

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МУРМАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ФАКУЛЬТЕТ ПИЩЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ И БИОХИМИИ**

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОХИМИИ И МИКРОБИОЛОГИИ**

20 МАЯ 2014 г.

МАТЕРИАЛЫ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

Под редакцией кандидата биологических наук И. В. Усковой

© Мурманский государственный
технический университет, 2014

УДК 571.1+579.6(063)

ББК 28.07228.4Я431

Т 33

Редактор – кандидат биологических наук И. В. Ускова

Т-33 Теоретические и прикладные вопросы биохимии и микробиологии [Электронный ресурс] : материалы науч.-практ. конф., Мурманск, 20 мая 2014 г. / под. ред. И. В. Усковой ; Федер. агентство по рыболовству ; Федер. гос. бюджетное образоват. учреждение высш. проф. образования «Мурм. гос. техн. ун-т». – Электрон. текст. дан. (1,66 Мб). – Мурманск : Изд-во МГТУ, 2014. – 1 опт. компакт-диск (CD-ROM). – Систем. требования: PC не ниже класса PentiumII 128 Мб RAM ; свободное место на HDD 131 Мб ; привод для компакт дисков CD-ROM 2-х и выше. – ФГУП НТЦ «Иформрегистр» № 0321401786.

Материалы конференции предназначены для обучающихся по программе биологических, экологических и технологических направлений подготовки и специальностей ВПО, также для сотрудников научно-исследовательских институтов и организаций по охране окружающей среды.

Текстовое электронное издание

Минимальные системные требования: PC не ниже класса PentiumII 128 Мб RAM ; свободное место на HDD 131 Мб ; привод для компакт дисков CD-ROM 2-х и выше.

Номер государственной регистрации электронного издания № 0321401786

© Мурманский государственный
технический университет, 2014

Содержание

1. **Шумская Н. В., Мухин В. А., Новиков В. Ю.** Утилизация хитина микроорганизмами Баренцева моря.....4
2. **Узбекова О.Р., Петрухина А.Т.** Микробиологические исследования мидий *Mytilus edulis* губы Белокаменка.....10
3. **Шкуратова Е.Б.** Анализ зависимости активности ферментного препарата гепатопанкреаса Камчатского краба от температуры и времени инкубации.....15
4. **Обухова Е.А., Папкина О.И.** Количественное определение содержания витамина С в биологическом материале.....21
5. **Гладченко А. В.** Распределение численности трофических и физиологических групп гетеротрофного бактериобентоса литорали бухты Белокаменки в феврале-апреле 2014 г.....23
6. **Яшкина А. А., Петранцова К. Ю.** Способ биотестирования почв и почвенных вытяжек с помощью растительных тест-объектов.....30

УТИЛИЗАЦИЯ ХИТИНА МИКРООРГАНИЗМАМИ БАРЕНЦЕВА МОРЯ

Шумская Н.В. (Мурманск, МГТУ, кафедра микробиологии и биохимии, *nadya-bar@yandex.ru*)

Мухин В.А. (Мурманск, ПИНРО, лаборатория биохимии и технологии, *vmukhin@pinro.ru*)

Новиков В.Ю. (Мурманск, ПИНРО, лаборатория биохимии и технологии, *nowit@pinro.ru*)

Аннотация: Из грунта литорали Баренцева моря выделены микроорганизмы, расщепляющие хитин. Изучена их хитинолитическая активность и фракционный состав белков культуральной жидкости. Средняя молекулярная масса фракции белков, обладающих хитинолитической активностью, составляет 103,5 кД. Расщепление хитина обусловлено активностью всего хитиназного комплекса микроорганизмов.

Ключевые слова: бактериобентос, хитиназы, хитинолитическая активность.

Введение. Хитин является химически стойким соединением, нерастворимым в водных растворах, что может обуславливать его длительное хранение в природной среде. Несмотря на это хитин в большинстве случаев не накапливается в природных экосистемах, а подвергается разрушению. При разрушении хитина образуются минеральные продукты и высвобождаются легкоусваиваемые соединения азота и углерода, которые вновь вступают в круговорот веществ.

Бактериальный путь разложения хитина в морской среде считается преобладающим. Основное звено цепи, которое обеспечивает возвращение азота и углерода в круговорот веществ, – хитинредуцирующие микроорганизмы.

Можно ожидать, что хитинредуцирующие бактерии, выделенные в каждом конкретном регионе Мирового океана, могут оказаться уникальными, приспособленными к местным особенностям экологического равновесия. В этом отношении особый интерес представляют морские микроорганизмы полярных морей, у которых особенностью ферментной системы является способность сохранять свою активность при низких температурах (0 - 4 °С) [Keyhani, 1999].

В ходе данной работы были выделены микроорганизмы, способные к расщеплению хитина в условиях холодных вод Баренцева моря.

Материалы и методы. В работе изучались микроорганизмы, выделенные из грунта литоральной зоны бухты Белокаменная Кольского залива (участок 1) и губы Териберская Баренцева моря (участок 2)

Места отбора проб грунта:

- Участок 1 - Бухта Белокаменная (69°04'N, 33°11'E) располагается на западном берегу среднего колена Кольского залива Баренцева моря. Литораль данного района представлена песчано-илистым грунтом.

- Участок 2 - губа Териберская (69°13'N, 35°10'E). Район обитания популяции камчатского краба. Грунт литорали представлен песком. Данный участок выбран в качестве примера литорали открытой части Баренцева моря.

Десорбцию микроорганизмов с грунта осуществляли ультразвуком в течение 15 с, с частотой излучения 37 кГц при помощи ультразвуковой ванны Elmasonic S30H (Elma, Германия).

Для культивирования микроорганизмов использовали модифицированную питательную среду MMC (NaCl – 7,0 г; MgSO₄×7H₂O – 1,0 г; KCl – 0,7 г; K₂HPO₄ – 2,0 г; Na₂HPO₄ – 3,0 г; NH₄NO₃ – 1,0 г; вода дистиллированная – 1000 мл) с добавлением 2 % агар-агара и 1 % коллоидного хитина. Для накопления хитинредуцирующих микроорганизмов использовали ту же питательную среду без добавления агар-агара.

Хитинредуцирующую активность микроорганизмов определяли в единицах отношения площади зоны лизиса к площади колонии [Логинов, 2006].

Идентификацию микроорганизмов проводили согласно определителю бактерий Берджи [Определитель бактерий, 1997].

Для определения массовой доли хитина образцы грунта обрабатывали 12 моль/л HCl в течение 1 ч при 90 °C для полной кислотной деполимеризации хитина и образования D(+)-глюкозамина.

Концентрацию D(+)-глюкозамина в гидролизате определяли методом ВЭЖХ на обращённой фазе по методике [Studelska et al., 2006].

Массовую долю хитина рассчитывали по количеству образовавшегося D(+)-глюкозамина.

Концентрацию белка в культуральной жидкости определяли по методу Лоури [Практическая химия, 1989].

Молекулярно-массовое распределение белков в образцах определяли методом гель-хроматографии низкого давления с использованием аппаратуры «Pharmacia LKB Biotechnology» (Швеция).

Эндохитиназную активность измеряли в процентах уменьшения оптической плотности раствора коллоидного хитина до и после инкубации с культуральной жидкостью [Studelska et al., 2006].

Экзохитиназную активность определяли по образованию окрашенного комплекса N-ацетилглюкозамина (АцГЛА) с 4-диметиламинобензальдегидом [Reissig, 1955].

Результаты и обсуждение. По нашим расчетам масса хитина на грамм сухого грунта составила $7,5 \times 10^{-6}$ г для участка 1 и $0,94 \times 10^{-6}$ г для участка 2 (рис. 1).

