

УДК 628.394.6:576.851.12(26)

НОВЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ТОКСИЧНОСТИ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ МОРСКИХ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ

© 2010 г. И. Е. Цыбульский*, М. А. Сазыкина**

*Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства

г. Ростов-на-Дону, 344002, e-mail: riasfp@aanet.ru; igor.aznirh@mail.ru

**Научно-исследовательский институт биологии Южного Федерального университета, г. Ростов-на-Дону, 344104, e-mail: @niib.sfedu.ru

Поступила в редакцию 04.08.2009 г.

Из воды Азовского и Черного морей выделено 16 штаммов светящихся бактерий, относящихся к родам *Vibrio* и *Photobacterium*. Два перспективных для биотестирования штамма идентифицированы генетическими методами до вида (*Vibrio fischeri* ВКПМ В-9579 и *V. fischeri* ВКПМ В-9580) и приняты на национальное патентное депонирование. Выделенные штаммы биолюминесцентных бактерий отличаются высокой индивидуальной чувствительностью (на уровне предельно допустимых концентраций для воды рыбохозяйственных водоемов (ПДК_{рх})) к нефтепродуктам, солям тяжелых металлов, додецилсульфату натрия (ДДС-Na) и фенолу. По величине ЕС₅₀ они на порядок чувствительней к солям тяжелых металлов и бихромату калия, в 2–6 раз – к ДДС-Na и фенолу по сравнению со штаммами *P. phosphoreum* (Cohn) Ford и *Escherichia coli* С600 (pPLS-5). Использование в качестве новых биосенсоров штаммов *Vibrio fischeri* ВКПМ В-9579 и *V. fischeri* ВКПМ В-9580 показало их высокую чувствительность и эффективность при определении токсичности среды морских экосистем.

В оценке качества водной среды значительную информативную ценность представляет биотестирование токсикологической опасности компонентов экосистемы с использованием различных биосенсоров, поскольку химическая характеристика анализируемых поллютантов не всегда может обеспечить оценку их токсичности и установить степень опасности для живых организмов. Особенно актуально внедрение биотестирования в систему мониторинга морских экосистем и контроля за потенциальными источниками загрязнения [1, 2].

Известны методы оценки токсичности по изменению люминесценции светящихся бактерий, а также отдельных ферментных систем этих бактерий. В течение нескольких минут тест-система на основе светящихся бактерий дает отклик на широкий спектр химических соединений: спирты, фенолы, тяжелые металлы, антибиотики, поверхностно-активные вещества (ПАВ) и др., превосходя по чувствительности известные физико-химические методы анализа [3].

В тест-системах в основном используются морские бактерии родов *Photobacterium* и *Vibrio*. Тест-реагент на основе лиофилизированных морских люминесцентных бактерий *Photobacterium phosphoreum* (торговая марка Микротокс) нашел широкое применение в “быстрой токсикологии” во многих странах [4]. Вместе с тем остается востребованным поиск новых биосенсоров, высоко чувствительных к приоритетным токсическим веществам (ТВ) и в то же

время адаптированных к естественным условиям морских экосистем.

Цель работы – выделение морских биолюминесцирующих бактерий, их идентификация, отбор наиболее чувствительных к приоритетным ТВ штаммов и их экспериментальное применение в качестве потенциальных биосенсоров для оценки токсичности среды.

МЕТОДИКА

Светящиеся бактерии выделяли из морской воды, отобранной в экологически чистых районах Азовского и Черного морей, не позже, чем через 2 ч после отбора проб. Клетки концентрировали на мембранных фильтрах диаметром 0.45 мкм (“Sartorius AG”, (Германия)) и выращивали на селективных средах, состав которых подбирали экспериментально с учетом солености воды в районе отбора проб (10–17‰). Способ выделения биолюминесцирующих бактерий и разработанные оригинальные среды описаны в изобретении [5].

Предварительное определение выделенных штаммов проводили в соответствии с рекомендациями по быстрой идентификации фотобактерий семейства *Vibrionaceae* [6]. Анализировались морфологические, физиологические и биохимические характеристики бактерий. Диагностику проводили с использованием биохимических пластин для дифференциации энтеробактерий производства ООО НПО “Диагностические системы” (Россия).

