

Экологический мониторинг водных экосистем на основе нового микробиологического метода

И.В. Мошарова, старший научный сотрудник, канд. биол. наук¹,

В.В. Ильинский, профессор, д-р биол. наук¹,

М.Н. Корсак, доцент, канд. биол. наук²

¹ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

² Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана

e-mail: ivmpost@mail.ru

Ключевые слова:

микробиологические методы,
экологический мониторинг,
бактериопланктон,
бактериальные клетки с активным
метаболизмом,
микробиологические параметры,
пресноводные экосистемы,
морские экосистемы.

Одним из основных компонентов водных экосистем является гетеротрофный бактериопланктон, осуществляющий процессы деструкции органического вещества, что обеспечивает самоочищение водных экосистем. Задачи, стоящие перед современным экологическим мониторингом водных экосистем, требуют учета не только общей численности и численности отдельных физиологических групп бактерий, но также определения количества активно функционирующих в данный период времени микроорганизмов. В настоящее время очевидно, что результаты определения численности и биомассы бактериопланктона, полученные с помощью традиционных методов прямого счета не отражают количества реально функционирующих и участвующих в биогеохимических циклах микроорганизмов. Методы, позволяющие выполнять такие исследования, основаны на применении специальных флуоресцентных красителей, которые используются как биохимические маркеры различных протекающих в бактериальной клетке физиологических процессов. Представлены результаты применения метода учета бактериальных клеток с активным метаболизмом для экологического мониторинга морских и пресноводных экосистем. Данный метод был применен при исследованиях микробного населения в речных, озерных, эстуарных, шельфовых морских экосистемах, а также в глубоководных морских впадинах с целью определения численности активно функционирующих бактерий. Использование маркеров дыхательной активности показало, что лишь незначительная доля (в основном от 0,1 до 30%, а в отдельных случаях – до 90% клеток в общей численности бактериопланктона) обладает активным метаболизмом и обеспечивает процессы деструкции органического вещества в водных экосистемах. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения данного микробиологического метода в рамках экологического мониторинга водных экосистем для учета бактериопланктона, обладающего активным метаболизмом.

Введение

Современный технический прогресс вызывает стремительные изменения в состоянии окружающей среды, приводит к формированию техносферы. С учетом нарастающего воздействия деятельности человека на биосферу особое значение приобретают постоянный контроль и мониторинг состояния окружающей среды, ее отдельных компонентов и динамики происходящих в экосистеме изменений.

Для оценки и контроля этих изменений применяется система экологического мониторинга. Одной из ее задач является оценка состояния основных компонентов экосистем. Гетеротрофный бактериопланктон является важным компонентом водных экосистем, осуществляющий процессы деструкции органического вещества, что обеспечивает самоочищение водных экосистем. Значительная численность бактериопланктона и ряд особенностей его метабо-

лизма — высокая скорость размножения, способность к деструкции органического вещества, а со временем и к полной утилизации не только практически всех известных природных органических соединений, но и многих веществ антропогенного происхождения, — обуславливают исключительно важную функцию бактерий в биогеохимических циклах элементов и процессах самоочищения, протекающих в водоемах. Метод определения численности бактериопланктона в водоемах остается одним из основных биологических методов экологического мониторинга. Однако известно, что лишь незначительное количество бактериальных клеток в бактериоценозе водоема активно функционирующие, а значит, осуществляющие процессы очищения водоема [1, 2]. Предлагаемый нами метод учета численности активно функционирующих бактерий значительно повышает точность экологического мониторинга.

2. Стандартные методы микробиологического мониторинга

К числу стандартных методов микробиологического мониторинга относятся учет общей численности бактериопланктона (ОЧБ) и определение численности отдельных физиологических групп бактерий, способных к росту на питательных средах [3, 4].

Общая численность бактериопланктона в воде учитывается методом прямого счета под микроскопом бактериальных клеток, окрашенных специальными красителями. Наиболее часто в настоящее время применяются два красителя: акридин оранжевый (АО) и ДАФИ (4,6-диамидино-2-фенилиндол). Действие АО основано на том, что этот краситель специфически связывается с нуклеиновыми кислотами в бактериальной клетке и в результате объекты при просматривании препарата под эпифлуоресцентным микроскопом приобретают ярко-оранжевое свечение. Краситель ДАФИ связывается с бактериальной двухцепочечной ДНК, образовавшийся комплекс ДНК-ДАФИ в падающем свете с длиной волны около 365 нм флуоресцирует ярко-голубым. Не имеющий двухцепочечной ДНК биологический материал при микроскопировании имеет светло-желтое свечение.

