1. – С. 72–79. /Smirnov V.V., Sorokulova I.B., Pinchuk I.V. Bakterii roda *Bacillus* – perspektivnyy istochnik biologicheskii aktivnykh veshchestv // Mikrobiologichnyy zhurnal. – 2001. – T.63, №1. – S. 72–79./
- Смірнов В.В., Косюк І.В. Адгезивні властивості бактерій роду *Bacillus* – компонентів пробіотика // Микробиологічний журнал. – 1997. – Т.59, №6. – С. 36–43. /Smirnov V.V., Kosyuk I.V. Adgezyvni vlastyivosti bakteriy rodu *Bacillus* – komponentiv probiotyka // Mikrobiologichnyy zhurnal. – 1997. – T.59, №6. – S. 36–43./
- Справочник по пестицидам: гигиена, применение, токсикология / Под ред. А.В.Павлова. – Киев: Урожай, 1986. – 432с. /Spravochnik po pestitsidam: gigiyena, primeneniye, toksikologiya / Pod red. A.V.Pavlova. – Kiyev: Urozhay, 1986. – 432s./
- Суслова М.Ю. Распространение и разнообразие спорообразующих бактерий рода *Bacillus* в водных экосистемах. Автореф. дис. ... канд. биол. наук / 03.00.16, 03.00.07 – экология. – Улан-Удэ, 2007. – 20с. /Suslova M.Yu. Rasprostraneniye i raznobraziye sporoobrazuyushchikh bakteriy roda *Bacillus* v vodnykh ekosistemakh. Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk / 03.00.16, 03.00.07 – ekologiya. – Ulan-Ude, 2007. – 20s./
- Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – Москва: Агропромиздат, 1987. – 239с. /Tepper Ye.Z., Shil'nikova V.K., Pereverzeva G.I. Praktikum po mikrobiologii. – Moskva: Agropromizdat, 1987. – 239s./
- Хлебович В.В. Акклимация животных организмов. – Ленинград: Наука, 1981. – 136с. /Khlebovich V.V. Akklimatsiya zhivotnykh organizmov. – Leningrad: Nauka, 1981. – 136s./
- Чахава О.В., Горская Е.М., Рубан С.З. Микробиологические и иммунологические основы гнотобиологии. – Москва: Медицина, 1982. – 159с. /Chakhava O.V., Gorskaya Ye.M., Ruban S.Z. Mikrobiologicheskkiye i immunologicheskkiye osnovy gnotobiologii. – Moskva: Meditsina, 1982. – 159s./
- Bowers A., Alexander J.B. In vitro and in vivo passage of bacteria across restricted areas and isolated tissues of trout, *Salmo trutta* and *S. gairdneri* // Journal of Fish Diseases. – 1982. – Vol.5, no 2. – P. 145–151.
- Crabbé P., Nash D., Bazin H. et al. Immunohistochemical observations on lymphoid tissues from conventional and germ-free mice // Laboratory Investigation. – 1970. – Vol.22, no 5. – С. 448–457.

Haenel H., Schulze J. Contributions of gnotobiology to nutrition science // *Folia Microbiologica*. – 1979. – Vol.24, no 3. – P. 197–204.

Margolis L. Aerobic bacteria in the intestines and slim of the pike (*Esox lucius*) // *Revue Canadienne de Biologie*. – 1953. – Vol.11. – P. 20–48.

Trust T.J., Bull L.M., Currie B.R., Buckley J.T. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), Gold fish (*Carassius auratus*), and Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. – 1979. – Vol.36, no 10. – P. 1174–1179.

Trust T.J., Sparrow R.A.H. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1974. – Vol.20, no 9. – P. 1219–1228.

Tzannetis S., Papavassiliou J. In vitro antagonism by bacteriocin-like substances between bacteria of normal and transient flora of surface brackish water // *Lab. 6-th Symp. Microb. Ecol.* – 1992. – No 6. – P.236.

Представлено: В.О.Агеєв / Presented by: V.O.Ageyev

Рецензент: Д.А.Шабанов / Reviewer: D.A.Shabanov

Подано до редакції / Received: 28.11.2016