

Научная статья
УДК 574.583:576.68
<https://doi.org/10.24143/2073-5529-2022-1-65-70>

Сравнительная оценка качества морских вод по биологическим показателям

Ольга Борисовна Сопрунова¹,
Светлана Александровна Дьякова², Алина Шамильевна Бареева^{3*}

^{1,3}Астраханский государственный технический университет,
Астрахань, Россия, vsemdobra2014@mail.ru

²Волжско-Каспийский филиал Всероссийского научно-исследовательского института
рыбного хозяйства и океанографии,
Астрахань, Россия

Аннотация. Оценка качества проб морской воды проводилась по биологическим показателям – общей численности микроорганизмов (ОЧМ), которые остро реагируют на изменения, происходящие в окружающей их среде. Для обеспечения контроля за экологическим состоянием водной среды необходимо проводить регулярные мониторинговые исследования по таким микробиологическим показателям, как ОЧМ. Общепринятые в микробиологической практике методы определения ОЧМ трудоемки и требуют оснащенной лаборатории и квалифицированного персонала, при этом такой анализ обычно занимает 24–48 часов. Для сравнительной оценки качества проб морской воды регистрировали количество микроорганизмов традиционными методами и экспресс-методом хемилюминесценции. В качестве традиционных методов были выбраны метод посева на питательные среды, подсчет на люминесцентном микроскопе и на окрашенных мембранных фильтрах. Для экспресс-оценки воды по общей микробной численности выбран хемилюминесцентный метод, позволяющий измерять содержание бактериальных клеток по содержащейся в них АТФ. Показано, что хемилюминесцентный метод превосходит традиционные методы определения общей микробной численности, одного из основных показателей качества природного объекта. В то же время хемилюминесцентная реакция позволила значительно сократить время измерения и ускорить обработку данных (время измерения не превышало 2,5 мин), т. е. появилась возможность экспресс-анализа исследуемых образцов в полевых условиях и в мобильных лабораториях. Выявлены прямые положительные корреляционные связи между данными, определенными традиционным и новым методом. Результаты, полученные в рамках исследования по определению численности микроорганизмов классическими методами и методом хемилюминесценции, позволяют рекомендовать этот метод для экспресс-оценки качества различных природных объектов.

Ключевые слова: качество воды, микроорганизмы, пробы воды, общее количество бактерий, метод посевов, метод фильтров, хемилюминесцентный экспресс-метод

Для цитирования: Сопрунова О. Б., Дьякова С. А., Бареева А. Ш. Сравнительная оценка качества морских вод по биологическим показателям // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2022. № 1. С. 65–70. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2022-1-65-70>.

Original article

Comparative assessment of sea water quality based on biological indicators

Olga B. Soprunova¹, Svetlana A. Dyakova², Alina Sh. Bareeva^{3*}

^{1,3}Astrakhan State Technical University,
Astrakhan, Russia, vsemdobra2014@mail.ru

²Volga-Caspian branch of All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography,
Astrakhan, Russia

Abstract. The assessment of the quality of sea water samples was carried out according to biological indicators - the total number of microorganisms, which react sharply to changes in their environment. To ensure control over the eco-

logical state of the aquatic environment, it is necessary to conduct regular monitoring studies on such microbiological indicators as the total number of microorganisms. Conventional microbiological methods for determining the total number of microorganisms are laborious and require a well-equipped laboratory and qualified personnel, and such analysis usually takes 24-48 hours. For a comparative assessment of the quality of sea water samples, the number of microorganisms was recorded by traditional methods and by the express method of chemiluminescence. As traditional methods, the method of inoculation on nutrient media, counting on a fluorescent microscope and on colored membrane filters were chosen. A chemiluminescent method was chosen for the rapid assessment of water by the total microbial abundance, which makes it possible to measure the content of bacterial cells by their ATP content. It is shown that the chemiluminescent method is superior to traditional methods for determining the total bacterial contamination (TBC, one of the main indicators of the natural object quality). At the same time, the chemiluminescent reaction made it possible to significantly reduce the measurement time and speed up data processing (measurement time did not exceed 2.5 min), i.e., it became possible to quickly analyze the samples under study in the field and in mobile laboratories. Direct positive correlations between the data determined by the traditional and new methods are revealed. The results obtained in the framework of a study on the determination of the number of microorganisms by classical methods and the chemiluminescence method allow us to recommend their use for express assessment of the quality of various natural objects.