Окончательная идентификация до вида двух перспективных для биотестирования штаммов выполнена в “ФГУП ГосНИИ Генетика-ВКПМ” (Россия) по результатам анализа нуклеотидной последовательности (сиквенсов) вариабельных участков 16S рДНК тестируемых штаммов микроорганизмов.

Для хранения выделенных штаммов светящихся бактерий, кроме традиционного субкультивирования, использовались методы хранения при низких температурах (-18 , -60°C), консервация в жидком азоте, лиофилизация.

Для определения чувствительности штаммов биолюминесцирующих бактерий к различным ТВ готовили суспензию ночной культуры в 0.001 М трис-НСl-буфере, рН 7.4, с содержанием 0.01% глюкозы и 1.7% NaCl. Полученную суспензию ($A_{590} = 0.1$ ед.) разбавляли в 100 раз. Аликвоты (900 мкл) переносили в стерильные пробирки, добавляли 100 мкл раствора изучаемых веществ, тщательно перемешивали и инкубировали 30 мин при комнатной температуре (20°C). После инкубации измеряли интенсивность биолюминесценции на люминометре ЛТ-01 “НИИ биологии РГУ” (Россия) и выражали в условных единицах свечения (УЕС). Контрольная проба готовилась из той же самой суспензии, а вместо ТВ (или анализируемого на токсичность раствора) содержала 100 мкл 1.7%-ного NaCl.

В качестве ТВ в работе использовали: нефтепродукты (сырая нефть, дизельное топливо), нефтесодержащую (ляльную) воду из машинного отделения судна, сульфат меди(II) (CuSO_4), цинк сернокислый (ZnSO_4), бихромат калия ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), ДДС-Na ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$), фенол (х.ч., “Нева-Реактив”, (Россия)) в диапазоне концентраций от 0.001 до 1000 мг/л. Для получения стойких эмульсий нефтепродуктов использован неионное ПАВ Твин.-80 (“Amresco”, США).

Методика определения токсичности донных отложений заключалась в подготовке водного экстракта, аликвота которого (100 мкл) добавлялась в подготовленную, как описано выше, суспензию бактерий. Дальнейшая инкубация и определение интенсивности биолюминесценции также проводились по описанной выше методике. Аналогично определялась токсичность морской воды. Оценку токсичности пробы проводили по различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб. При этом учитывали как активацию, так и снижение интенсивности биолюминесценции. Все определения токсичности выполняли в трехкратной повторности.

Для оценки токсичности применялась схема, принятая в токсикологических исследованиях с использованием гидробактерий в качестве тест-объектов. Отклонение интенсивности свечения в тестируемой пробе относительно контроля менее 20% свидетельствовало об отсутствии токсичности. Все отклонения от контроля (как в сторону уменьше-

ния, так и в сторону увеличения) в пределах 20–30% характеризовали анализируемую пробу, как слабо токсичную, от 30 до 50% – умеренно, а свыше 50% – как остро токсичную, что соответствует индексу токсичности (Т) в баллах от 0 до 3 [2, 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Применение различных питательных сред для выделения и культивирования светящихся бактерий показало, что оптимальных результатов можно достичь, используя модифицированные нами среды на основе стерильной морской воды, либо раствора NaCl в концентрации, соответствующей солености воды в районе отбора проб (10 и 17%) [5].

Всего было выделено 16 штаммов. Все штаммы обладали высокой интенсивностью биолюминесценции (на уровне 0.5–5.8 УЕС), которая отмечалась и визуально в процессе роста колоний. Согласно определителю бактерий Берджи [8], 14 выделенных штаммов были отнесены к роду *Vibrio*, 2 штамма – к роду *Photobacterium*.

По результатам анализа сиквенсов вариабельных участков 16S рДНК наиболее перспективные для биотестирования штаммы микроорганизмов (№ 10 и № 15) отнесены к различным видам *Vibrio fischeri* с гомологией нуклеотидных последовательностей 98 и 99%. Данные штаммы приняты на национальное патентное депонирование в “ФГУП ГосНИИ Генетика-ВКПМ” (Россия) под регистрационными номерами ВКПМ В-9579 и ВКПМ В-9580.