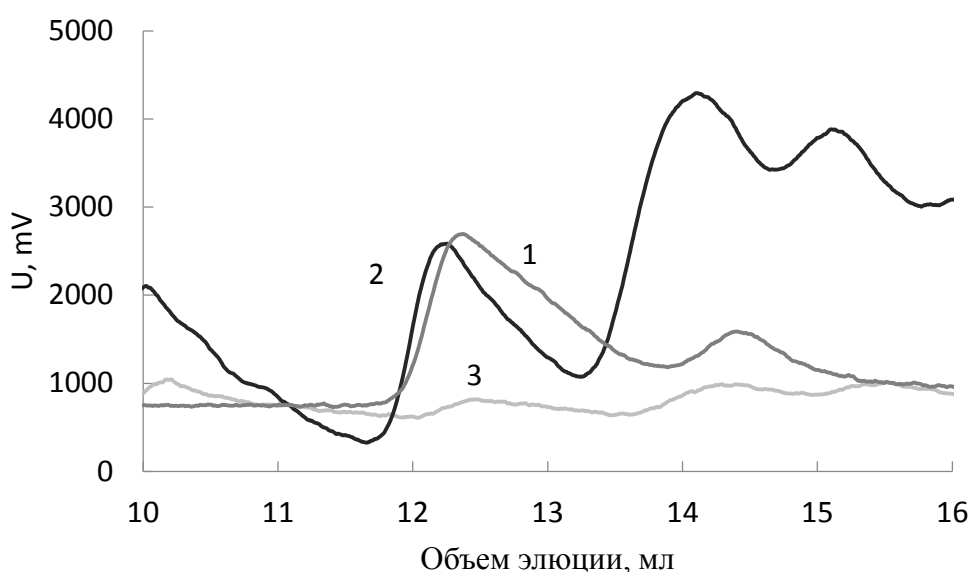


Рисунок 1 - Хроматограммы образцов гидролизатов грунта (2), с участка 1, с участка 2 (3). D(+)-глюкозамин (1)

Различие в количестве хитина в пробах грунта исследуемых участков может быть обусловлено, с одной стороны, гидрологическими условиями, а с другой – степенью антропогенной нагрузки.

В результате проведенных микробиологических исследований было установлено, что хитинредуцирующие бактерии в пробах грунта с участка 2 отсутствуют. В пробах грунта с участка 1, численность хитинредуцирующих микроорганизмов составила около 4 КОЕ/г.

Присутствие хитинредуцирующих бактерий на участке 1 может быть обусловлено большей концентрацией хитина в грунте, чем на участке 2. В свою очередь, численность микроорганизмов также зависит от концентрации органических веществ и как следствие от типа грунта.

Также отмечено, что в летний период скорость расщепления хитина значительно выше (0,59 %/сут), чем в зимний (0,056 %/сут) и осенний периоды (0,19 %/сут), что объясняется влиянием на скорость ферментативного расщепления хитина такого фактора как температура. Однако это влияние комплексное, так как с повышением температуры увеличивается численность и происходит смена доминирующих групп микроорганизмов. Таким образом, увеличение скорости деструкции хитина в летний период, возможно, преимущественно происходит за счет изменения количества и видового разнообразия бактерий.

Несомненный интерес представляет поиск новых штаммов хитинредуцирующих бактерий и продуцируемых ими высокоактивных хитинолитических ферментов. Так для дальнейших исследований были выбраны культуры с различной хитинредуцирующей способностью.

Культура микроорганизмов с хитинредуцирующей активностью 36,4 ед. (культура 1) представлена грамположительными палочками. По морфолого-культуральным и биохимическим свойствам данная культура относится к роду *Rhodococcus* sp.

Грамположительными палочками представлена культура микроорганизмов с хитинредуцирующей активностью 8,3 ед. (культура 2). По совокупности морфолого-культуральных признаков данная культура относится к роду *Bacillus* sp.

Выявлено, что концентрация хитина в культуральной жидкости культуры 1 микроорганизмов (хитинредуцирующая активность 36,4 ед.) уменьшается на 19 %, а для культуры 2 (8,3 ед.) на 4 %. Иначе говоря, чем выше активность, тем интенсивнее процесс деструкции хитина. Скорость расщепления хитина может быть обусловлена, с одной стороны, количеством ферментов, с другой – их свойствами.

В свою очередь, концентрация белка в культуральной жидкости исследуемых культур микроорганизмов мало отличается друг от друга и составляет для культуры 1 – 0,16 мг/мл и культуры 2 – 0,14 мг/мл. Следовательно, культуры, обладающие разной хитинредуцирующей

активностью, не отличаются по количеству выделенных ферментов. Вероятно, их активность зависит от состава белкового комплекса.

В результате анализа состава белков культуральной жидкости обеих выделенных культур обнаружено две фракции со средней ММ 103,5 кД (фракция 1) и 16 кД (фракция 2).

Вероятно, хитиноподобная активность ассоциирована с фракцией 1 (ММ 103,5 кД), что согласуется с данными других исследователей [Журавлева и др., 2004]. По полученным данным, эндохитиназная активности фермента культуры 1 и культуры 2 отличается незначительно (составляют 3,9 и 3,7 %, соответственно). В то время как экзохитиназная активность фермента культуры 1 почти в 2 раза выше, чем в культуре 2 (1,8 и 0,7 АцГЛА×ч⁻¹×г⁻¹ соответственно).

Из вышесказанного следует, что скорость расщепления хитина для выделенных микроорганизмов зависит от активности фермента. В свою очередь, скорость гидролиза экзохитиназами будет зависеть от активности эндохитиназ, т. е. от скорости образования концевых участков молекул хитина. При начальном взаимодействии эндохитиназ с субстратом образуются растворимые полисахариды, которые играют роль индукторов хитинового комплекса.

Заключение. Таким образом, первые результаты показали наличие хитинредуцирующих бактерий в экосистеме Баренцева моря. На численность этих микроорганизмов, а, следовательно, на скорость деструкции хитина влияют: наличие субстрата, сезонность, тип донных отложений. Скорость расщепления хитина бактериобентосом обусловлена активностью всего хитиназного комплекса. Однако ряд предположений требуют дальнейших исследований.

Литература.

1. Логинов О. Н. и др. Хитиноподобная активность бактерий рода *Pseudomonas*-потенциальных объектов агробιοтехнологий. – Изд-во ВНИРО/VNIRO Publishing, 2006.
2. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 1 / Под. ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. М.: Мир, 1997. – 432 с.
3. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 2 / Под. ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. М.: Мир, 1997. – 368 с.

4. Keyhani, N. O. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria / N. O. Keyhani, S. Roseman // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Sub.* – 1999. – Vol. 1473, No. 1. – P. 108-122.
5. Практическая химия белка. / Под ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – 623 с.
6. Quantification of glycosaminoglycans by reversed-phase HPLC separation of fluorescent isoindole derivatives / D. R. Studelska, K. Giljum, L. M. McDowell, L. Zhang // *Glycobiology.* – 2006. – Vol. 16, No. 1. – P. 65-72.
7. Reissig, J. L. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars / J. L. Reissig, J. L. Strominger, L. F. Leloir // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1955. – Vol. 217, No. 2. – P. 959-966.
8. Журавлева, Н. В. Хитинолитические ферменты: источники, характеристика и применение в биотехнологии / Н. В. Журавлева, П. А. Лукьянов // *Вестник ДВО РАН*, 2004. № 3. С. 76-86.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МИДИЙ *MYTILUS EDULIS* ГУБЫ БЕЛОКАМЕНКА

Узбекова О.Р., Перетрухина А.Т. (г. Мурманск, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мурманский государственный технический университет», кафедра «Микробиология и биохимия», e-mail: *ojib4uk90@yandex.ru*)

Аннотация. В процессе фильтрации моллюски способны накапливать в своем организме из окружающей морской среды разнообразную микробиоту. Поэтому с целью безопасного употребления моллюсков в пищу, особое внимание необходимо уделять предотвращению микробной контаминации мидий.

Abstract. In the process of filtering shellfish can accumulate in their body diverse microbiota. Therefore, for the safe use of shellfish for food, special attention should be paid to prevent microbial contamination of mussels.

Ключевые слова: моллюски, Кольский залив

Key words: shellfish, Kola Bay

Значительная роль в обеспечении потребностей населения в пищевом белке принадлежит морепродуктам. Для производства кулинарной и консервной продукции ценным пищевым сырьем являются двустворчатые моллюски – мидии [Пученкова, 1992]. Мясо гидробионтов обладает прекрасными вкусовыми качествами, а так же обладает лечебными свойствами, оказывает положительное действие на обмен веществ и повышение тонуса организма. В нем содержится большое количество легкоусвояемых белков, витамины В и С, а также важные для человеческого организма микроэлементы - медь, железо, йод, фосфор [Промысловые и перспективные..., 1998].

Помимо использования мидий в пищу, свыше половины продукции мидиевых ферм (раковины, некондиционные моллюски, отходы от переработки моллюсков на пищевые цели) может быть использовано для производства кормовых добавок [Промысловые и перспективные..., 1998].

Но необходимо помнить, что мидии являются фильтраторами и могут накапливать определенное количество микроорганизмов [Промышленное разведение..., 2004].