Метод прямого счета бактериопланктона дает представление об особенностях распределения микробного населения в водоеме. При использовании этого метода подсчитываются все бактериальные клетки, оказавшиеся на фильтре, вне зависимости от их физиологического состояния. При рассмотрении большинства экологических вопросов, касающихся, в частности, круговорота биогенных веществ или процессов биодеградации загрязняющих элементов в экосистеме, более важны данные о численности активно функциониру-

ющих бактерий, а не об общем количестве бактерий, многие из которых могут быть неактивны или мертвы.

Традиционные методы посева на питательные среды помогают получить представление о численности активных бактерий, способных расти и формировать колонии, но только в культуральных условиях. Для целей экологического мониторинга чаще используют жидкие питательные среды, а учет численности бактерий производится методом предельных разведений [3, 4]. Принцип метода состоит в том, что производят серийные разведения (обычно десятикратные) проб воды, при этом предполагается, что для образования видимого роста в среде достаточно присутствия в ней только одной клетки бактерии. Соответственно, в последнем разведении не должно остаться ни одной бактериальной клетки, способной к росту на питательной среде. Например, при учете численности сапротрофных бактерий методом предельных разведений используют модифицированную жидкую среду Зобелла 2216Е [4] или разбавленный рыбный бульон, приготовленный на искусственной морской воде либо на воде с места отбора проб [3, 4]. При учете других физиологических групп бактерий применяются жидкие среды соответствующего состава, например минеральная среда ММС с дизельным топливом в качестве единственного источника углерода и энергии в случае учета углеводородокисляющих бактерий [4]. Существенным недостатком метода предельных разведений является его низкая чувствительность — в случае малой численности бактерий в воде (менее 10 кл/мл) обнаружить их присутствие этим методом невозможно. Для учета численности культивируемого бактериопланктона, особенно при его низкой численности в пробе воды, можно использовать плотные (чаще всего агаризованные) питательные среды. В этом случае в зависимости от обилия бактериального населения производят непосредственный высеv проб воды на поверхность питательной среды или предварительно концентрируют клетки бактерий на мембранных фильтрах, которые затем помещают на поверхность плотной питательной среды. После подсчета выросших колоний результаты посева представляют как количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в единице объема пробы воды. Для практических целей важен показатель численности гетеротрофных бактерий, способных к росту на питательных средах, в разных водных экосистемах, причем не в абсолютном, а в относительном исчислении — как доля от общей численности бактерий по прямому счету. Соотношение между численностью сапротрофных бактерий и общей численностью микроорганизмов (коэффициент Разумова) используется для оценки степени трофии пресноводных водоемов [4].

3. Проблемы адекватности экологических оценок стандартными методами

При определении ОЧБ с помощью метода прямого счета с использованием красителей-флуорохромов (чаще всего акридинового оранжевого или ДАФИ) на препарате учитываются все окрашенные бактериальные клетки. Однако в природных условиях микроорганизмы могут находиться в любой точке широкого градиента активности их метаболизма, в том числе они могут быть мертвыми или «дремлющими», и часто именно эта фракция слабо функционирующих бактериальных клеток доминирует в составе микробиоценоза. Таким образом, результаты определения численности и биомассы бактериопланктона, полученные с помощью метода прямого счета, не отражают количество реально функционирующих и участвующих в биогеохимических циклах микроорганизмов.

Методы посева на жидкие или твердые питательные среды часто применяются в мониторинговых исследованиях для определения численности функционирующих бактерий. С помощью этих методов учитываются так называемые «индикаторные» или эколого-физиологические группы бактериопланктона [3, 4]. Бактериальные клетки, способные к росту на питательных средах, считаются активно функционирующими и способными к микробной трансформации различных субстратов. Однако эти методы также имеют значительные ограничения, поскольку к росту на питательных средах способно не более 1–3 % свободноживущих бактерий от общей численности микроорганизмов, учитываемой по прямому счету [4]. Это может происходить по многим причинам. Например, извлеченные из своей среды обитания микроорганизмы могут переходить в некультивируемую стадию или в пробе могут преобладать виды, для которых ещё не подобраны подходящие условия выращивания и пр.