Для длительного хранения выделенных штаммов фотобактерий применяли замораживание (-18 и -60°C), консервацию в жидком азоте и лиофилизацию, используя в качестве криопротекторов сахарозу (10%) либо глицерин (20%). Низкотемпературное замораживание и особенно криоконсервация с применением глицерина оказались наиболее эффективными способами хранения выделенных культур (табл. 1). Хранение бактерий в замороженном состоянии при низких температурах в течение 24 мес. показало, что выделенные штаммы фотобактерий полностью сохраняют свою жизнеспособность и биолюминесцентные свойства. Для достижения наилучших результатов по выживанию и восстановлению клеток эффективна методика постепенного охлаждения: пробирки для криозамораживания с культурами бактерий выдерживали по 1 ч при -18 и -60°C и только затем переносили в жидкий азот.

Для определения токсичности нефтепродуктов была разработана специальная методика приготовления их эмульсий. В частности, для определения токсичности нефтепродуктов нами использовалась сырая нефть каспийского месторождения (с первалочной базы “Шесхарис”, г. Новороссийск) с высоким содержанием устойчивых к процессам трансформации гетероциклических соединений – смол и

Таблица 1. Выживаемость биоломинесцирующих бактерий (КОЕ/мл) при различных способах замораживания и хранения на примере штамма *Vibrio fischeri* ВКПМ В-9580

Среда	Замораживание при -18°C*		Замораживание при -60°C**		Хранение в жидком азоте**		Лиофилизация	
	до	после	до	после	до	после	до	после
Без криопротектора	2.0×10^{10}	2.0×10^5	2.0×10^{10}	1.3×10^6	2.0×10^{10}	1.0×10^6	2.0×10^{10}	1.8×10^4
Среда с сахарозой	1.0×10^{10}	1.3×10^8	1.0×10^{10}	0.6×10^9	1.0×10^{10}	0.66×10^9	1.0×10^{10}	1.5×10^7
Среда с глицерином	1.0×10^8	1.3×10^6	1.0×10^8	0.25×10^8	1.0×10^8	0.73×10^8	1.0×10^8	1.0×10^6

* Длительность хранения 12 мес. ** Длительность хранения 24 мес.

асфальтенов. В составе углеводов в значительных количествах содержатся устойчивые к окислению ароматические, в том числе полициклические углеводороды.

Судовые льяльные воды (СЛВ) отбирали в колодцах (лялях) машинных отделений судов. Типичными составляющими СЛВ являются различные нефтепродукты (отходы мазута, дизельного топлива, смазочных материалов), которые в общем случае представляют собой раствор в различной степени трансформированных углеводов от низко- до высокомолекулярных.

Для получения эмульсии из нефтепродуктов нами были использованы различные концентрации неполярного ПАВ Твин-80 от 0.1 до 5.0%. Как показали результаты исследований (данные не приводятся), целесообразнее использовать 0.5%-ную концентрацию твин-80, которая не так заметно подавляла биоломинесценцию бактерий, как 1.0, 2.5 и 5.0%-ные концентрации, и вместе с тем способствовала образованию относительно устойчивой эмульсии нефтепродуктов.

Нефтепродукты в области низких концентраций (на уровне предельно допустимых концентраций для воды рыбохозяйственных водоемов (0.05 мг/л)), повышали интенсивность биоломинесценции большинства штаммов светящихся бактерий относительно контроля. В некоторых случаях степень индукции свечения превышала 100%. При высоких концентрациях на уровне 250–1000 мг/л нефтепродукты меньше влияли на свечение выделенных бактерий, а увеличение концентрации нефти до 5000 мг/л и выше вызывало заметное ингибирование биоломинесценции.

Светящиеся бактерии штамма *Vibrio fischeri* ВКПМ В-9579, по данным 5 независимых испытаний, проявляли наиболее высокую чувствительность к действию нефтепродуктов. Результаты одного из тестирований представлены на рис. 1. 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%. СЛВ, дизельное топливо также увеличивали свечение этого штамма (максимально до 60–80%). Индукция свечения наблюдалась в широком диа-

пазоне испытанных концентраций нефтепродуктов – от 0.01 до 100 мг/л (ПДК_{рх} нефти и нефтепродуктов – 0.05 мг/л).

Штамм *Vibrio fischeri* ВКПМ В-9580 проявил среднюю, по сравнению с другими выделенными штаммами, чувствительность к нефтепродуктам, однако максимальная индукция свечения наблюдалась уже при концентрации 0.01 мг/л, штамм обладал высокой стабильностью свечения, а также чувствительностью к другим соединениям.