Целью данной работы является проведение санитарно-микробиологических исследований мидий *Mytilus edulis L.*, собранных с литорали губы Белокаменка.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

1. провести санитарно-микробиологические исследования мидий *Mytilus edulis L.* Кольского залива по СанПиН 2.3.2.1078-01;
2. проследить сезонные изменения микробиологического состава моллюсков, собранных с литорали Кольского залива.

Исследования проводились с осени 2013 по весну 2014 гг. Для исследований была выбрана станция – литораль бухты Белокаменка, которая располагается на западном берегу в среднем колене Кольского залива.

Отбор проб моллюсков производился в соответствии с ГОСТ Р ИСО 7218-2008, с соблюдением правил асептики, в стерильные стеклянные банки с закручивающимися крышками вместе с морской водой.

После доставки проб в лабораторию моллюсков тщательно очищали от обрастаний и промывали под струей дистиллированной воды. Пробы с наружной стороны створок облучали ультрафиолетовыми лучами ртутно-кварцевой лампы 15-20 мин. Затем профламбированным скальпелем разрезали мускул-замыкатель, раскрывали створки и извлекали мясо мидий с межстворчатой жидкостью. Мясо моллюсков измельчали в стерильной фарфоровой ступке стерильным пестиком до получения однородной массы. Затем 10 г полученного гомогената пробы помещали во флакон с 90 мл стерильной морской воды для приготовления разведений в соответствии с ГОСТ 26669-85 для микробиологических исследований, с целью определения общей бактериальной обсемененности, сульфитредуцирующих клостридий, бактерий рода *Enterococcus* и *S. aureus*. Оставшийся гомогенат использовали для проведения других микробиологических исследований - определения содержания бактерий группы кишечной палочки (БГКП) и бактерий рода *Salmonella*.

Нормативы по микробиологическим показателям представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Микробиологический контроль живых мидий (СанПиН 2.3.2.1078-01; Единый перечень товаров..., 2010)

Микробиологические показатели					
КМАФА нМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются				Примечание
	БГКП	<i>S. aureus</i>	Сульфит- редуцирую щие клубридии	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы и <i>L. monocytog enes</i>	
$5 \cdot 10^3$	1,0	0,1	0,1	25	<i>E. coli</i> в 1 г не допускаются; <i>Enterococcus</i> - в 0,1 г не допускаются;

При исследовании общей численности бактерий в живых мидиях на всем периоде исследования (осень 2013 - весна 2014 гг.) было обнаружено, что количество бактериальных клеток не изменяется от сезона, и превышает допустимые пределы на два порядка [СанПиН 2.3.2.1078-01; Единый перечень товаров..., 2010], что представлено на рисунке 2.

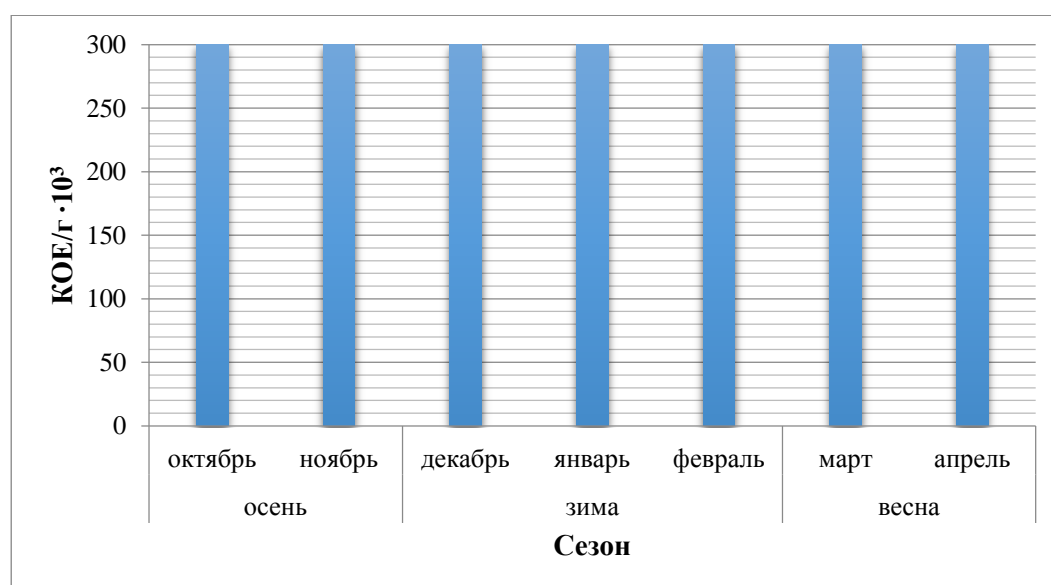


Рисунок 2 - Значения КМАФАнМ в мясе живых мидий

Из таблицы 2 видно, что при определении наличия БГКП их присутствие наблюдалось во всех пробах живых мидий на всем исследуемом периоде, та же ситуация прослеживается и при исследовании моллюсков на присутствие бактерий рода *Enterococcus*, что возможно, является показателем свежего фекального загрязнения среды их обитания.

Также из таблицы 2 видно, что сульфитредуцирующие кластридии, бактерии рода *Salmonella* и *Staphylococcus aureus* не были обнаружены в исследуемых моллюсках.

Таблица 2 - Результаты микробиологического исследования мяса живых мидий

Период	Микробиологические показатели					
	КМАФАнМ, КОЕ/г	БГКП в 1,0 г	<i>S.aureus</i> в 0,1 г	Сульфитредуцирующие кластридии в 0,1 г	<i>Salmonella</i> в 25 г	<i>Enterococcus</i> в 0,1г
Осень	300·10 ³	обн.	н/о	н/о	н/о	обн.
Зима	300·10 ³	обн.	н/о	н/о	н/о	обн.
Весна	300·10 ³	обн.	н/о	н/о	н/о	обн.

н/о – не обнаружено;

обн.- обнаружено.

Таким образом, моллюски, выловленные в водах Кольского залива, не соответствуют нормативной документации на пищевую продукцию по таким санитарным показателям как КМАФАнМ, наличие БГКП и бактерий рода *Enterococcus*.

Выводы.

1. КМАФАнМ мяса живых мидий из вод Кольского залива превышает допустимые пределы нормативной документацией на 2 порядка на протяжении всего периода исследования.

2. Обнаружение БГКП и бактерий рода *Enterococcus* в исследованных образцах, может указывать на фекальное загрязнение среды обитания мидий.

3. *Staphylococcus aureus* и бактерии рода *Salmonella* не были обнаружены во всех пробах в течение всего периода исследования.

Литература.

1. Пученкова С. Г. Санитарно- микробиологический контроль мидий и устриц в районах их выращивания. Дис... канд. биол. наук. Москва, 1992. – 197 с.
2. Промысловые и перспективные для использования водоросли и беспозвоночные Баренцева и Белого морей / под ред. Г.Г. Матишова. - Апатиты: изд-во КНЦ РАН, 1998. - 628 с.
3. Промышленное разведение мидий и устриц [Текст] / Ред. - сост. И.Г. Жиликова. - М.: ООО Издательство АСТ; Донецк: Сталкер, 2004. – 110 с.: ил.
4. СанПиН 2.3.2.1078-2001. Продовольственное сырье и пищевые продукты: Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов.- М.- 1997.- 296 с.
5. ГОСТ Р ИСО 7218 - 2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям. Введ. 2010-01-01. - М.: Стандартиформ, 2010.- 59 с.
6. ГОСТ 26669 - 1985 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов. Введ. 1986-01-07. – М.: Изд-во стандартов, 2008. – 10 с.
7. Единый перечень товаров, подлежащих санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) на таможенной границе и таможенной территории таможенного союза, утвержден Решением Комиссии таможенного союза от 28 мая 2010г. № 299.

АНАЛИЗ ЗАВИСИМОСТИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ И ВРЕМЕНИ ИНКУБАЦИИ

Шкуратова Е.Б. (г. Мурманск, Мурманский государственный технический университет (МГТУ), кафедра Микробиологии и биохимии, E-mail: shkuratovaeb@yandex.ru)

Аннотация. Приведены данные о зависимости активности ферментного препарата гепатопанкреаса камчатского краба от температуры среды и времени инкубации. Определено, что при длительной инкубации в течение фиксированного времени, но при различных температурах ФПГКК способен преобразовать большее количество субстрата при температуре значительно отличающейся от температурного оптимума данного ФП.

Abstract. The data on the dependence of the activity of the enzyme preparation hepatopancreas of crab on the temperature and time of incubation. Determined that upon prolonged incubation for a fixed time, but at different temperatures enzyme preparation able to convert more of the substrate at a temperature significantly different from the optimum temperature of this preparation.