Ключевые слова: water quality, microorganisms, water samples, total number of bacteria, inoculation method, filter method, chemiluminescent express method

For citation: Soprunova O. B., Dyakova S. A., Bareeva A. Sh. Comparative assessment of sea water quality based on biological indicators. *Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry.* 2022;1:65-70. (In Russ.) <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2022-1-65-70>.

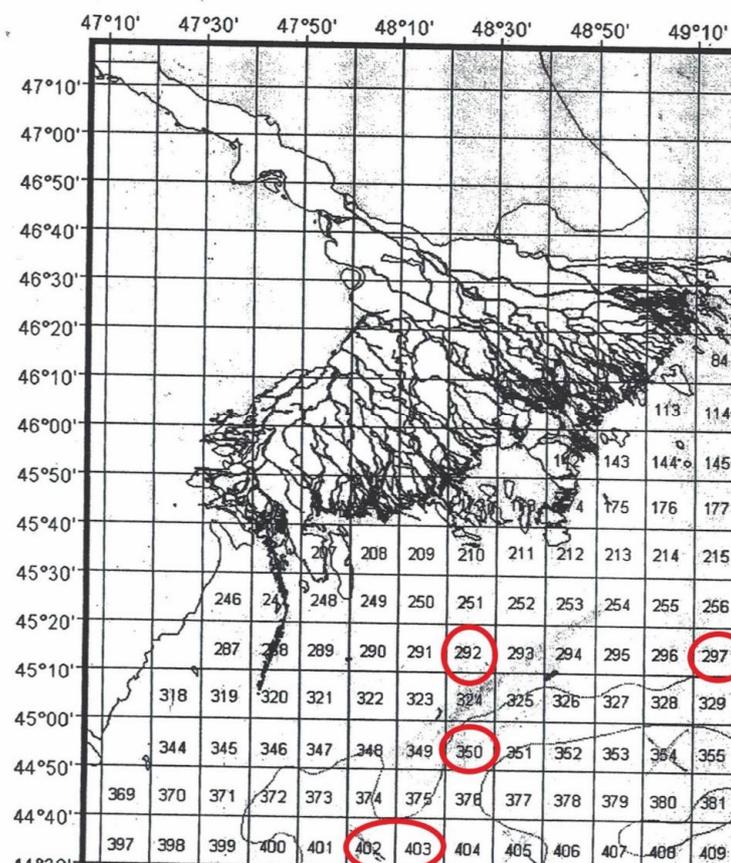
Введение

Актуальной темой экологических исследований в последние годы является изучение изменений состояния природных объектов под влиянием антропогенного пресса, которому они подвергаются. Эта проблема особенно затрагивает водные экосистемы, которые являются одними из самых чувствительных элементов в природе [1]. Нарастающее активное использование биологических ресурсов Северного Каспия требует комплексного контроля за состоянием акватории уникального водоема. Одним из важнейших направлений является проведение ежегодных исследований качества морской микробиоты [2]. Микроорганизмы экосистемы Каспийского моря гораздо быстрее реагируют на изменения условий окружающей среды, такие как преобразование запасов азота, изменение температуры, солености и количества загрязняющих веществ. Высокая уязвимость морского бактериального сообщества позволяет использовать его компоненты для оценки качества воды и определения уровня воспринимаемой антропогенной нагрузки путем изменения различных характеристик микробиологических сообществ [3]. Общепринятые традиционные методы микробиологического исследования не позволяют проводить оценку в режиме реального времени, т. к. продолжительность исследования составляет от 24–48 ч до нескольких суток. Кроме того, проводимые этими методами анализы длительны, и для их выполнения требуется наличие специально оборудованных помещений и квалифицированного персонала, в результате анализа появляется большое количество потенциально опасных биологических отходов, которые необходимо утилизировать [4]. В свя-

зи с вышеперечисленными факторами на практике все чаще внедряются косвенные методы определения общей микробной популяции, называемые также экспресс-методами. Данные методы микробиологического анализа определяют в исследуемых образцах природных объектов такие физико-химические параметры, абсолютное значение или изменение которых соответствует количеству микробных клеток в образце. Одним из наиболее совершенных методов можно назвать экспресс-метод хемилюминесценции, который основан на определении содержания аденозин-5'-трифосфата (АТФ) микробных клеток в исследуемом образце, пропорционального количеству самих клеток [5]. Хемилюминесцентный метод применялся для оценки качества проб речной воды, пищевых продуктов, оборудования и сырья в производстве [6, 7].