Следует отметить, что под влиянием нефтепродуктов в диапазоне их концентраций от 0.01 до 5.0 мг/л индукция биоломинесценции ряда штаммов выделенных бактерий, включая депонированные штаммы *V. fischeri* ВКПМ В-9579 и ВКПМ-9580, была заметно выше (на 100–150%), чем ответная реакция *lux*-штамма *E. coli* С600 (pPLS-5) [9], который параллельно с SOS-*lux*-штаммом (*E. coli* С600 (pPLS-1)) используется для коррекции токсичности природных проб при определении их генотоксичности [10].

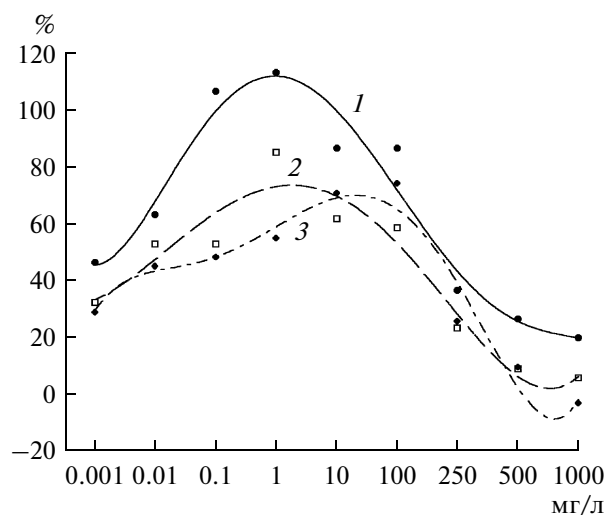


Рис. 1. Изменения интенсивности биоломинесценции штамма *Vibrio fischeri* ВКПМ В-9579 под влиянием нефтепродуктов (мг/л) в процентном отношении к контролю (%). 1 – нефть; 2 – дизельное топливо; 3 – СЛВ

Таблица 2. Чувствительность выделенных (№ 1–16) и известных штаммов светящихся бактерий к действию различных ТВ (ингибирование свечения), EC_{50} , мг/л

№	Штамм	EC_{50} , мг/л				
		ZnSO ₄	CuSO ₄	ДДС-Na	K ₂ Cr ₂ O ₇	Фенол
1	<i>Vibrio</i> sp.	5	2–3	>200	10–50	>200
2	<i>Vibrio</i> sp.	>7.5	3–4	10–50	10–50	>200
3	<i>Vibrio</i> sp.	4–5	2–3	>200	100	>200
4	<i>Vibrio fischeri</i>	5–7.5	5	200–300	10–50	200–300
5	<i>Vibrio fischeri</i>	>7.5	1.5–2	75–100	10–50	>200
6	<i>Vibrio</i> sp.	4–5	1.5–2	200	10–50	150
7	<i>Vibrio fischeri</i>	5–7.5	3–4	>300	10–50	100
8	<i>Photobacterium</i> sp.	1.5–2	2–3	>300	75–100	>300
9	<i>Vibrio</i> sp.	2	2	>300	50–75	>200
10	<i>Vibrio fischeri</i> В 9579	2–3	1–1.5	150	10–50	125–150
11	<i>Vibrio fischeri</i>	>7.5	3	75–100	10–50	300
12	<i>Photobacterium</i> sp.	5–7.5	5–7.5	50–75	100–125	200
13	<i>Vibrio fischeri</i>	7.5	2–3	>300	1–10	300
14	<i>Vibrio</i> sp.	5–7.5	2–3	>300	1–10	300
15	<i>Vibrio fischeri</i> В 9580	4–5	2	200	10–50	125–150
16	<i>Vibrio fischeri</i>	1.5–2	1–1.5	>300	10–50	125–150
<i>E. coli</i> С600 (pPLS-5) [11]		2–3	5–7.5	300	150	>300
<i>P. phosphoreum</i> (Cohn) Ford*		35		70	250	170
ПДК _{рх} (мг/л)		0.05 – в пересчете на Zn ²⁺	0.005 – в пересчете на Cu ²⁺ 0.004 – по веществу	–	0.05 – по веществу	0.001

*Чувствительность штамма *P. phosphoreum* (Cohn) Ford приводится по [12].

