

что при загрязнении нефтепродуктами донных отложений (нерестового субстрата) в местах нереста бентосоядных рыб (в частности, бычков) могут произойти нарушения эмбрионального и постэмбрионального развития и, как следствие, - снижение количества выклюнувшихся мальков и ухудшение выживаемости молоди.

Выделение из воды Азовского и Черного морей перспективных для биотестирования штаммов биолюминесцентных бактерий

М.А. Сазыкина, И.Е. Цыбульский

Среди разрабатываемых в настоящее время методов биотестирования особое место занимают методы оценки токсичности по изменению люминесценции светящихся бактерий, а также отдельных ферментативных систем этих бактерий. Простота измерения люминесценции, экспрессность и высокая чувствительность метода, возможность автоматизации измерений и статистической обработки данных обеспечивают светящимся бактериям несомненное преимущество по сравнению с другими биологическими тестами. Так, фирмой Microbics Operations of Beckman Instruments, Inc. (США) разработан современный тест-реагент на основе лиофилизированных морских люминесцентных бактерий *Photobacterium phosphoreum*. Этот биосенсор, получивший торговую марку Микротокс (Microtox 5TM), нашел широкое применение в «быстрой токсикологии» во многих странах. Морская биолюминесцентная бактерия *Vibrio fischeri* оказалась более чувствительной при детекции токсичности морской воды по сравнению с *Artemia franciscana* (Kungolos et al., 2003).

Основные задачи наших исследований заключались в выделении, идентификации, разработке методов хранения, определении чувствительности светящихся аборигенных бактерий и разработке на их основе метода оценки токсичности компонентов среды морских рыбохозяйственных водоемов.

Материалы и методы исследования

Выделение биолюминесцентных бактерий из проб воды, отобранных в районе мыса Б. Утриш (Черное море) и в Темрюкском заливе Азовского моря проводили методом мембранных фильтров.

В ходе фильтрации бактерии концентрировали на мембранном фильтре и затем выращивали на специально подобранных селективных средах. При этом использовали оригинальные среды с

учетом солености воды Азовского и Черного морей. При визуальном обнаружении люминесценции выделяли чистую культуру бактерий, отбирая и высеивая светящиеся колонии. Разработанный способ выделения светящихся бактерий и состав питательных сред защищены заявками о выдаче патента РФ на изобретение (Сазыкина, Цыбульский, заявки от 16.04.2007).

Предварительную идентификацию выделенных штаммов проводили, используя стандартные методы, применяемые в микробиологии, а также в соответствии с рекомендациями по быстрой идентификации фотобактерий семейства *Vibrionaceae* (Определитель..., 1997). При этом оценивали морфологические свойства бактерий, характеристики роста и биолюминесценции при различных температурах, ферментативные свойства.

Окончательная идентификация 2-х перспективных для биотестирования штаммов (до вида) выполнена методом генетического анализа в ФГУП «ГосНИИГенетика». Определение проводили по результатам исследования секвенсов вариабельных участков 16S рДНК штаммов микроорганизмов (с гомологией нуклеотидных последовательностей не менее 97 %).

Для хранения выделенных штаммов светящихся бактерий разработаны и апробированы различные методы, в том числе: субкультивирование (периодический пересев на свежие питательные среды), замораживание при различных температурах (-12 °С, -60 °С, хранение в жидком азоте), лиофилизация.

Чувствительность светящихся бактерий к различным токсикантам (нефтепродукты, тяжелые металлы, бихромат калия, фенол, додецилсульфат натрия) в диапазоне концентраций от 0.001 мг/л до 20.0 г/л определяли у всех выделенных штаммов.

Собственно сама методика тестирования заключалась в предварительном выращивании штаммов на питательном агаре при температуре 20 °С в течение 18 часов. Затем подготавливалась суспензия ночной культуры светящихся бактерий с определенной оптической плотностью и специально подобранным составом культуральной среды. Измерение интенсивности биолюминесценции культур, содержащих анализируемые соединения, а также контрольных культур проводили на люминометре ЛТ-01.