Key words: enzyme preparation, hepatopancreas, crab, temperature, activity.

Цель работы - изучение зависимости активности ферментного препарата гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* от температуры среды и времени инкубации.

В связи с этим в ходе исследований решались следующие задачи:

- оценить эффективность протеолиза при различных значениях температуры инкубационной среды (5-70 °С) с применением ФПГКК;
- оценить степень эффективности протекания протеолиза с применением ФПГКК в широком временном интервале (от 50 минут до 24 часов) при различных температурах инкубационной среды.

Материалы и методы. Объектом исследования служил ФП, выделенный из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes*, выловленного в Баренцевом море.

В качестве материала исследования использовался гепатопанкреас краба, который замораживали и хранили при температуре - 25 °С. Для гомогенизации сырья применяли трехкратное замораживание (минус 20 °С)-оттаивание (5 °С) с предварительным измельчением тканей на гомогенизаторе 1094 «Тесатор» (Швеция). Порошкообразные ферментные препараты для анализов получали из гепатопанкреаса крабов путем осаждения белковых веществ ацетоном. Для этого к гомогенату тканей приливали чистый холодный ацетон в соотношении 1:10 (тремякратно).

В исследуемом материале определяли общую протеолитическую активность, используя метод Ансона [Мухин, 2002] с некоторыми модификациями. При определении протеолитической активности последовательно изменяли температуру раствора (в интервале от 5 до 70 °С), определяя активность по расщеплению 1 %- ного раствора гемоглобина.

Активность всех ферментов выражали в единицах изменения оптической плотности растворов, содержащих продукты гидролиза различных субстратов при температуре 37 °С за 1 мин на 1 г сырой массы.

Результаты и обсуждения. Скорость ферментативных реакций, как и всяких других, зависит от температуры: при повышении температуры на каждые 10 °С скорость увеличивается примерно вдвое (правило Вант-Гоффа). Однако для ферментативных реакций это правило справедливо лишь в области низких температур – до 50-60 °С. При более высоких температурах ускоряется денатурация фермента, что означает уменьшение его количества; соответственно снижается и скорость данной реакции.

По мере увеличения времени инкубации скорость реакции также снижается, что может происходить вследствие уменьшения концентрации

субстрата, увеличения скорости обратной реакции, ингибирования фермента продуктом реакции, денатурации фермента.

Для каждого фермента существует, так называемый, «температурный оптимум», т.е. температура (диапазон температур), при которой он проявляет максимальную каталитическую активность. Данная функция плотно связана с временем инкубации.

Максимальную активность, как уже отмечалось ранее, ФПГКК проявляет при температуре 50 °С (рис. 1) [Мухин, 2007; Шкуратова, 2012]. Это несущественно отличается от оптимума протеиназ, характерного для теплокровных позвоночных (55 – 60 °С), хотя принято считать, что температурный оптимум активности ферментов обитателей холодных морей значительно ниже [Gildberg, 1988]. По данным других исследователей, максимальная активность по отношению к коллагену обнаруживается также при температуре 50 -55 °С [Литвин, 1993; Сахаров, 1992; Chen1991].

Также следует отметить, наличие некоторой активности при низкой температуре (5 – 10 °С), что, вероятно, следует рассматривать как пример биохимической адаптацией к холодным условиям среды обитания краба [Бернард, 1977; Уголев, 1985; Мухин, 2007; Шкуратова, 2012].

При температуре инкубационной среды более 50 °С отмечается снижение протеолитической активности пищеварительных протеиназ исследуемого объекта, что, очевидно, обусловлено денатурацией ферментов.

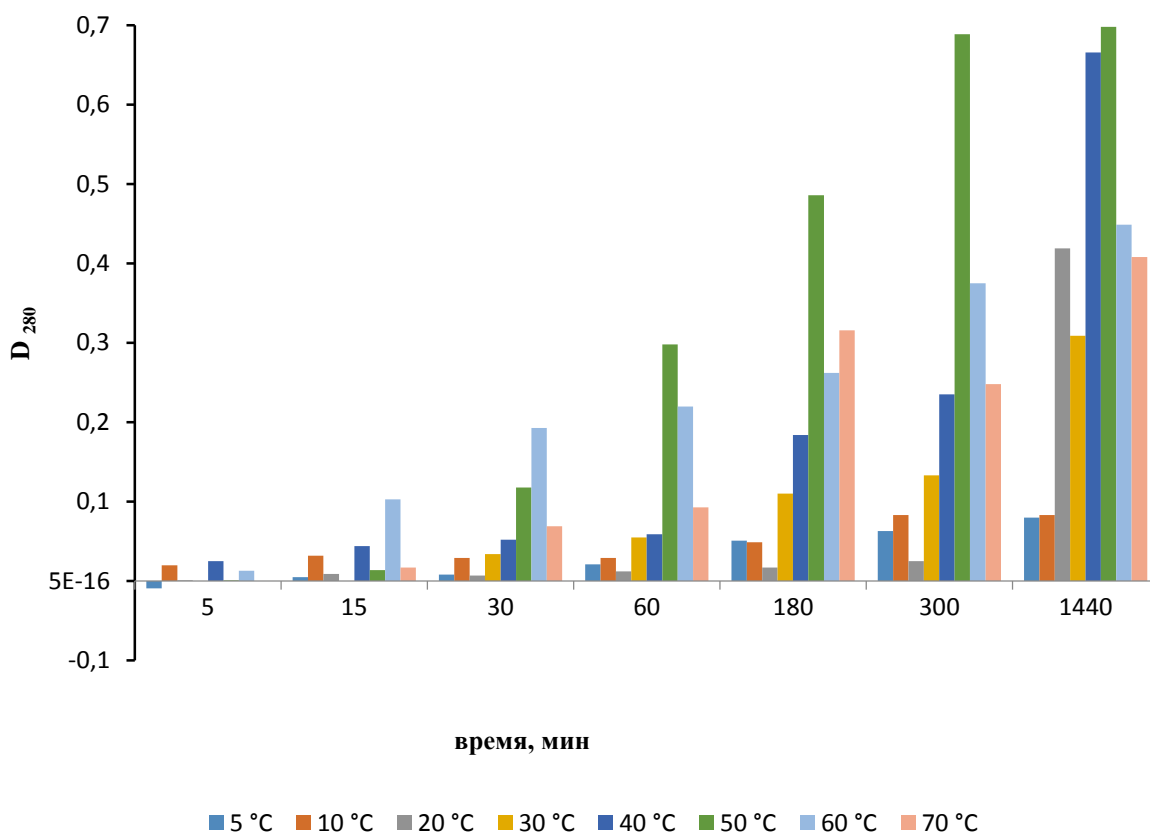


Рисунок 1 - Зависимость активности ферментного препарата из гепатопанкреаса камчатского краба (ФПГКК) от температуры и времени инкубации. Препарат разбавлен в 10000 раз; субстрат 1%-ный раствор гемоглобина; рН 7

В ходе анализа полученных данных было определено, что за одинаковое время инкубации (15 мин) ФПГКК способен преобразовать большее количество субстрата при температуре (10 °C), значительно отличающейся от «температурного оптимума» данного фермента (50-55 °C); за 5 часов инкубации при 5 °C больше, чем при 20 °C; за 24 часа при 20 °C больше, чем при 70 °C. В то же время установлено, что в течение 30 минут при температуре 50 °C данный ФП гидролизует значительно большее количество субстрата, чем при 5 °C; а при 50 °C гидролизует в 10 раз больше, чем при 5 °C.

Полученные данные не укладываются в рамки современного понимания термина «температурный оптимум», поскольку данный оптимум определяется только при определенном времени инкубации. Таким образом, характер температурной зависимости ферментативных реакций зависит от постановки эксперимента. Исследования температурной зависимости скорости ферментативных реакций обычно дают надежные результаты только в относительно небольшом интервале температур, например, от 0 до 50 °С. Чем дольше инкубируется реакционная смесь перед определением активности, тем ниже наблюдаемая «оптимальная температура».

Литература.