Проведено определение чувствительности выделенных штаммов к действию ZnSO₄, CuSO₄, K₂Cr₂O₇, ДДС-Na и фенола. Выбранные соли тяжелых металлов, фенол, ДДС-Na и, главным образом, бихромат калия, являются стандартными ТВ, которые применяются для калибровки биотестов в токсикологических исследованиях. Для сравнительной оценки чувствительности использовали характеристику EC_{50} (концентрация вещества, вызывающая 50% снижение биолюминесценции бактериальной суспензии в течение 30 мин). Полученные данные позволили определить величину EC_{50} выделенных штаммов и сравнить их по этому показателю с чувствительностью штамма *Photobacterium phosphoreum* (Cohn) Ford, рекомендованного для биотестирования воды на территории Украины [11] и *lux*-штамма *E. coli* С600 (pPLS-5) [9, 10] (табл. 2).

Выделенные штаммы оказались в среднем на порядок чувствительней к ZnSO₄ по сравнению с *P. phosphoreum* (Cohn) Ford (табл. 2). Величина EC_{50} для бихромата калия у большинства выделенных штаммов находится в диапазоне от 10 до 50 мг/л, у штаммов № 13 и № 14 – от 1 до 10 мг/л, что соответственно, в 5–25 раз ниже по сравнению с EC_{50} для *P. phosphoreum*.

Сравнение чувствительности аборигенных штаммов и *lux*-штамма *E. coli* С600 (pPLS-5) показало аналогичные результаты. За исключением ZnSO₄, практически все штаммы более чувствительны к CuSO₄ (в 2.5–5 раз), ДДС-Na (в 2–6 раз), K₂Cr₂O₇ (в 3–15 раз), а также к фенолу (в 2–3 раза).

Это свидетельствует о перспективности использования выделенных штаммов для определения качества водных сред. Наибольший интерес представляет реакция светящихся бактерий к действию загрязнителей (нефтепродукты, тяжелые металлы, фенол) в низких концентрациях, сопоставимых 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 ТВ штаммы (№ 3, 8 и 16) исследовали в тест-реакциях с низкими концентрациями ZnSO₄, CuSO₄, K₂Cr₂O₇, ДДС-Na и фенола (от 0.00001 до 10 мг/л).

Как и в случае с нефтепродуктами, наблюдалась аналогичная закономерность: низкие концентрации ТВ (на уровне и ниже ПДК_{рх}) вызывали у бактерий стабильную индукцию биолюминесценции, а более высокие – ее подавление относительно контроля. На представленных графиках хорошо видно,

что зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации ТВ (на примере CuSO_4) описывается квадратным уравнением общего вида:

$$y = -Ax^2 + Bx + C \text{ (рис. 2).}$$

Так, CuSO_4 в концентрации (в пересчете на катионы меди) 0.001–0.005 мг/л (ПДК_{рх} меди 0.005 мг/л) повышает люминесценцию в пределах 30–40% у штаммов № 10, 15 и 16 (рис. 2). При концентрациях катионов меди, начиная с 0.05–0.10 мг и выше, наблюдалось заметное “тушение” биолюминесценции. Величина EC_{50} , как следует из графиков, для штаммов № 3, 10, 15 и 16 составляла около 1.0 мг/л (в 5 раз ниже, чем для штамма *E. coli* С600 (pPLS-5)).

Сульфат цинка в концентрации (в пересчете на катионы цинка) 0.001–0.01 мг/л (ПДК_{рх} цинка 0.05 мг/л) повышал интенсивность биолюминесценции штамма № 16 более чем на 40%, а штаммов № 10 и № 15 – в пределах 30%.

Стандартное токсическое вещество бихромат калия (ПДК_{рх} 0.05 мг/л) в концентрации 0.001–0.01 мг/л на 31–50% индуцировало люминесценцию штаммов № 10 и № 16, а при более высоких концентрациях (начиная с 1.0 мг/л) ингибировало свечение. Фенол (ПДК_{рх} 0.001 мг/л) и ДДС-На в концентрациях 0.00001–10.0 мг/л, в целом, оказывали сходное с бихроматом калия влияние на интенсивность биолюминесценции анализируемых штаммов. Таким образом, соли тяжелых металлов, бихромат калия, фенол и ДДС-На в концентрациях на уровне и ниже ПДК_{рх} стимулировали свечение бактерий, а в более высоких концентрациях ингибировали, причем по величине EC_{50} (ингибирование) некоторые из выделенных штаммов оказались более чувствительны, чем известные аналоги.