Разработка метода биотестирования экстрактов донных отложений с использованием светящихся бактерий заключалась в определении оптимальных соотношений грунт:экстрагент (вода), объема вводимого

в тест-систему экстракта, условий постановки реакции, калибровки методики. Водные экстракты готовили, встряхивая пробы на орбитальном шейкере при 200-250 об./мин. в течение одного часа, затем отстаивали до оседания взвеси (Корпакова, Цыбульский, 2005). Отстоявшиеся экстракты фильтровали через сифон (капроновая сеть № 76) и использовали в дальнейших исследованиях токсичности.

Для оценки токсичности применялась схема, поддержанная большинством авторов в токсикологических исследованиях с использованием в качестве тест-объектов гидробионтов. Отклонение интенсивности свечения в тестируемой пробе относительно контроля (как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения) менее 20 % свидетельствует об отсутствии токсичности, от 20 до 30 % - о слабой токсичности, от 30 до 50 % - умеренной, свыше 50 % - о сильной, что соответствовало индексу токсичности (Т) в баллах «0» до «3» (Петросян и др., 1996; Дятлов, 2000; Корпакова, Цыбульский, 2005).

Методика тестирования апробирована на экстрактах донных отложений, отобранных в акватории морского порта и в условно чистом морском лимане.

Результаты и обсуждение

В ходе работы было выделено 16 штаммов светящихся бактерий: 2 штамма из воды Азовского моря и 14 - из Черного. Для культивирования различных видов светящихся бактерий апробировано 11 сред (по составу от простых до сложных) и отобрано 2 наиболее оптимальных. Наибольшее количество колоний из воды, отобранной в Азовском и Черном морях, высевалось на средах на основе питательного агара.

Одной из главных характеристик, определяющих диагностические свойства светящихся бактерий как тест-организма, является способность к биолюминесценции. На рисунке 1 представлены фотографии всех 16 штаммов светящихся бактерий, выделенных из воды Азовского и Черного морей. На фотографии видна различная интенсивность свечения штаммов. Голубой оттенок свечения, характерный для штаммов № 1, 3, 8, 9 и 12, свидетельствует о сдвиге максимума свечения в коротковолновую область спектра по сравнению с остальными штаммами, светящихся зеленым цветом.

В качестве фенотипических признаков, используемых при идентификации бактерий семейства *Vibrionaceae*, рассматривали размер и форму клеток, пигментацию, физиологические характеристики определяли по способности роста и люминесценции при температурах от 4 до 40 °С.

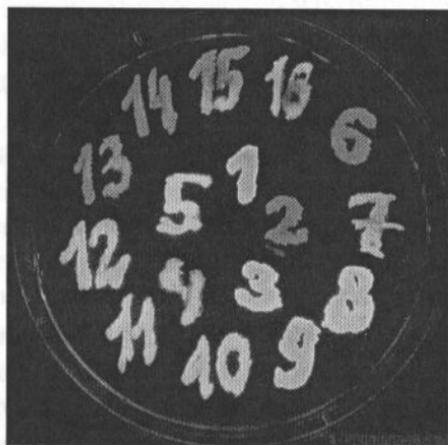


Рис. 1. Фотографии штаммов (№ 1-16) светящихся бактерий, выделенных из воды Азовского и Черного морей

Биохимическая характеристика выделенных штаммов заключалась в изучении возможности ферментации бактериями различных сахаров (глюкозы, сахарозы, лактозы, арабинозы, мальтозы) и сахароспиртов (маннита, инозита, сорбита), утилизации цитрата натрия и малоната натрия. С помощью стандартных тест-систем определяли наличие в выделенных бактериях лизиндекарбоксилазы, фенилаланиндезаминазы, уреазы, аргининдегидролазы, орнитиндекарбоксилазы, β -галактозидазы, возможность образования индола, ацетилметилкарбинола, сероводорода. Анализ полученных данных и сопоставление со свойствами бактерий семейства *Vibrionaceae* по определителю бактерий Берджи (1997) дает основание отнести штаммы:

№ 1, 2, 3, 6, 9, 14 – к роду *Vibrio* sp.;

№4, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15, 16 – к виду *Vibrio fischeri*;

№ 8, 12 – к роду *Photobacterium* sp.