Таким образом, реальной проблемой является поиск новых методов определения качества водной среды. Первоначальная гипотеза состоит в том, что экспресс-метод хемилюминесценции позволит значительно быстрее и эффективнее проводить экологический мониторинг морской воды.

Целью работы являлась оценка экологического состояния проб воды Северного Каспия по общей численности микроорганизмов с использованием традиционных методов и хемилюминесцентного экспресс-метода. Пробы отбирались в соответствии со стандартизированной методикой в октябре 2021 г. Карта точек отбора проб 1–4 представлена на рис. (температура воды равна в точке № 1 13,5 °С; в точке № 2 12,9 °С; в точке № 3 13 °С; в точке № 4 13,6 °С).



Карта точек отбора проб: точка № 1 – кв. 292; точка № 2 – кв. 350;
точка № 3 – кв. 402/403; точка № 4 – кв. 297

Sampling points map: Point No. 1 - Cell 292; Point No. 2 - Cell 350;
Point No. 3 - Cell 402/403; Point No. 4 - Cell 297

Материал и методы исследований

В пробах воды общую численность микроорганизмов, относящихся к сапротрофным мезофилам, определяли путем посева соответствующих разведений на питательный агар. Численность микроорганизмов группы сапротрофных мезофилов определяли методом глубинного посева в чашки Петри на мясо-пептонный агар в 2-х повторностях под стерильным контролем и термостатированием при 37 °С в течение 24 ч [8]. Общую численность микроорганизмов определяли с помощью люминесцентной микроскопии, для чего взвесь исследуемой воды микропипеткой наносили на обезжиренное предметное стекло (0,01 мл на препарат) и распределяли на площади 4 см² (2 × 2 см). Препарат фиксировали нагреванием в пламени спиртовки и окрашивали водным раствором акридинового оранжевого (разведение 1 : 10 000, 2–4 мин). Для удаления остатков красителя стекла оставляли в стакане с водопроводной водой на 10 мин. Препараты высушивали при комнатной температуре и подсчитывали бактериальные клетки в люминесцентном микроскопе (ЛЮМАМ-11) [9]. Общую

численность микроорганизмов определяли методом прямой микроскопии мембранных фильтров, для чего определенный объем исследуемой пробы воды фильтровали на мембранных фильтрах с размером пор 0,45 мкм. Далее микроорганизмы, содержащиеся на фильтрах, окрашивали карболовым эритрозинном и подсчитывали в 20 полях зрения с помощью микроскопа, оснащенного сетчатым микрометром [10]. В качестве экспресс-метода определения общей численности микроорганизмов воды выбран люциферин-люциферазный хемиллюминесцентный метод с использованием люминометра ЛЮМ-1. Реактивы Lumtek использовались для определения общего количества бактериальных клеток в образце воды на основе количества содержащегося в нем внутриклеточного АТФ. Из пробы испытуемой воды отбирали 0,3 мл, заливали в фильтравету и проталкивали поршнем так, чтобы жидкость впиталась в картон. На следующем этапе фильтравету переносили в кюветное отделение люминометра, добавляли 0,02 мл контрольного реагента АТФ, а через 2 минуты приливали 0,1 мл раствора реагента АТФ. Далее сигнал биоллюминесценции исследуемого об-

Sopriņņova O. B., Duļakova S. A., Vajņeva A. Sh. Comparative assessment of sea water quality based on biological indicators

разца сразу регистрировался [11]. Для статистической обработки данных коэффициент корреляции рассчитывали в программе Microsoft Excel. Выбранный показатель используется для нахождения связи между двумя исследуемыми свойствами: если найденное значение (r) близко к 1, это свидетельствует о наличии тесной связи, а если ближе к 0, то ее отсутствия.

Результаты исследования и их обсуждение

Для установления соответствия результатов анализа проб воды, полученных экспресс-методом и общепринятыми методами, параллельно проводили прямой микробный учет на люминесцентном микроскопе и на окрашенных мембранных фильтрах. Полученные результаты представлены в таблице.