Разработка метода биотестирования донных отложений морских водоемов на основе выделенных штаммов светящихся бактерий заключалась в испытании различных растворов (содержащих Твин-80, 96%-ный этанол, NaCl, морскую воду) для экстракции ТВ, определении оптимальных соотношений грунт–растворитель, объема вводимого в тест-систему экстракта, условий постановки реакции, калибровки методики. Исследования показали, что морская вода как универсальный растворитель в соотношении с грунтом 10 : 1 дает наиболее объективную оценку токсичности донных отложений (метод определения токсичности изложен в разделе “Методика”).

Биотест обрабатывался на донных отложениях, отобранных в акваториях с высокой (морской порт) и низкой (условно чистый морской лиман) антропогенной нагрузкой. Объединенная проба донных отложений из морского порта характеризовалась высоким содержанием углеводородов нефти и тяжелых металлов, превышающим средние концентрации этих загрязнителей в морских грунтах аналогичного гранулометрического состава соответ-

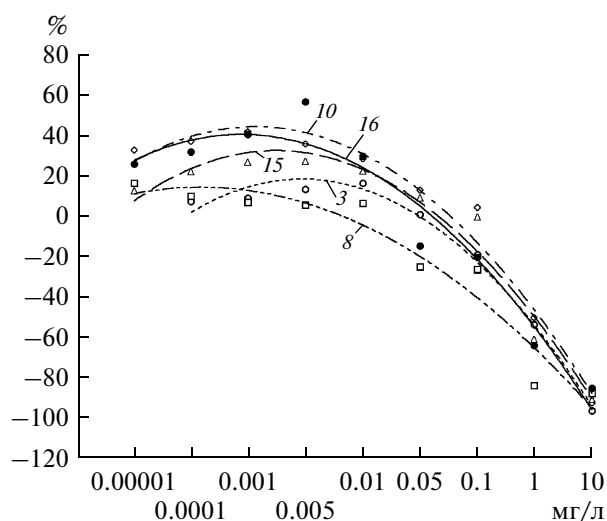


Рис. 2. Изменения интенсивности биолюминесценции выделенных штаммов светящихся бактерий № 3, 8, 10, 15 и 16 под влиянием CuSO_4 (в пересчете на Cu^{2+} , мг/л), в процентном отношении к контролю (%).

ственно в 10 и 2.5 раз [12]. Как показало пробное тестирование на 6 штаммах, в том числе на *V. fischeri* ВКПМ В-9579 и *V. fischeri* ВКПМ В-9580, значение индекса токсичности для донных отложений морского лимана составляет 0 баллов (отклонения от контроля не превышали 20%, “не токсично”), для донных отложений морского порта, тестированных на этих же штаммах – 2–3 балла (отклонения от контроля составили 30–50%, “токсично” и более 50%, “остро токсично”).

При исследовании токсичности донных отложений в Азовском море весной 2007 г. количество зарегистрированных токсичных проб и средний индекс токсичности, установленный с помощью двух новых штаммов *Vibrio fischeri*, оказались заметно выше по сравнению с данными, полученными на известном штамме *E. coli* С600 (pPLS-5) вследствие их более высокой чувствительности к ТВ, находящимся в донных отложениях. Результаты биотестирования на двух предложенных штаммах в большинстве случаев совпадали и показали более высокую токсичность донных отложений в южном районе Азовского моря по сравнению с центральным [13].

Биосенсоры на основе депонированных штаммов использовались для оценки токсичности среды в районе аварийного разлива нефтепродуктов в Керченском проливе (авария танкера “Волгонефть-139” произошла 11 ноября 2007 г. и широко освещалась в официальной прессе и средствах массовой информации). Как показали исследования, отклик биосенсоров (от стимулирования свечения до сильного ингибирования) зависел от загрязненности анализируемых проб воды и донных отложений нефтепродуктами. Пространственное распределе-

ние индекса токсичности, установленного для воды и донных отложений, во многом совпадало с загрязненностью района нефтепродуктами, определенной аналитическими методами [14, 15].