1. Мухин В. А., Новиков В.Ю. Протеолиз и протеолитические ферменты в тканях морских беспозвоночных. – Мурманск: Изд-во ПИНРО, 2002.
2. Мухин В.А., Смирнова Е.Б. //Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2007. – Т. 43, № 5. – С. 398-403.
3. Шкуратова Е.Б., Мухин В.А. Сборник материалов 4 научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития рыбной промышленности северного бассейна», 17-18 ноября 2011г. / МГТУ. – Мурманск: Изд-во МГТУ, 2012. – 180 с.
4. Gildberg A. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1988. – Vol. 91 B, No. 3. – P. 425-435.
5. Литвин Ф.Е. Коллагенолитические протеазы из гепатопанкреаса камчатского краба: выделение и свойства: Автореф. дис...канд. биол. наук. М., 20 с., 1993.
6. Сахаров И.Ю. Выделение и исследование ферментов из морских организмов и некоторые аспекты их применения: Автореф. дис... докт. хим. наук. М., 47 с., 1992.
7. Chen Y.L., Lu P.J., Tsai I. Collagenolytic activity of crustacean midgut serine proteases Comparison with the bacterial and mammalian enzymes//

Comp. Biochem. Physiol. – 1991.– .Vol.100B, No. 4. – P. 763-768/

8. Барнард Е. Сравнительная биохимия и физиология пищеварения // Сравнительная физиология животных. М., 1977. Т. 1. С. 285–348.
9. Уголев А. М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л., 1985.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Обухова Е.А. (Мурманск, ФГБОУ ВПО МГТУ, Б(б)-1),

Пашкина О. И. (Мурманск, ФГБОУ ВПО МГТУ, кафедра «Микробиология и биохимия»)

Витамин С является одним из основных веществ в человеческом рационе, которое необходимо для нормального функционирования соединительной и костной ткани. Выполняет биологические функции восстановителя и кофермента некоторых метаболических процессов, является антиоксидантом.

Принято считать, что среди симптомов нехватки в организме витамина С находятся слабость иммунной системы, кровоточивость дёсен, бледность и сухость кожи, замедленное восстановление тканей после физических повреждений, потускнение и выпадение волос, ломкость ногтей, вялость, быстрая утомляемость, ослабление мышечного тонуса, ревматоидные боли, расшатывание и выпадение зубов; хрупкость кровеносных сосудов приводит к кровоточивости дёсен.

Физиологическая потребность для взрослых составляет 90 мг/сутки, для детей – от 30 до 90 мг/сутки в зависимости от возраста. Источником витамина С для людей является пища. В природе витамин содержится во многих фруктах и овошах [Березин, 1990].

Целью исследования является сравнительный анализ содержания витамина С в биологическом материале. Объектами исследования стали грейпфрут, апельсин, мандарин, перец красный, виноград, виноград сухой (изюм) и порошок сухого шиповника. Количественное содержание витамина С определялось с помощью йодометрического титрования [Овчинникова, 1993].

Наибольшее количество витамина С содержится в свежих овощах и фруктах, особенно в плодах апельсина, мандарина, винограда и грейпфрута (рис. 1).

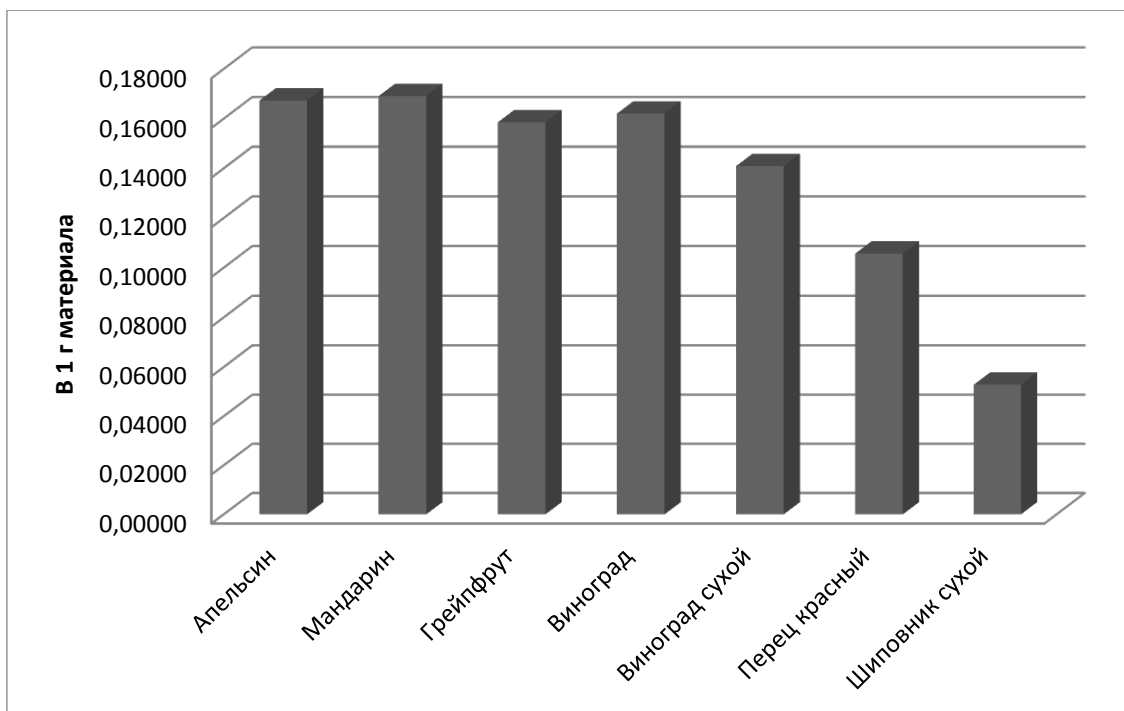


Рисунок 1 – Содержание витамина С в исследуемом биологическом материале

Концентрация витамина С в сухом винограде (изюме) несколько ниже, чем в свежем винограде. Наименьшее содержание витамина С было отмечено в красном перце и сухом шиповнике.

Содержание витамина С в исследуемых объектах оказалось в 2-3 раза ниже по сравнению с литературными данными [Дроздова, 2011]. Возможно, это связано с нарушениями условий и сроков хранения продуктов. Витамин С неустойчив и легко разрушается в присутствии окислителей (O_2), на свету и при длительном хранении.

Литература.

1. Березин, И.В. Основы биохимии / И.В. Березин. – М.: Изд-во МГУ, 1990.– 254 с.
2. Овчинникова, С.И. Конспект лекций по биологической химии. Раздел «Статическая биохимия» / С. И. Овчинникова ; Гос. ком. Рос. Федерации по рыболовству, МГАРФ. - Мурманск, 1993. – 140 с.
3. Дроздова, Т. М. Физиология питания : учебник / Т. М. Дроздова, П. Е. Влощинский, В. М. Позняковский. – М. : ДеЛи плюс, 2011 – 351

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ ТРОФИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП ГЕТЕРОТРОФНОГО БАКТЕРИОБЕНТОСА ЛИТОРАЛИ БУХТЫ БЕЛОКАМЕНКИ В ФЕВРАЛЕ-АПРЕЛЕ 2014 Г.

Гладченко А. В. (г. Мурманск, ФГБОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет», аспирант, спец. 03.02.10 «Гидробиология», кафедра «Микробиологии и биохимии»)

Грунт литоральной зоны – это особая динамичная система со сложными физико-химическими показателями и биологическим составом, существующая в условиях жесткого климатического режима и сильного антропогенного воздействия. В настоящее время прибрежные экосистемы среднего колена Кольского залива Баренцева моря стали зонами увеличивающейся антропогенной нагрузки. Приливно-отливная зона бухты Белокаменки среднего колена залива, как и литораль любой морской экосистемы – это особо продуктивная зона, где активно происходят процессы деструкции органических веществ, но в данный момент полигон испытывает антропогенный пресс в виде загрязнения акватории нефтепродуктами и неочищенными сточными водами поселка.

В процессах трансформации органических веществ и естественного очищения экосистемы литорали важную роль играют бактериальные сообщества грунта [Мишустина, 1085]. Органические и неорганические вещества, в том числе техногенного происхождения аккумулируются в грунте, и в дальнейшем подвергается распаду бентосными сообществами микроорганизмов, таким образом, осуществляя процесс естественное очищение водоема [Макаревич, 2004]. Микрофлора грунтов, быстро реагирующая на изменения условий окружающей среды, может служить индикатором степени антропогенного воздействия.

В настоящее время необходимость в получении сведений о структурных и численных характеристиках как физиологических, так и трофических групп бактериального населения грунта прибрежной зоны Кольского залива, функционирующего в условиях стабильного антропогенного пресса, очевидна как для теоретических, так и прикладных работ.