Оценка общей численности микроорганизмов проб воды Северного Каспия

Assessment of the total number of microorganisms of water samples in the Northern Caspian

№ пробы	Показатели численности микроорганизмов, тыс. КОЕ/мл			
	Прямой счет люминесцентным методом	Сапротрофы, методом посева	Общая численность бактерий, методом фильтров	Численность бактерий, хемиллюминесцентным методом
1	22	2,3	560	53
2	42	6,2	580	15
3	3,4	1,7	620	2,2
4	28	51	410	12

По результатам прямого счета общая численность микроорганизмов находилась в пределах 3,4–42 тыс. КОЕ/мл, численность сапротрофных бактерий – от 1,7 тыс. КОЕ/мл до 51 тыс. КОЕ/мл. Численность микроорганизмов, определенная экспресс-методом, составила от 2,2 до 53 тыс. КОЕ/мл. Общая численность микроорганизмов, полученная с помощью метода прямого микроскопирования мембранных фильтров, достигла 410–620 тыс. КОЕ/мл. Согласно требованиям ГОСТ 17.1.2.04–77 «Охрана природы. Гидросфера. Показатели состояния и правила таксации рыбохозяйственных водных объектов» исследуемые пробы воды относятся к чистым водам по показателю общей численности микроорганизмов, т. к. определенная методом прямого счета численность составила менее 0,5 млн кл./мл. По численности сапротрофных микроорганизмов исследуемые воды можно отнести к чистым (точки № 1, № 3), загрязненным (точка № 2) и грязным (точка № 4). Результаты, полученные в ходе исследования, позволили установить прямые положительные корреляционные связи между данными об общей численности микроорганизмов, полученными общепринятыми методами и методом хемиллюминесценции. Однако наиболее значимая корреляция численности микроорганизмов установлена между хемиллюминесцентным методом и методом прямого учета ($r = +0,9$). Высокий коэффициент корреляции позволяет рекомендовать хемиллюминесцентный метод в качестве альтернативы методу прямого учета, т. к. ошибка, возникающая из-за человеческого фактора при пробоподготовке и анализе на люминесцентном микроскопе, сводится к минимуму, т. к. исключаются поспешная регистрация или просмотр недостаточного количества полей зрения. Рассчитанный высокий коэффициент корреляции обусловлен тем, что при подсчете на люминесцентном микроскопе учитываются все живые клетки, а при хемиллюминесцентном методе общее количе-

ство живых микроорганизмов определяется по содержанию АТФ в их клетках. Традиционные методы микробиологии, использованные в данной работе, не позволяют получить данные о загрязнении водоема. Например, процесс посева имеет ряд недостатков. Во-первых, это значительное время его осуществления. Этот аспект особенно важен для контроля качества водоподготовки, где бактериологические методы контроля применяются действительно ретроспективно. Также существенным является объем работы, связанной с обеспечением проведения анализа и, прежде всего, с такими основными этапами, как подготовка, стерилизация, розлив и хранение готовых к использованию сред. Также на искусственных питательных средах культивируются не все виды микроорганизмов, а только те, которые способны поглощать питательные вещества, содержащиеся в питательной среде, и расти в предлагаемых условиях. Метод прямого подсчета с использованием флуорохромов не исключает ошибки, связанной с квалификацией специалиста, проводящего этот анализ. Также метод определения общей численности на мембранных фильтрах не может дать достоверной информации о микробиологическом загрязнении объекта, т. к. часто обнаруживаются остатки, которые отпечатываются на смывах, окрашенных красителями. Все же эти остатки можно различить исходя из морфологии клеток микроорганизмов при большем увеличении, что требует дополнительного времени и специальной подготовки. Данные, полученные экспресс-методом хемиллюминесценции, дают точную оценку качества воды за короткое время (в среднем на анализ пробы уходило около одной минуты). Все более широкое распространение получает хемиллюминесцентный метод определения общей численности микроорганизмов, основанный на обнаружении присутствующего в их клетках АТФ, который позволил быстро определить состояние проб морской

воды. Для оценки качества различных объектов с помощью этого экспресс-метода не требуется дорогостоящего оборудования или трудоемкой пробоподготовки, а сам анализ можно проводить непосредственно в местах отбора проб. Вся процедура состоит из трех этапов: пробоподготовка, исключающая мешающее влияние матрицы пробы, аналитическая реакция и обработка полученного сигнала. Выполнение хемилюминесцентного анализа сводит к минимуму ошибки, которые могут возникнуть при отборе проб, транспортировке, хранении и обработке. Использование метода быстрой хемилюминесценции не приводит к образованию большого количества опасных отходов по сравнению с традиционными методами анализа.