По результатам проведенного анализа секвенсов переменных участков 16S рДНК перспективные для биотестирования штаммы микроорганизмов (выделенные нами под № 10 и 15) относятся к различным видам *Vibrio fischeri* с гомологией нуклеотидных последовательностей 99 и 98 %. После завершения процедуры депонирования в ФГУП «ГосНИИГенетика» была подтверждена видовая принадлежность этих штаммов. В настоящее время два вида светящихся бактерий *Vibrio fischeri* приняты на национальное патентное депонирование в ФГУП «ГосНИИГенетика» под регистрационными номерами ВКПМ В-9579 и ВКПМ В-9580.

Разработка методов хранения светящихся бактерий. Разработка тест-системы для определения токсичности компонентов среды невозможна без решения практических задач по культивированию и поддержанию тест-объектов (светящихся бактерий) в функционально активном состоянии. Для хранения выделенных штаммов светящихся бактерий разработаны, апробированы и успешно применяются различные методы, в том числе: субкультивирование; замораживание при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$; ультразамораживание (хранение в жидком азоте) и лиофилизация.

Использование традиционных методов хранения культур стало возможно после их определенных доработок и модернизаций. Так, при хранении бактерий традиционным методом субкультивирования на скошенном питательном агаре экспериментальным путем была подобрана оптимальная частота пересевов.

Подбор и использование криопротекторов в определенной концентрации (сахароза и глицерин) позволило предотвратить повреждающее действие кристаллов льда на клетки и таким образом увеличить сохранность замораживаемых бактерий. Применение криопротекторов (сахароза, глицерин) позволило снизить число погибших клеток на 3 порядка при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (табл. 1). Еще более эффективно действие криопротекторов проявилось при более низких температурах ($-60\text{ }^{\circ}\text{C}$) – в растворе сахарозы количество жизнеспособных клеток снижается приблизительно в 10 раз, а в 20%-ном глицерине – более чем в 4 раза.

Таблица 1

Выживаемость клеток при различных способах замораживания и хранения
(на примере штамма № 16)

Среда хранения	Условия хранения							
	Замораживание при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$		Замораживание при $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$		Хранение в жидком азоте		Ллиофилизация	
	до	после	до	после	до	после	до	после
Среда без криопротектора	$2,0 \cdot 10^{10}$	$2,0 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^{10}$	$1,3 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^{10}$	$1,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^{10}$	$1,8 \cdot 10^4$
Среда для лиофилизации с сахарозой	$1,0 \cdot 10^{10}$	$1,3 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^{10}$	$0,6 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^{10}$	$0,66 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^7$
Среда для замораживания с глицерином	$1,0 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$0,25 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$0,73 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$

Использование криопротекторов при ультразамораживании клеток в жидком азоте позволило почти полностью сохранять клетки светящихся бактерий в жизнеспособном состоянии. Особенно эффективно проявилось защитное действие 27%-ного глицерина.

Хранение бактерий в замороженном состоянии при низких температурах (-70 °С и жидкий азот) в течение 24 месяцев показало, что выделенные штаммы бактерий сохраняют свою жизнеспособность и полностью - билюминесцентные свойства. Возможно, что данный способ можно использовать и в течение более длительного срока.

Для достижения наилучших результатов по выживанию и восстановлению клеток разработана методика медленного охлаждения: криопробирки с культурами помещали на 1 ч в морозильную камеру обычного холодильника, затем на 1 ч в морозильник при температуре -60 °С, а затем - в жидкий азот.

При постановке биологических тестов наиболее удобно использование лиофилизированных препаратов бактерий. При разработке данного метода хранения культур в качестве криопротекторов также использовались сахароза и глицерин, хорошо зарекомендовавшие себя при криоконсервации. Как показали результаты предварительных испытаний, лиофилизация вызывает снижение количества жизнеспособных клеток на 2-3 порядка в зависимости от используемого криоконсерванта (см. табл. 1).