Исследования проводились в период с февраля 2014 г. по апрель 2014 г. Пробы грунта отбирались в литоральной зоне Кольского залива на станции бухта Белокаменка с соблюдением правил асептики посредством стерильного пластикового шприца с удаленной нижней частью. Для определения общей численности бактерий грунта литорали бухты Белокаменки использовали метод прямого счета с помощью эпифлуоресцентной микроскопии с окраской бактериальных клеток акридиновым оранжевым с применением черных поликарбонатных нелюминесцирующих фильтрах с диаметром пор 0,22 мкм [Методы изучения..., 1989]. Численность отдельных физиологических и трофических групп бактериобентоса (олиготрофных, евтрофных, углеводородокисляющих, аммонифицирующих, нитрифицирующих 1 и 2 фаз, денитрифицирующих микроорганизмов) определяли методом предельных разведений с использованием элективных питательных сред [Методы изучения..., 1989; Теппер, 1993].

Общая численность бактерий грунта литорали бухты Белокаменки составляла (рис.1): в феврале 2014 года $0,668 \times 10^9$ кл/г, в марте $0,509 \times 10^9$ кл/г, в апреле $0,9 \times 10^9$ кл/г. В марте 2014 минимум общей численности микроорганизмов грунта мог быть связан с низкой температурой воды и воздуха (по сравнению с февралем и апрелем 2014), а также с обледением литорали в момент отбора проб. В феврале 2014 года численность микроорганизмов увеличилась практически в 8 раз, по сравнению с тем же месяцем в 2013 году, что, возможно, связано с аномально холодным февралем 2013. Общая численность бактерий грунта литорали в марте и апреле 2014 г. изменялась в пределах одного порядка по сравнению с 2013 г. Незначительный разброс численности бактериобентоса литорали Белокаменки как в 2014 г., так и в сравнении с 2013 годом, может быть обусловлен степенью обогащения поверхностного слоя грунта легкоусвояемым органическим веществом автохтонного и аллохтонного происхождения, а также влиянием сточных вод. В целом, высокие значения общей численности бактерий в грунте литорали могут объясняться постоянным наличием в грунте значительных концентраций органического вещества.

Распределение трофических групп бактериобентоса литорали Кольского залива обусловлено пространственно-временными условиями, гидрохимическими параметрами прибрежной воды и антропогенными

факторами, действующими морскую экосистему. Результаты по численности физиологических групп бактериобентоса литорали Белокаменки в рассматриваемый период представлены в таблице 1.

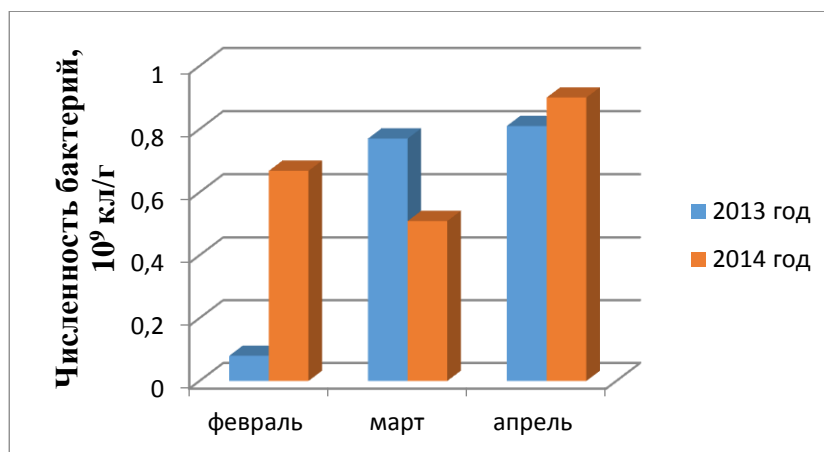


Рисунок 1 - Численность бактериобентоса литорали бухты Белокаменка (метод прямого счета)

Исследование численности двух эколого-трофических групп бактериобентоса (олиготрофов и эвтрофов) бухты Белокаменка в исследуемый период выявило доминирование эвтрофов (рис.2, табл.1). Возможно, это свидетельствует о присутствии легкоокисляемого органического вещества в больших количествах на данной станции. На диаграммах также заметны резкие минимумы численности гетеротрофных бактерий в марте 2014 г. Возможно, помимо обледенения литорали в марте, на снижение численности гетеротрофов в грунте могло оказывать влияние интенсивное развитие и размножение фитопланктона (микроводорослей), который подавляет жизнедеятельности бактерий.

Изучение углеводородокисляющих микроорганизмов грунта обычно связывают с загрязнением нефтью и нефтепродуктами. Для объективной оценки состояния экосистемы используют показатель K_y , отражающий отношение количества углеводородокисляющих микроорганизмов к числу гетеротрофных бактерий и являющийся косвенным показателем уровня загрязнения углеводородами [Ильинский, 2000]. Коэффициент изменялся в исследуемый период от 0,22 до 7,06. Достаточно высокие значения коэффициента K_y могут свидетельствовать о высоких концентрациях углеводородов, ведь Кольский залив - это акватория с развитой

промышленной зоной на побережье, активным круглогодичным судоходством, в результате чего его воды и грунт подвержены загрязнению углеводородами.

Нами также была дана оценка состояния экосистемы по шкале экологических модификаций [Дзюбан, 2005]. Результаты по средней общей численности бактерий грунта литорали Белокаменки, определенной методом прямого счета, численности гетеротрофного бактериобентоса, определенной методом предельных разведений и их соотношения в исследуемый период показали состояние экосистемы Белокаменки по показателю бактериобентоса как предкризисное состояние ($N_{очб}/N_{очгб} = 402414,5$).

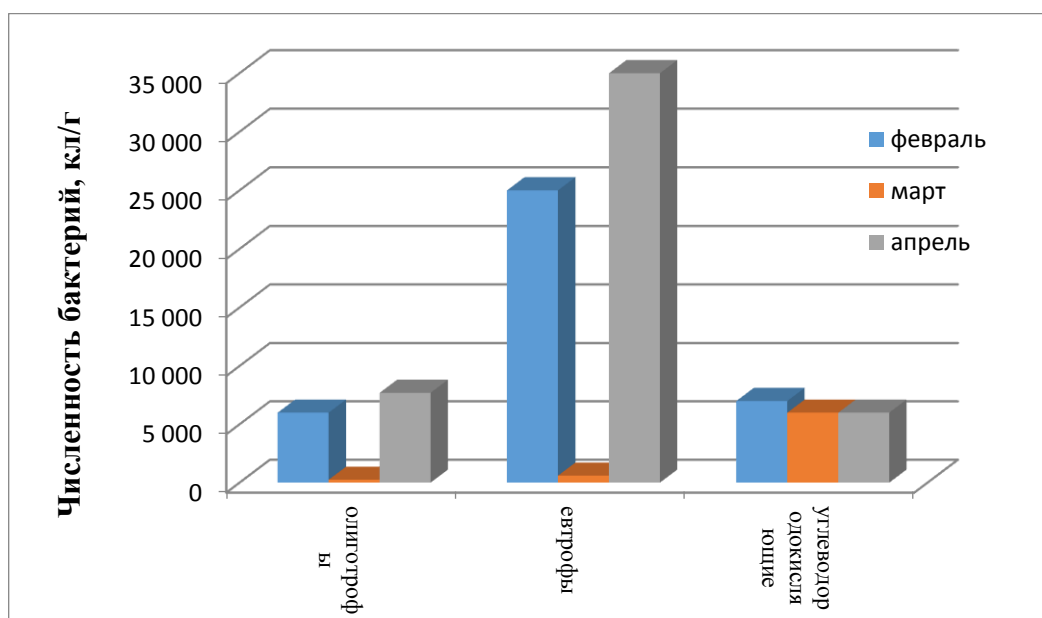


Рисунок 2 -Численность гетеротрофного бактериобентоса литорали бухты Белокаменка (метод предельных разведений)

Изучение физиологических групп бактериобентоса дает возможность составить представление о соотношении микроорганизмов, осуществляющих различные физиологические процессы, и до некоторой степени судить о господствующих направлениях в этих процессах. Результаты по численности физиологических групп бактериобентоса литорали Белокаменки в исследуемый период представлены в таблице 1.

Преобладающей физиологической группой бактериобентоса литорали исследуемой станции были аммонифицирующие бактерии (рис.

3, табл. 1), причем при исследовании бактериопланктона в 2012-2013 гг. была обнаружена такая же закономерность. Присутствие в грунте микроорганизмов этой группы свидетельствует о загрязнении белковыми органическими соединениями литоральной зоны станции, что может быть связано со сбросами неочищенных промышленных и хозяйственно-бытовых стоков. Кроме того, продуктивная зона литорали бухты Белокаменка и огромные заросли макрофитов на полигоне могут объяснять преобладание численности аммонификаторов над другими физиологическими группами.