Таким образом, сравнение чувствительности выделенных штаммов с чувствительностью рекомендованных для оценки токсичности штаммов *P. phosphoreum* (Cohn) Ford [11] и *E. coli* C600 (pPLS-5) [9, 10] показало, что по величине EC_{50} они в среднем на порядок чувствительней к солям тяжелых металлов и бихромату калия, в 2–6 раз – к ДДС-На и фенолу. Испытания депонированных штаммов *V. fischeri* ВКПМ В-9579 и *V. fischeri* ВКПМ В-9580 для определения токсичности компонентов среды морских водоемов, в том числе в условиях аварийных разливов нефтепродуктов, подтвердили возможность их применения в качестве биосенсоров, чувствительность которых проявляется на уровне ПДК_{рх} для приоритетных ТВ. На данные штаммы получены патенты РФ на изобретение, где показано их использование в качестве тест-культур для оценки токсичности объектов окружающей среды [16, 17].

Методы биотестирования компонентов среды (вода и донные отложения) на основе выделенных бактерий *Vibrio fischeri* ВКПМ В-9579 и ВКПМ В-9580 внедрены в “Азовском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства” в практику экологического мониторинга морских акваторий и контроля за потенциальными источниками загрязнения в Азово-Черноморском бассейне [13, 14].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект 06-04-96803).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Данилов В.С., Егоров Н.С. Бактериальная биолюминесценция. М.: МГУ, 1985. 298 с.
2. Дятлов С.Е. // Экология моря. 2000. № 51. С. 83–87.
3. Владимиров Ю.А. // Соросовский образовательный журнал. 2001. № 1. С. 16–23.

4. Bulich A.A. // Aquatic Toxicology. ASTM667. / Eds. L.L. Markings, R.A. Kimerle. Philadelphia: Amer. Soc. Testing and Materials: 1979. P. 98–106.
5. Сазыкина М.А., Цыбульский И.Е. Патент РФ. 2007. № 2358009.
6. Гительзон И.И., Родичева Э.К., Медведева С.Е., Примакова Г.А., Барцев С.И., Кратасюк Г.А., Петушков В.Н., Межевикин В.В., Высоцкий Е.С., Заворуев В.В., Кратасюк В.А. Светящиеся бактерии. Новосибирск: Наука, 1984. 278 с.
7. Корпакова И.Г., Цыбульский И.Е. // Методы рыбохозяйственных и природоохранных исследований в Азово-Черноморском бассейне. Краснодар: Просвещение-Юг, 2005. С. 98–115.
8. Определитель бактерий Берджи. Т. 1 / Ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, С. Уильямс. М.: Мир, 1997. 432 с.
9. Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Войнова Н.В. Патент РФ. 2002. № 2179581.
10. Птицын Л.Р. // Генетика. 1996. Т. 32. № 3. С. 354–358.
11. Мальгина И.Ю., Кацев А.М. // Экология моря. 2003. № 64. С. 18–23.
12. Кленкин А.А., Корпакова И.Г., Павленко Л.Ф., Термердашев З.А. Экосистема Азовского моря: антропогенное загрязнение. Краснодар: Просвещение-Юг, 2007. 324 с.
13. Корпакова И.Г., Цыбульский И.Е., Афанасьев Д.Ф., Виноградов А.Ю., Сазыкина М.А., Чередников С.Ю., Барабащин Т.О. // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2008. № 11. С. 62–69.
14. Цыбульский И.Е., Корпакова И.Г., Афанасьев Д.Ф., Барабащин Т.О., Бычкова М.В., Виноградов А.Ю., Купрюшкина О.П., Налетова Л.Ю., Сазыкина М.А., Чередников С.Ю., Цыбульская М.А. // Керченская авария: последствия для водных экосистем. Ростов н/Д: ФГУП АЗНИИРХ, 2008. С. 106–124.
15. Павленко Л.Ф., Корпакова И.Г., Скрыпник Г.В., Ларин А.А. // Керченская авария: последствия для водных экосистем. Ростов н/Д: ФГУП АЗНИИРХ, 2008. С. 58–105.
16. Сазыкина М.А., Цыбульский И.Е. Патент РФ. 2007. № 2346034.
17. Сазыкина М.А., Цыбульский И.Е. Патент РФ. 2007. № 2342435.