Определение чувствительности выделенных штаммов светящихся бактерий к приоритетным токсикантам. Чувствительность выделенных штаммов светящихся бактерий к **нефтепродуктам** определялась на сырой нефти, дизельном топливе и подсланевой (ляльной) воде из машинного отделения судна в концентрациях от 0,001 мг/л до 20,0 г/л. В отдельных опытах были подобраны оптимальные концентрации неполярного детергента Tween-80 (0,1-0,5 %), способствующие образованию стойких эмульсий нефтепродуктов и при этом не оказывающих заметного влияния на билюминесценцию.

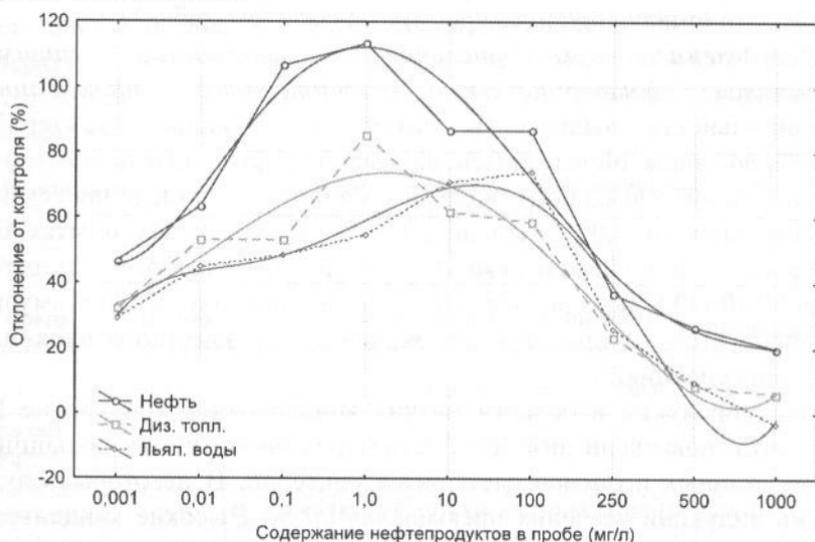
Нефтепродукты в области низких концентраций (на уровне ПДК - 0,05 мг/л) повышали интенсивность билюминесценции большинства апробированных штаммов светящихся бактерий. В некоторых случаях степень индукции свечения превышала 100 %. Высокие концентрации нефтепродуктов - на уровне 100-1000 мг/л меньше влияли на свечение выделенных бактерий, а увеличение концентрации нефти до 5000 мг/л и выше вызывало заметное ингибирование билюминесценции.

Под влиянием нефтепродуктов в диапазоне концентраций от

0,01 до 10,0 мг/л индукция биолюминесценции штаммов № 3, 8, 10 и 15 аборигенных бактерий была заметно выше (до 100-150 %), чем ингибирование свечения штамма *E.coli* PT-5, используемого для коррекции токсичности проб при определении генотоксичности.

Светящиеся бактерии штамма *Vibrio fischeri* ВКПМ В-9579, по данным 4-х независимых испытаний, проявляли наиболее высокую чувствительность к действию нефтепродуктов. Результаты одного из тестирований представлены на рисунке 2. Нефть, начиная с концентрации 0,01 мг/л, стимулировала свечение на 63 %, а в концентрации 0,1-10,0 мг/л увеличение интенсивности свечения достигало 106-113 %. Льяльные воды, дизельное топливо также увеличивали свечение этого штамма (максимально – до 60-80 %). Индукция свечения наблюдалась в широком диапазоне испытанных концентраций нефтепродуктов – от 0,01 до 250 мг/л.

Штамм *Vibrio fischeri* ВКПМ В-9580 проявил среднюю, по сравнению с другими выделенными штаммами, чувствительность к нефтепродуктам, однако максимальная индукция (на 31-54 %) свечения наблюдалась уже при концентрации токсикантов 0,01 мг/л, штамм обладал высокой стабильностью свечения и, как будет показано ниже, чувствительностью к другим соединениям.