Таблица 1 - Численность трофических и физиологических групп бактериобентоса литорали бухты Белокаменки Кольского залива в феврале – апреле 2014 года

Группы микроорганизмов	Февраль, кл/г	Март, кл/г	Апрель, кл/г
Олиготрофные бактерии	6 000	250	7700
Евтрофные бактерии	25000	600	35000
Углекислородокисляющие бактерии	7000	6000	6000
Аммонифицирующие бактерии	1300	20000	22000
Нитрифицирующие бактерии 1 фазы	1300	250	600
Нитрифицирующие бактерии 2 фазы	2500	6000	6300
Денитрифицирующие бактерии	1300	600	1300

Усиление антропогенной нагрузки на водоем, которое, возможно, приводит к увеличению численности групп аммонифицирующих микроорганизмов и одновременное снижение численности нитрификаторов первой фазы и денитрификаторов (рис. 3) свидетельствует об ухудшении микробиологического режима, усилении гнилостных процессов и создании условий для значительных потерь азота.

Также следует отметить, что значительное влияние на численные характеристики гетеротрофных микроорганизмов грунта литорали бухты может оказывать обширный макрофитоценоз данного полигона.

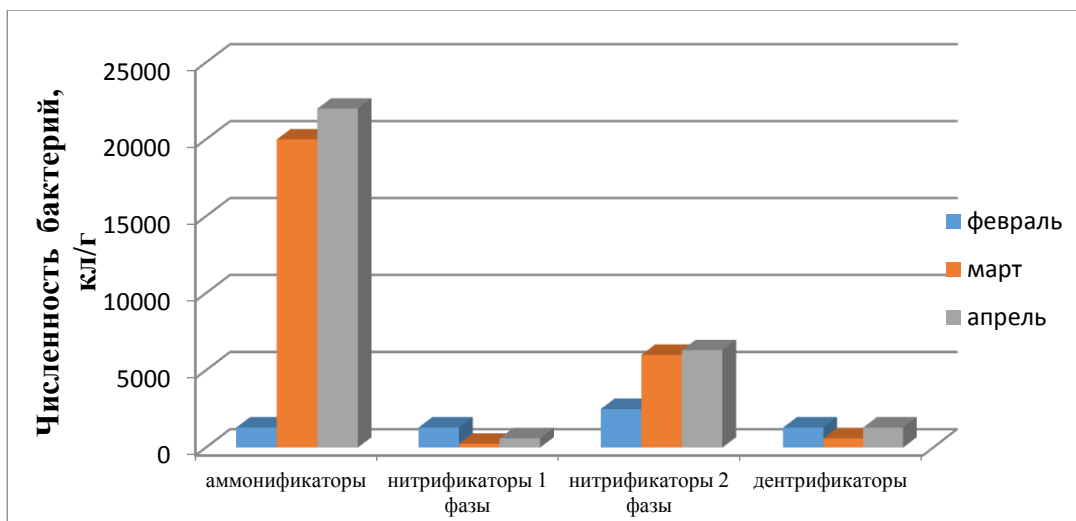


Рисунок 3 - Численность физиологических групп бактериобентоса литорали бухты Белокаменка

Заключение. Бактериобентос является одним из важнейших компонентов морских экосистем, главная функция которого заключается в минерализация растворенных и взвешенных органических соединения. С участием микроорганизмов грунта осуществляются важнейшие звенья круговорота веществ в водоемах, а кроме того эти бактерии способствуют самоочищению водоемов. Изучение структурно-функциональных показателей состояния бактериобентоса литорали бухты Белокаменки (среднего колена Кольского залива), которая испытывает увеличивающуюся антропогенную нагрузку, даст возможность не только судить о загрязнении водоема, но и может быть важной составляющей в оценке экологического состояния Кольского залива и морских акваторий в целом. Наше исследование показало неоднородное распределение численности физиологических и трофических групп бактериобентоса, что может быть связано с неодинаковой концентрацией автохтонных и аллохтонных органических веществ, а также со степенью усиливающейся антропогенной нагрузки на станцию Белокаменка. Также разница результатов численности различных групп микроорганизмов грунта объясняется, помимо изменения количества органического вещества, колебаниями температур, и биологическими особенностями развития каждой группы бактерий.

В дальнейшем предполагается детальное изучение физиологических и трофических групп бактериобентоса литорали бухты Белокаменки, и

других полигонов залива, отличающихся расположением, антропогенным прессом на экосистему и влиянием физико-химических факторов, ведь учет структурной, численной и пространственной организации бактериобентоса важен для освещения всех аспектов функционирования водной экосистемы и ее мониторинга.

Литература.

1. Мишустина, И. Е. Морская микробиология / И. Е. Мишустина, И. К. Щеглова, И. Н. Мицкевич. – Владивосток: Изд-во ДВГУ, 1985. – 184 с.
2. Макаревич, Е. В. Бактериобентос литорали среднего и южного колен Кольского залива: Дис. ... канд. биол. наук. – Мурманск: Изд-во МГТУ, 2004. – 163 с.
3. Методы изучения водных организмов / С.И.Кузнецов, Г.А.Дубинина. – М.: Наука, 1989. – 288 с.
4. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1993. – 175 с.
5. Ильинский, В. В. Гетеротрофный бактериопланктон: экология и роль в процессах естественного очищения среды от нефтяных загрязнений: Авт. дис. ... докт. биол. наук. – Москва, 2000. – 53 с.
6. Дзюбан А.Н. Экологическое состояние Шекснинского водохранилища: оценка на основе микробиологических исследований // Водные ресурсы. 2005. Т. 32. № 1. С. 70-78.

СПОСОБ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПОЧВ И ПОЧВЕННЫХ ВЫТЯЖЕК С ПОМОЩЬЮ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ

Яшкина А. А., Петранцова К. Ю. (г. Мурманск, ФГБОУ «МГТУ», кафедра «Экологии и защиты окружающей среды», anna_yashkina@mail.ru)

Аннотация. В приведенной работе рассматривается способ биотестирования почв и почвенных вытяжек с помощью растительных тест-объектов: овес посевной (*Avena sativa*) и редька посевная (*Raphanus sativus*). Предложены для проведения фитотестирования пластиковые контейнеры для вертикального размещения проростков испытуемых растений.

Abstract. Method of soil and soil extract biotesting with plant test-objects: oat (*Avena sativa*) and radish (*Raphanus sativus*) is considered in this paper. Plastic containers for vertical placement of seedlings were proposed for phytotesting.

Ключевые слова: почва, почвенная вытяжка, фитотестирование, тест-объекты.

Key words: soil, soil extract, phytotesting, test-object.

В последнее время все чаще для экотоксикологической оценки почв наряду с определением различных видов загрязняющих веществ применяют биологические методы, основанные на реакции живых организмов на загрязнение. Фитотестирование как способ токсикологической оценки используется в природоохранной сфере для оценки экологического качества природных сред. Особую актуальность в экологическом контроле приобретают лабораторные методы фитотестирования, как наиболее экспрессные и экономичные.

Фитотестирование основано на чувствительности растений к экзогенному химическому воздействию, что отражается на ростовых и морфологических характеристиках [Воробейчик, 1994; Лисовицкая, 2010]. Для проведения фитотестирования в настоящее время используются различные методики. Существующие методики по фитотестированию можно подразделить на две группы: методики фитотестирования с использованием водных вытяжек (элюатное фитотестирование) из исследуемых почв и методики, основанные на проращивании семян непосредственно в почве (апликатное фитотестирование) [Бакина, 2004]. Показателем токсичности почвы является степень изменения выбранной

тест-функции биоиндикаторного организма при его взаимодействии с исследуемым образцом почвы, либо почвенной вытяжки.

Наиболее распространенным вариантом лабораторного фитотестирования является проращивание семян в чашках Петри.

Для повышения экспрессности фитотеста предлагается использовать прозрачные планшеты, которые экспонируются вертикально. Проросшие семена в них развиваются в определенном смысле в «двухмерном пространстве», и для измерения длины проростков не требуется вскрытие камер и использование традиционной линейки [Лисовицкая, 2010]. Подобные контейнеры (размером 18 x 12 см) предложены бельгийскими учеными [Persoone, 2005] (рис. 1) и сотрудниками Международного учебно-научного биотехнологического центра МГУ имени М.В Ломоносова [Лисовицкая, 2010].