4. Современные методы микробиологического мониторинга

На современном этапе развития экологии микроорганизмов уже не вызывает сомнения, что для оценки состояния бактериопланктона и его способности к трансформации и минерализации органического вещества необходимо не только учитывать его общую численность и численность отдельных физиологических групп, но и определять количество активно функционирующих в данный период микроорганизмов. Методы, позволяющие выполнять такие исследования, основаны на применении специальных флуоресцентных красителей, которые используются не только для окраски клеток бактерий, но и как биохимические маркеры различных протекающих в ней физиологических процессов. В последнем случае они дают яр-

кую флуоресценцию при обнаружении у микроорганизма какого-либо процесса активного метаболизма. Наиболее часто применяются маркеры активности электронно-транспортной цепи бактериальных клеток, в частности соли тетразолия: 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-фенил тетразолиум хлорид (ИНТ) и 5-циано-2.3-дифенил-тетразолиум хлорид (ЦТХ) [5]. Ионы тетразолия в процессе активного дыхания бактерий восстанавливаются внутри бактериальных клеток до формазана, кристаллы которого имеют ярко-красную флуоресценцию и хорошо видны под эпифлуоресцентным микроскопом. Таким образом, количество клеток с активным дыханием на препарате легко подсчитать и сопоставить с общей численностью бактериопланктона, определенной стандартным методом эпифлуоресцентной микроскопии.

В настоящее время с использованием маркеров дыхательной активности установлено, что лишь незначительная доля (в основном от 0,1 до 20 %, а в некоторых случаях до 70 % клеток от общей численности бактериопланктона) обладает активным метаболизмом. Именно эта небольшая доля активно функционирующих клеток в составе бактериоценоза и обеспечивает процессы деструкции загрязнений в водных экосистемах [1, 2, 5, 6].

Методы учета бактериальных клеток с активным метаболизмом с использованием солей тетразолия активно применяются в мировой практике в ходе проведения микробиологических исследований и экологического мониторинга [1, 2, 5, 6]. Однако до сих пор, к сожалению, они крайне редко используются в мониторинговых исследованиях в России. Нами данный метод был применен при исследовании микробного населения в речных [7], озерных [8, 9], эстуарных [10], шельфовых морских экосистемах [10], а также в глубоководных морских впадинах [11] с целью определить численность активно функционирующих бактерий.

5. Результаты применения нового метода микробиологического мониторинга в пресноводных и морских экосистемах

Пробы морских и эстуарных вод для учета численности в них активно функционирующих бактерий, а также общей численности бактерий (ОЧБ), были отобраны во время 59-го рейса научно-исследовательского судна «Академик Мстислав Келдыш» в период с 15 по 29 сентября 2011 г.

Станции пробоотбора располагались вдоль разреза через эстуарий р. Енисей, на шельфе Карского моря и на разрезах вдоль двух отрогов глубоководного желоба Святой Анны. Для отбора проб использовали комплекс «Rosette», оснащенный набором батометров и STD-зондом. Пробы воды помещали в стерильные полипро-

пиленовые пробирки и обрабатывали на борту судна сразу после их доставки в лабораторию [10, 11].

Пробы воды из реки Москвы и из озер лимнологического комплекса ООПТ «Косинское трехозерье» (г. Москва) отбирали с глубины около 0,5 м ежемесячно в течение 2011 г. на станциях, которые располагались на расстоянии 5–10 м от береговой линии. Для отбора проб использовали батометр-бутылку, оснащенный стерильной склянкой объемом 250 мл. В лабораторию пробы доставляли в переносной сумке-холодильнике, а их анализ проводили не позднее 2 часов после отбора [8, 9].

Для определения ОЧБ использовали метод эпифлуоресцентной микроскопии с окраской клеток водным раствором флуорохрома акридинового оранжевого в конечной концентрации 0,1 % [4]. Для учета численности активных клеток применяли соль тетразолия — 5-циано-2.3-дифенил-тетразолиум хлорид (ЦТХ). Рабочий раствор ЦТХ готовили согласно [5]. Пробы воды инкубировали в присутствии ЦТХ в концентрации 5 мМ в течение 4 ч при температуре *in situ*. После завершения инкубации пробу фиксировали раствором формалина (4%), а клетки из пробы концентрировали на черном мембранном фильтре Nucleopore (USA) с диаметром пор 0,22 мкм. Фильтр подсушивали на фильтровальной бумаге в темноте при комнатной температуре и готовили препарат с использованием нефлуоресцирующего иммерсионного масла Olympus. Готовые препараты бактерий из морских и эстуарных вод немедленно просматривали под микроскопом Leica DMR-5000B в судовой лаборато-

рии НИС «Академик Мстислав Келдыш» или под микроскопом Nikon E-200F (в стационарной лаборатории МГУ) при увеличении 1000X. Для каждого препарата просчитывали не менее 20 полей зрения, при этом учитывали не менее 200 бактериальных клеток.