$$\begin{aligned} \text{Нефть} &= 91,9463-110,3695 \cdot x+82,4385 \cdot x^2-20,3717 \cdot x^3+2,0304 \cdot x^4-0,0716 \cdot x^5 \\ \text{Диз. топл.} &= 33,3354-11,7173 \cdot x+14,1848 \cdot x^2-2,4959 \cdot x^3+0,0463 \cdot x^4+0,0075 \cdot x^5 \\ \text{Льял. воды} &= -41,6663+127,2847 \cdot x-74,0799 \cdot x^2+20,4625 \cdot x^3-2,5232 \cdot x^4+0,1106 \cdot x^5 \end{aligned}$$

Рис. 2. Изменения интенсивности биолюминесценции штамма *Vibrio fischeri* ВКПМ В-9579 под влиянием нефтепродуктов, %

На следующем этапе работы определялась чувствительность биолюминесценции выделенных штаммов к действию других токсикантов - $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $K_2Cr_2O_7$, додецилсульфата натрия (ДСН) и фенола. Выбранные соли тяжелых металлов, фенол, додецилсульфат натрия и, главным образом, бихромат калия, являются стандартными токсикантами, которые используются для калибровки биотестов в токсикологических исследованиях. Для сравнительной оценки чувствительности использовали характеристику EC_{50} (effective concentration) – концентрацию вещества, вызывающую 50%-ное снижение биолюминесценции бактериальной суспензии в течение 30 мин.

Полученные данные позволили достаточно точно определить величину EC_{50} выделенных штаммов и сравнить по этому показателю с чувствительностью светящихся бактерий, применяемых в известных биотестах.

Полученные данные по чувствительности выделенных штаммов светящихся бактерий ко всем исследованным токсикантам представлены в сводной таблице 2. В таблице также приводятся данные по чувствительности к этим же токсикантам штаммов *Ph. phosphoreum* (Cohn) Ford, которые рекомендованы для биотестирования воды на территории Украины, а также чувствительность lux-штамма *E. coli* PT-5 (этот штамм параллельно с SOS-lux-штаммом используется в наших исследованиях по определению генотоксичности природных проб).

Сравнение чувствительности выделенных штаммов к токсическим веществам с чувствительностью штамма *Ph. phosphoreum* (Cohn) Ford показало, что большинство выделенных штаммов более чувствительны, чем данный тест-штамм. В частности, в среднем они приблизительно в 10 раз чувствительней к $ZnSO_4$ и $K_2Cr_2O_7$.

Величина EC_{50} для бихромата калия у большинства выделенных штаммов находится в диапазоне концентраций от 10 до 50 мг/л, у штаммов № 13 и 14 - от 1 до 10 мг/л, что соответственно, как минимум, в 5-25 раз ниже по сравнению с EC_{50} для *Ph. phosphoreum*.

Сравнение чувствительности штаммов к токсическим веществам с чувствительностью lux-штамма *E. coli* PT-5 показало аналогичные результаты. За исключением $ZnSO_4$, практически все штаммы более чувствительны к $CuSO_4$ (в 2,5-5,0 раз), ДСН (в 2-6 раз), $K_2Cr_2O_7$ (в 3-15 раз), а также к фенолу (в 2-3 раза).

Хувствительность биолюминесценции выделенных штаммов светящихся бактерий к действию различных токсических веществ, мг/л

Штамм		Чувствительность к нефтепродуктам	EC ₅₀ , мг/л				
			ZnSO ₄	CuSO ₄	ДСН	K ₂ Cr ₂ O ₇	Фенол
1	Vibrio sp.		5	2-3	>200	10-50	>200
2	Vibrio sp.		>7,5	3-4	10-50	10-50	>200
3	Vibrio sp.	Высокая	4-5	2-3	>200	100	>200
4	Vibrio fischeri		5-7,5	5	200-300	10-50	200-300
5	Vibrio fischeri		>7,5	1,5-2	75-100	10-50	>200
6	Vibrio sp.		4-5	1,5-2	200	10-50	150
7	Vibrio fischeri		5-7,5	3-4	>300	10-50	100
8	Photobacterium sp.	Высокая	1,5-2	2-3	>300	75-100	>300
9	Vibrio sp.		2	2	>300	50-75	>200
10	Vibrio fischeri В 9579	Высокая	2-3	1-1,5	150	10-50	125-150
11	Vibrio fischeri		>7,5	3	75-100	10-50	300
12	Photobacterium sp.		5-7,5	5-7,5	50-75	100-125	200
13	Vibrio fischeri		7,5	2-3	>300	1-10	300
14	Vibrio sp.		5-7,5	2-3	>300	1-10	300
15	Vibrio fischer В 9580	Высокая	4-5	2	200	10-50	125-150
16	Vibrio fischeri		1,5-2	1-1,5	>300	10-50	125-150
E.coli PT-5			2-3	5-7,5	300	150	>300
Ph. phosphoreum (Cohn) Ford			35		70	250	170