Рисунок 1 – Пластиковый контейнер (18x12 см) с проростками

Предлагаемые нами контейнеры, представляющие собой боксы для электронных оптических компакт дисков, так же позволяют проводить фитотестирование в «вертикальном исполнении» (рис. 2). К достоинствам нашего способа следует отнести простоту получения изображений, фиксирующих рост исследуемых тест-культур, легкость дальнейшей обработки изображений для получения необходимых данных для оценки исследуемых почв и почвенных вытяжек.

Целью данной работы является проведение фитотестирования почвы и почвенной вытяжки с применением пластиковых контейнеров для вертикального размещения проростков.

Объекты исследования:

- овес посевной (*Avena sativa*)
- редька посевная (*Raphanus sativus*)

Почвенную вытяжку готовили согласно ГОСТ Р 54496-2011. Далее она наносилась на впитывающий материал (распушенная целлюлозная пульпа), расположенный в нижней части контейнера. Почву смешивали с дистиллированной водой и также размещали в нижней части контейнера.



Рисунок 2 – Пластиковый контейнер и семена овса и редиса

Исследуемые семена растений редиса и овса (по 10 семян) помещались в подготовленные контейнеры, где поместили увлажненную почву и увлажненный почвенной вытяжкой впитывающий материал, с интервалом в 1 см (рис. 3).

Процесс роста тест-культур фиксировался при помощи сканирования контейнеров на МФУ (принтер-сканер-копир). Обработка полученных изображений происходила при помощи программы AutoCAD 2004 (рис. 3).

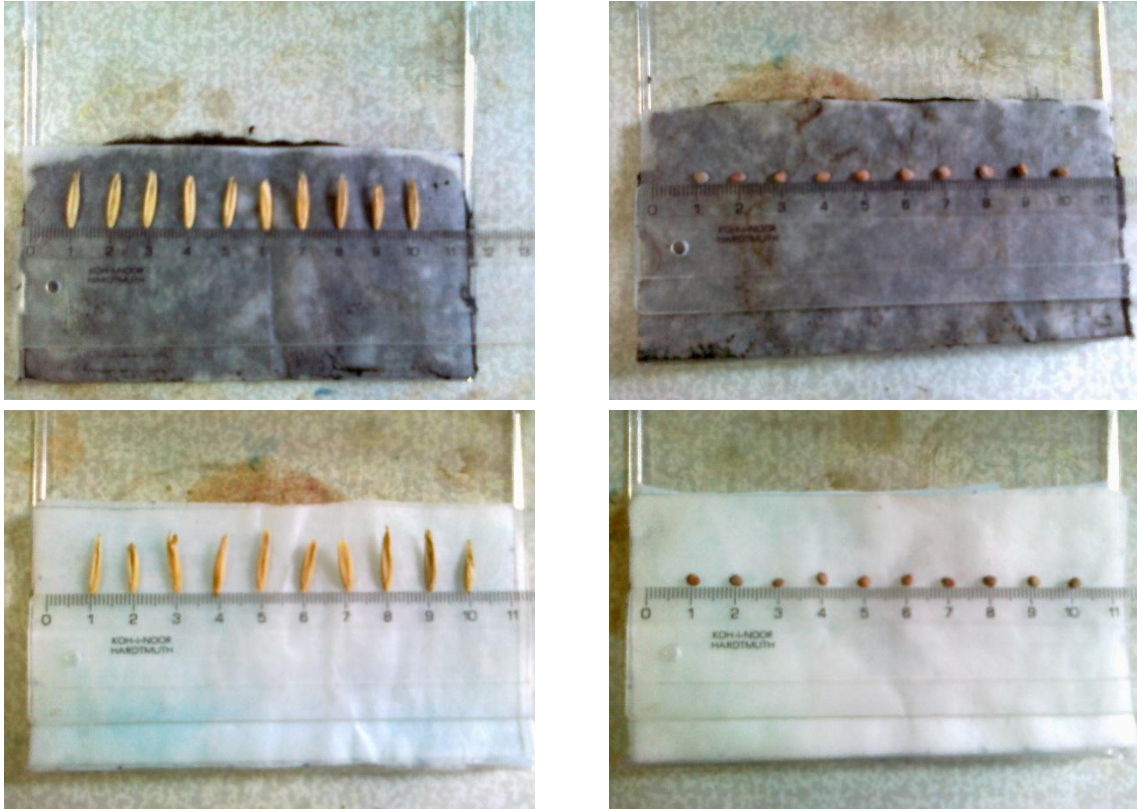


Рисунок 3 – Размещение семян в контейнере
(сверху – увлажненная почва, снизу – увлажненный впитывающий материал)

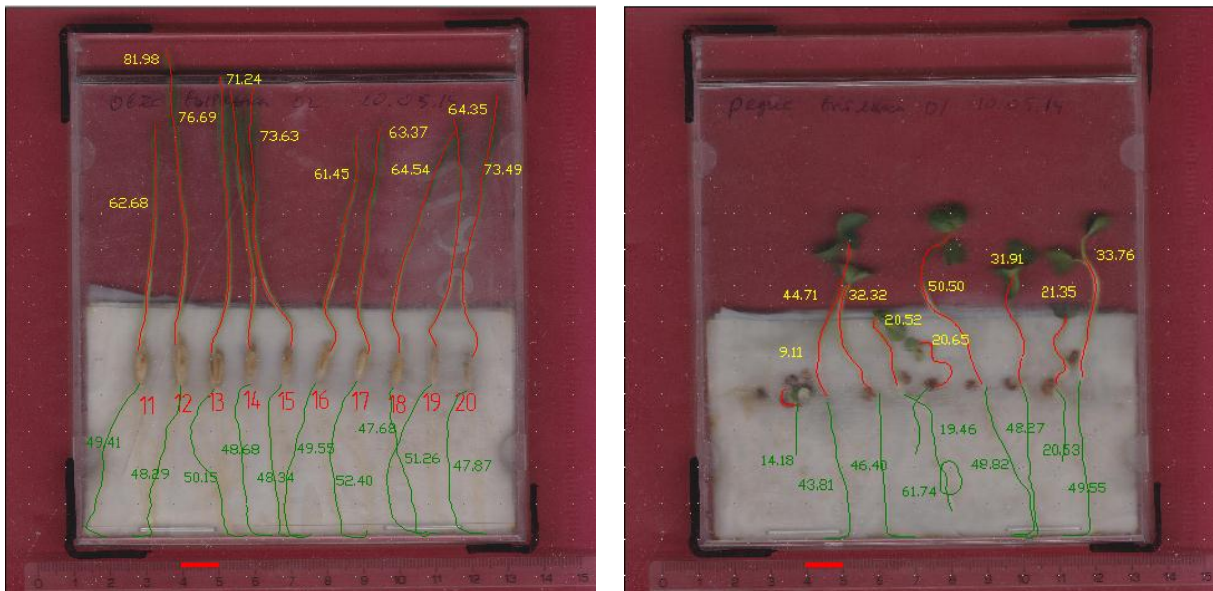


Рисунок 4 – Получение значений длины побегов и длины корней при помощи AutoCAD

В качестве показателей фитотеста принимаются:

- энергия проращивания (через 3 дня);
- всхожесть семян;
- длина корней;
- высота надземной части побега;
- масса надземной части побега.

Все указанные выше показатели достаточно легко фиксируются в процессе наблюдения за ростом растений. Сроки экспозиции: 5 дней для вытяжки, 7 дней для почвы.

Таким образом, предлагаемый способ фитотестирования может применяться для экспресс-анализа токсичности почв и почвенных вытяжек.

Литература:

1. Воробейчик, Е.Л. Экологическое нормирование техногенных загрязнений наземных экосистем / Е. Л. Воробейчик [и др.]. Екатеринбург : УИФ «Наука», 1994. – 282 с.

2. Лисовицкая, О.В. Фитотестирование: основные подходы, проблемы лабораторного метода и современные решения / О. В. Лисовицкая, В. А. Терехова // Доклады по экологическому почвоведению. – 2010. – №1. – С. 1-18.

3. Бакина, Л. Г. К методике фитотестирования техногенно загрязненных почв и грунтов / Л. Г. Бакина [и др.] // Материалы Междунар. конф. «Экологические проблемы северных регионов и пути их решения». Ч. 1. Апатиты, 2004. – С. 167–169.

4. Persoone, G. Recent new microbiotests for cost-effective toxicity monitoring : the Rapidtoxkit and the Phytotoxkit / G. Persoone // 12th International Symposium on Toxicity Assessment - Book of Abstracts, 2005, p. 112.

5. ГОСТ Р 54496-2011 (ИСО 8692:2004) Вода. Определение токсичности с использованием зеленых пресноводных одноклеточных водорослей.