Заключение

Таким образом, проведенная сравнительная оценка качества морских вод хемилюминесцент-

ным и традиционными методами обосновывает применение экспресс-методов для оценки качества воды по биологическим показателям. Исходная гипотеза о возможности оценки качества морской воды хемилюминесцентным методом подтверждена наличием прямой положительной корреляционной связи. Установлено, что исследованные пробы воды относятся к чистым по общему количеству микроорганизмов и к чистым, загрязненным и грязным – по количеству сапротрофных микроорганизмов. Быстрота, простота анализа, экологичность и возможность непосредственного использования в точках отбора проб позволяют рекомендовать хемилюминесцентный метод в качестве альтернативы существующим традиционным методам исследования качества воды в различных водоемах. Однако при необходимости выделения и изучения микроорганизмов традиционный метод посева можно использовать как дополнительный.

Список источников

1. Бабкина И. В., Кореньков В. А. Водоохранные зоны как один из способов управления экологическим состоянием водных объектов Красноярского края // Проблемы использования и охраны природных ресурсов Центральной Сибири. 2001. С. 189–192.

2. Дьякова С. А., Сопрунова О. Б., Галютдинова Е. Р., Менькова А. В., Баубекова Д. Г., Проскура В. В., Лардыгина Е. Г., Галкина Ю. В., Дегтярева Л. В., Чехомов С. П. Состояние бактериопланктона Северного Каспия в современных условиях // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер.: Рыбное хозяйство. 2021. № 4. С. 31–38.

3. Баженова Т. В. Экологическая безопасность водно-канализационного хозяйства страны // Сб. материалов VIII Междунар. науч.-практ. конф. Пенза, 2005. С. 132–135.

4. Тымчук С. Н., Ларин В. Е. Современные технологии в традиционных микробиологических исследованиях // Вода Magazine. 2012. № 5 (57). URL: <https://watermagazine.ru/analitika/obzori/24471-sovremennye-tehnologii-v-traditsionnykh-mikrobiologicheskikh-issledovaniyakh.html> (дата обращения: 12.02.2021).

5. Михеева И. В., Трофимов С. И., Харитонов Ю. С. Микробиологическое исследование хемилюминесцентным экспресс-методом антропогенного загрязнения реки Сходня // Научные и образовательные проблемы гражданской защиты. 2011. № 1. С. 31–37.

6. Фрунджян В. Г., Угарова Н. Н. Быстрые методы контроля микробиологической чистоты в пищевой промышленности // Пищ. пром-сть. 2008. № 4. С. 22–23.

7. Лесовская М. И., Игошин А. С. Экспресс-оценка качества меда с помощью хемилюминесцентного анализа // Междунар. науч.-исследоват. журн. 2020. № 8. С. 87–93.

8. ГОСТ 31942–2012. Вода. Отбор проб для микробиологического анализа. М.: Стандартинформ, 2013. 27 с.

9. ГОСТ 17.1.2.04–77. Охрана природы. Гидросфера. Показатели состояния и правила таксации рыбохозяйственных водных объектов. М.: Гос. ком. СССР по стандартам, 1977. 27 с.

10. Непрусов А. И. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.

11. Сопрунова О. Б. Методы биолуминесцентной АТФ-метрии. Астрахань, 2017. 35 с.

References

1. Babkina I. V., Koren'kov V. A. Vodookhrannye zony kak odin iz sposobov upravleniia ekologicheskim sostoianiem vodnykh ob"ektov Krasnoyarskogo kraia [Water protection zones as one of ways to manage ecological state of water bodies in Krasnoyarsk region]. *Problemy ispol'zovaniia i okhrany prirodnykh resursov Tsentral'noi Sibiri*, 2001, pp. 189–192.

2. D'iakova S. A., Soprunova O. B., Galiautdinova E. R., Men'kova A. V., Baubekova D. G., Proskurina V. V., Lardygina E. G., Galkina Iu. V., Degtiareva L. V., Chekhomov S. P. Sostoianie bakterioplanktona Severnogo Kaspiia v sovremennykh usloviiah [State of bacterioplankton of Northern Caspian Sea in modern conditions]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2021, no. 4, pp. 31–38.