Примечание: выделенные фоном цифры указывают на диапазон концентраций токсикантов, в котором значения EC₅₀ для выделенных штаммов заметно ниже по сравнению с аналогами.

Это свидетельствует о перспективности использования выделенных штаммов для определения токсичности водных сред. Наибольший интерес представляет реакция светящихся бактерий на низкие концентрации загрязнителей, сопоставимые с уровнем ПДК. Перспективные для разработки метода биотестирования штаммы № 10 (*Vibrio fischeri* ВКПМ В-9579) и 15 (*Vibrio fischeri* ВКПМ В-9580), а также другие наиболее чувствительные к апробированным токсикантам штаммы (№ 3, 8 и 16) исследовали в тест-реакциях с концентрациями загрязнителей от 0,00001 мг/л до 10 мг/л, где изучали их влияние на интенсивность люминесценции.

Как и в случае с нефтепродуктами, наблюдается аналогичная закономерность – низкие концентрации токсикантов вызывают у бактерий стабильную индукцию биолюминесценции, а более высокие – ее подавление. На представленных ниже графиках хорошо видно, что зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации токсиканта описывается полиномом второй степени (рис. 3).

Так, медь в концентрации 0,001-0,005 мг/л (ПДК меди – 0,005 мг/л) повышает люминесценцию в пределах 30-40 % у штаммов № 10, 15 и 16 (рис. 3). При концентрациях меди, начиная с 0,05-0,10 мг и выше наблюдается заметное «тушение» биолюминесценции. Величина EC_{50} , как следует из графиков, для штаммов № 3, 10, 15 и 16 составляет около 1,0 мг/л (в 5 раз ниже, чем для штамма E.coli PT-5), что свидетельствует о высокой чувствительности выделенных штаммов.

Цинк в концентрации 0.001 - 0.01 мг/л (ПДК цинка - 0.05 мг/л) повышает интенсивность биолюминесценции штамма №16 более чем на 40%, а штаммов № 10 и 15 – в пределах 30%.