В результате анализа микробиологических параметров, полученных в различных водных экосистемах, было установлено, что наиболее высокие значения ОЧБ и активного бактериопланктона были определены в Косинских озерах: среднее за год значение ОЧБ для вод этих озер составило 3896 тыс. кл/мл при варьировании от 1154 до 11523 тыс. кл/мл. Среднегодовая численность бактериопланктона с активной электрон-транспортной цепью для этих проб воды составила 240 тыс. кл/мл, при очень большом размахе колебаний неусредненных значений этого параметра — от 1 тыс. кл/мл до 1301 тыс. кл/мл. Средняя величина доли активно функционирующих клеток от ОЧБ составила 7%, при варьировании от 0,1 до 46,4% (см. таблицу).

В водах трех станций на р. Москве измеренные значения ОЧБ оказались практически на одном уровне с численностью этого параметра в Косинских озерах.

Среднегодовое значение ОЧБ для речных вод составило 3211 тыс. кл/мл, при варьировании от 1202 тыс. кл/мл до 4960 тыс. кл/мл. Среднее значение численности активных клеток для этих вод составило 184 тыс. кл/мл, при варьировании от 28 тыс. кл/мл до 575 тыс. кл/мл. Доля активных клеток в составе бактериопланктона составила в среднем 6%, при размахе колебаний этого параметра от 0,8 до 15,0%.

Таблица

Результаты исследований

Водоем	Общая численность бактерий (ОЧБ), тыс. кл/мл	Численность бактерий с активной электрон-транспортной цепью, тыс. кл/мл	Доля бактерий с активной электрон-транспортной цепью в общей численности бактерий (%)
Лимнологический комплекс «Косинское Трехозерье» 2011 г. [8, 9]	3896 (от 1154 до 11523)	240 (от 1 до 1301)	7 (от 0,10 до 46,4)
озеро Белое	4991 (от 2456 до 11523)	351 (от 2 до 1390)	8 (от 0,10 до 46,40)
озеро Святое	3829 (от 1154 до 6803)	210 (от 1 до 89)	6 (от 0,38 до 32,48)
озеро Черное	2867 (от 1243 до 5677)	158 (от 5 до 386)	7,4 (от 0,12 до 18,02)
р. Москва 2010 г. [7]	3211 (от 1202 до 4960)	184 (от 28 до 575)	6 (от 0,8 до 15,0)
ст. Тушино	3132 (от 1619 до 4790)	150 (от 53 до 550)	4,6 (от 2,0 до 1,4)
ст. Воробьевы горы	3197 (от 1202 до 4960)	157 (от 28 до 575)	5,6 (от 0,8 до 1,3)
ст. Дзержинский	3304 (от 2150 до 4263)	247 (от 70 до 540)	7,7 (от 2,0 до 15,0)
Эстуарий р. Енисей 2011 г. [10]	278 (от 29 до 1248)	42 (от 2 до 131)	23,4 (от 2 до 78)
распресненные воды эстуария	743 (от 312 до 1248)	105 (от 80 до 131)	17,4 (от 7,8 до 35,5)
область смешения речных и морских вод	175 (от 29 до 529)	19 (от 2 до 42)	13,6 (от 2 до 32)
область Обь-Енисейского речного выноса	58 (от 37 до 97)	21 (от 6 до 41)	36 (от 12 до 78)
Желоб Св. Анны (открытая часть Карского моря) [11]	29 (от 9 до 105)	12 (от 1 до 92)	38 (от 6 до 94)

В водах эстуария реки Енисей значения ОЧБ оказались значительно ниже, чем в водах Косинских озер и р. Москвы. Среднее значение ОЧБ составило 278 тыс. кл/мл, при варьировании от 29 тыс. кл/мл до 1248 тыс. кл/мл. Численность бактерий с активным метаболизмом в эстуарных водах также оказалась значительно ниже, чем в водах р. Москвы: среднее значение составило 42 тыс. кл/мл, при значительном варьировании от 2 тыс. кл/мл до 131 тыс. кл/мл. При этом доля активно функционирующих клеток в составе ОЧБ в этом случае оказалась значительно выше, чем в водах р. Москвы и озер. Средняя для вод эстуария р. Енисей величина доли активных клеток в составе ОЧБ составила 23,4% при варьировании от 2 до 78%. При этом доля активных бактериальных клеток в составе ОЧБ увеличивалась по направлению от распресненных вод устья Енисея к морскому шельфу (см. таблицу), что скорее всего, было связано со снижением влияния пресных вод на морской бактериопланктон, который лучше адаптирован к высокой солености и низкой температуре воды.