3. Bazhenova T. V. Ekologicheskaiia bezopasnost' vodno-kanalizatsionnogo khoziaistva strany [Ecological safety of water and sewage economy of country]. *Sbornik materialov VIII Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii*. Penza, 2005. Pp. 132–135.

4. Tymchuk S. N., Larin V. E. Sovremennye tekhnologii v traditsionnykh mikrobiologicheskikh issledovaniyakh [Modern technologies in traditional microbiological research]. *Voda Magazine*, 2012, no. 5 (57). Available at: <https://watermagazine.ru/analitika/obzori/24471-sovremennye-tehnologii-v-traditsionnykh-mikrobiologicheskikh-issledovaniyakh.html> (accessed:12.02.2021).

5. Mikheeva I. V., Trofimov S. I., Kharitonova Iu. S. Mikrobiologicheskoe issledovanie khemiluminescentnym ekspress-metodom antropogennoho zagriazneniia reki Skhodnia [Microbiological study by chemiluminescent express method of anthropogenic pollution of River Skhod-

nya]. *Nauchnye i obrazovatel'nye problemy grazhdanskoi zashchity*, 2011, no. 1, pp. 31-37.

6. Frundzhian V. G., Ugarova N. N. Bystrye metody kontrolya mikrobiologicheskoi chistoty v pishchevoi promyshlennosti [Fast methods of control of microbiological purity in food industry]. *Pishchevaia promyshlennost'*, 2008, no. 4, pp. 22-23.

7. Lesovskaia M. I., Igoshin A. S. Ekspress-otsenka kachestva meda s pomoshch'iu khemiluminescentnogo analiza [Express-evaluation of honey quality with chemiluminescent analysis]. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal*, 2020, no. 8, pp. 87-93.

8. GOST 31942-2012. *Voda. Otbor prob dlia mikrobiologicheskogo analiza* [GOST 31942-2012. Water. Sampling

for microbiological analysis]. Moscow, Standartinform Publ., 2013. 27 p.

9. GOST 17.1.2.04-77. *Okhrana prirody. Gidrosfera. Pokazateli sostoianiia i pravila taksatsii rybokhoziaistvennykh vodnykh ob"ektov* [GOST 17.1.2.04-77. Nature protection. Hydrosphere. Condition indicators and rules of fishery water bodies taxation]. Moscow, Gos. kom. SSSR po standartam, 1977. 27 p.

10. Netrusov A. I. *Praktikum po mikrobiologii* [Practicum on microbiology]. Moscow, Akademiia Publ., 2005. 608 p.

11. Soprunova O. B. *Metody bioluminescentnoi ATF-metrii* [Methods of bioluminescent ATP-metry]. Astrakhan', 2017. 35 p.

Статья поступила в редакцию 29.03.2021; одобрена после рецензирования 01.03.2022; принята к публикации 14.03.2022
The article is submitted 29.03.2021; approved after reviewing 01.03.2022; accepted for publication 14.03.2022

Информация об авторах / Information about the authors

Ольга Борисовна Сопрунова – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой прикладной биологии и микробиологии; Астраханский государственный технический университет; Астрахань, ул. Татищева, 16; soprunova@mail.ru

Светлана Александровна Дьякова – старший специалист лаборатории ихтиопатологии; Волжско-Каспийский филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии; Астрахань, ул. Савушкина, 1; djakova.s.a@gmail.com

Алина Шамильевна Бареева – аспирант кафедры прикладной биологии и микробиологии; Астраханский государственный технический университет; Астрахань, ул. Татищева, 16; vsemdobra2014@mail.ru

Olga B. Soprunova – Doctor of Biology, Professor; Head of the Department of Applied Biology and Microbiology; Astrakhan State Technical University; Astrakhan, Tatishcheva St., 16; soprunova@mail.ru

Svetlana A. Dyakova – Senior Specialist of the Laboratory of Ichthyopathology; Volga-Caspian branch of All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography; Astrakhan, Savushkina St., 1; djakova.s.a@gmail.com

Alina Sh. Bareeva – Postgraduate Student of the Department of Applied Biology and Microbiology; Astrakhan State Technical University; Astrakhan, Tatishcheva St., 16; vsemdobra2014@mail.ru