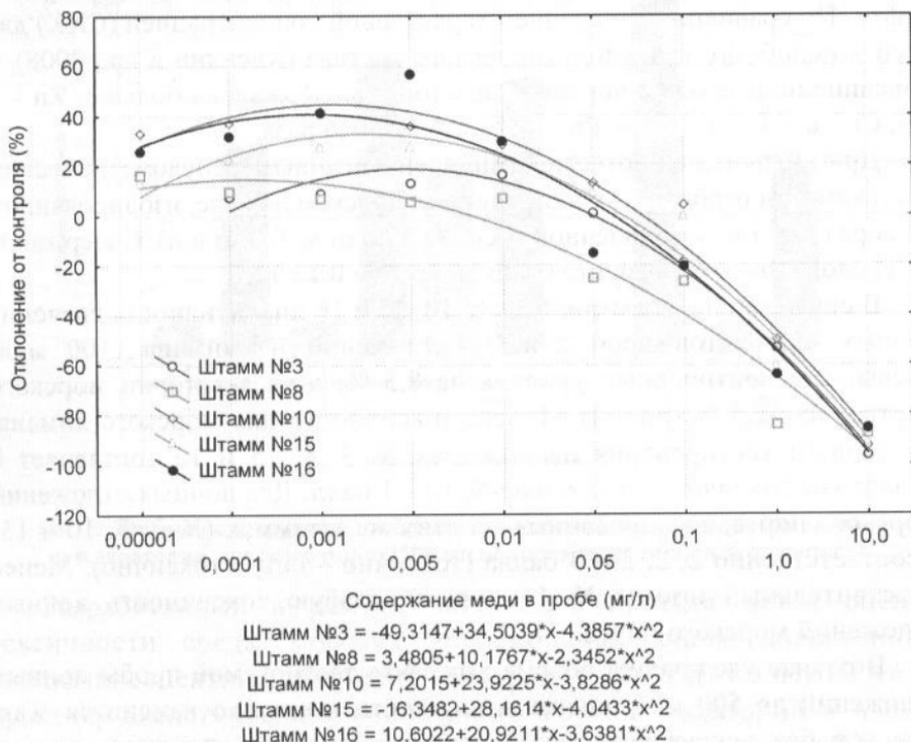


Рис. 3. Чувствительность биолюминесценции выделенных штаммов светящихся бактерий к действию меди, %

Стандартный токсикант, бихромат калия, в концентрации 0,001- 0,01 мг/л заметно (на 31-50 %) повышал интенсивность биолюминесценции штаммов № 10 и № 16, а при более высоких концентрациях (начиная с 1,0 мг/л) – ингибировал свечение.

Фенол и додецилсульфат натрия в концентрациях 0,00001-10,0 мг/л в целом оказывали сходное с бихроматом калия влияние на интенсивность биолюминесценции испытанных штаммов.

Разработка метода биотестирования компонентов среды морских водоемов на основе выделенных штаммов светящихся бактерий. Исследования показали, что морская вода, как универсальный растворитель, в соотношении с грунтом 10:1 дает наиболее объективную картину токсичности проб донных отложений.

Метод определения токсичности отработывался на донных отложениях, отобранных в районах Азовского моря с высокой (морской порт) и низкой (условно чистый лиман) антропогенной нагрузкой. В объединенной пробе донных отложений из акватории морского порта аналитическими методами было обнаружено 6,0 г/кг грунта углеводородов нефти. По сравнению со средней характерной концентрацией (СХК) для грунта подобного гранулометрического состава (Кленкин и др., 2008), в объединенной пробе с портовой акватории содержалось больше Zn – в 2,3, Cr – в 1,4, Cu – в 1,9, Pb – в 2,3 и As – в 1,6 раза.

Другой грунт для биотестирования саналогичным гранулометрическим составом был отобран в условно чистом морском лимане, изолированном от моря естественной галечной косой (в 5 км от м. Б. Утриш). Содержание углеводородов в этом грунте было на уровне 0,1 г/кг.

В среднем для штаммов № 3, 8, 10, 15 и 16 интенсивность свечения водных экстрактов проб донных отложений из лимана (100 мкл) превышала контрольный уровень на 8,3 %, а из акватории морского порта – на 42,5 % (рис. 4). Индекс токсичности для морского лимана, по данным тестирования на штаммах № 3, 8, 15 и 16 составляет 0 баллов (не токсично), на штамме № 10 – 1 балл. Для донных отложений морского порта, тестированных на этих же штаммах (№ 3, 8, 10 и 15) – соответственно 2, 2, 2 и 3 балла (токсично – остро токсично). Менее чувствительный штамм № 16 показал слабую токсичность донных отложений морского порта.

В случае увеличения объема экстракта тестируемой пробы донных отложений до 500 мкл оценка токсичности несколько изменится. Так, уже все без исключения апробированные штаммы показали острую токсичность донных отложений морского порта (3 балла). При этом

отклонения от контроля для большинства штаммов были отрицательными и составили более 50 %, что вполне согласуется с результатами наших исследований биолюминесценции выделенных штаммов под влиянием различных токсикантов, показавших как активацию, так и ингибирование свечения в зависимости от их концентрации. Донные отложения морского лимана, по оценке штаммов № 3, 8, 15 и 16, были не токсичными, а по оценке одного из самых чувствительных штаммов (№ 10) - остро токсичными.

Следовательно, 100 мкл водного экстракта грунта (в соотношении 10:1) - оптимальный объем аликвоты для постановки теста с участием светящихся бактерий (рис. 4). В случае тестирования проб воды объем аликвоты может быть увеличен до 500 мкл.

Таким образом, апробация метода оценки токсичности одного из основных компонентов среды – донных отложений, продемонстрировала возможность использования депонированных штаммов *Vibrio fischeri* ВКПМ В-9579 и *Vibrio fischeri* ВКПМ В-9580 для биотестирования.

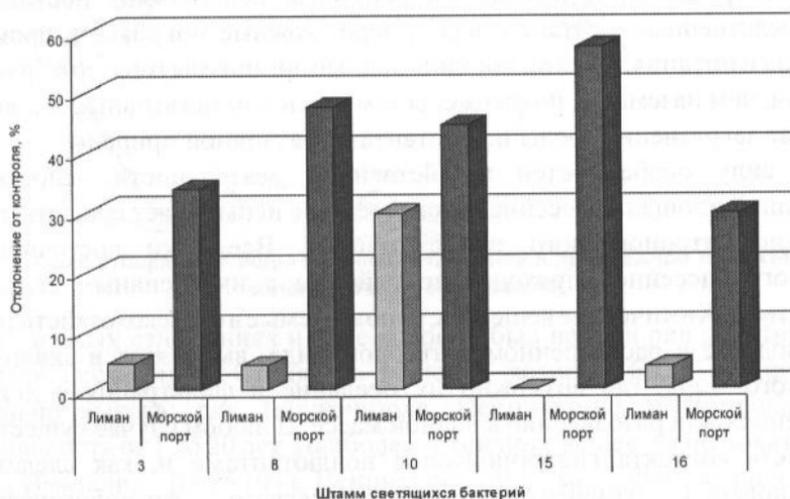


Рис. 4. Токсичность грунтов, отобранных в условно чистом морском лимане и в акватории морского порта (100 мл водного экстракта), в % от контроля

Разработанный в рамках настоящего проекта метод оценки токсичности среды морских водоемов на основе аборигенных биолюминесцентных бактерий внедрен в ФГУП «АЗНИИРХ» в практику экологического мониторинга морских акваторий в Азово-Черноморском бассейне. В частности, этот метод был апробирован при оценке токсичности среды в Керченком проливе и прилежащих

акваториях после аварии танкера в ноябре 2007 г.

На предложенную методику определения токсичности объектов окружающей среды на основе выделенных аборигенных бактерий *Vibrio fischeri* поданы 2 заявки о выдаче патента РФ на изобретение (Сазыкина, Цыбульский, заявка от 13.08.2007 и 03.07.2007).

Оценка степени токсичности среды для гидробионтов разных трофических уровней при загрязнении действующими веществами пестицидов

*Л.А. Бугаев, О.А. Зинчук, С.И. Катаскова, А.В. Войкина,
И.Н. Игнатенко, М.В. Матвейчук, Л.С. Радишевская, В.А. Баева*

Оценка загрязненности окружающей среды имеет важное значение для объяснения тех или иных феноменов, наблюдаемых в различных уровнях организации Жизни. Гидробионты испытывают постоянный непосредственный контакт с водой через кожные покровы, в процессе дыхания и питания. По этой причине водные организмы гораздо в большей степени, чем наземные, подвержены тем или иным негативным влияниям в случае загрязнения среды поллютантами различной природы.

В силу особенностей хозяйственной деятельности человека и небольшой площади бассейна, Азовское море испытывает существенный прессинг антропогенного происхождения. Все реки восточного и северного бассейнов проходят по районам с интенсивным сельским хозяйством. Химические вещества, используемые в сельскохозяйственном производстве в растворенном и твердом виде, выносятся в акваторию Азовского моря, где возможно их оседание и фильтрация в донных отложениях или разбавление в водной массе. В любом случае существует опасность контакта гидробионтов с поллютантами и, как следствие, возникновения изменений морфологического, физиологического, биохимического или генетического характера.

С целью исследования загрязнения донных отложений и воды действующими веществами современных пестицидов был произведен отбор проб в прибрежной зоне акватории Азовского моря. Выбор точек отбора проб совпадал с районами вылова рыб на токсикологический анализ, а также с особенностями географии: как правило, вблизи впадения рек или мест возможных активных турбулентных процессов, приводящих к усиленному оседанию и фильтрации веществ в донных отложениях (районы наносных кос). География отбора проб воды и донных отложений