Интересно отметить, что для глубоководной части Карского моря — акватории желоба Святой Анны — при минимальной для обследованных морских и эстуарных вод численности бактериопланктона (среднее значение ОЧБ для этих вод составило 29 тыс. кл/мл, при варьировании от 9 тыс. кл/мл до 105 тыс. кл/мл), была определена максимальная величина средней доли активных бактерий в составе ОЧБ. Она составила 38% при размахе колебаний от 6 до 94%.

6. Обсуждение

Применение современных микробиологических методов исследований для экологического мониторинга позволило установить, что в изученных пресноводных и морских экосистемах далеко не весь бактериопланктон в период наших наблюдений был активным. Наиболее высокая величина средней доли активного бактериопланктона была определена для открытой части Карского моря (желоба Святой Анны), она составила 38%. В то же время для пресноводных экосистем — вод Косинских озер и р. Москвы — этот показатель оказался значительно ниже, его величина составила только 7%.

Полученные нами результаты относительной численности активно функционирующих клеток в составе ОЧБ в различных водных экосистемах хорошо согласуются с результатами других исследователей, полученными для различных водоемов. В частности, показано, что доля активных клеток в составе бактериопланктона обычно варьирует от 0,1 до 35% [1, 2, 5, 6]. В то же время необходимо отметить, что результаты учета численности активно функционирующих клеток с использованием 5-циано-2,3-дитолил-

тетразолиум хлорида отражают численность не всех активно функционирующих клеток в составе бактериоценоза, а лишь клеток, которые обладают наиболее высоким уровнем метаболизма в момент проведения исследований [1]. Оставшиеся неучтенными клетки бактериопланктона могут быть как малоактивными, так и мертвыми. Полученные результаты в данном случае отражают не общую численность всех активно функционирующих гетеротрофных бактерий, а только количество тех из них, которые наиболее активно участвуют в процессах деструкции органического вещества клеток на момент исследования. Поэтому надо иметь в виду, что слабо функционирующие или «дремлющие» клетки, не учитываемые с помощью данного красителя, могут перейти в гораздо более активное состояние при изменении условий среды на более благоприятные для их развития.

Для оценки влияния различных экологических факторов на численность физиологически активных гетеротрофных бактерий нами был проведен корреляционный анализ. Наиболее важно при этом было изучить сопряженность продукционных и деструкционных процессов в исследованных экосистемах, определяющих сбалансированность круговорота в них органического вещества. В качестве меры продукционного потенциала водных экосистем была использована концентрация в них основного фотосинтетического пигмента — хлорофилла *a*.

В результате, по данным для 2011 г. были установлены значимые прямые корреляционные связи между количеством активных клеток в водах Косинских озер и содержанием в них хлорофилла *a* ($r = 0,4$ при $p < 0,05$) [9]. Аналогичные корреляционные зависимости между этими параметрами для вод этих озер были отмечены нами и ранее, в 2010 г. ($r = 0,63$ при $p < 0,05$) [8], такие же зависимости были обнаружены и для вод р. Москвы ($r = 0,76$ при $p < 0,01$) [7]. Близкая по величине корреляционная связь была получена нами для вод разреза вдоль эстуария р. Енисей, в этом случае численность активных клеток бактериопланктона также значимо коррелировала с содержанием в воде хлорофилла *a* ($R = 0,66$, $p < 0,001$) [10]. Наличие корреляционных зависимостей между этими параметрами в пресноводных, эстуарных и шельфовых морских экосистемах отмечалось ранее и другими авторами [6, 12]. В то же время для глубоководного района Карского моря (желоб Святой Анны) достоверная корреляционная связь между численностью активных бактерий и содержанием в воде хлорофилла *a* отсутствовала [11]. В связи с этим можно предположить, что в более продуктивных экосистемах (шельфовых, эстуарных, речных и озерных) обилие активного бактериопланктона в значительной мере зависит от содержания в их водах

хлорофилла *a*. Поскольку концентрация хлорофилла *a* является показателем обилия фитопланктона, а его прижизненные выделения являются важным лабильным субстратом для гетеротрофных бактерий, не удивительно, что фитопланктонное сообщество при его достаточно высоком развитии оказывает существенное влияние и на физиологическую активность бактерий, а не только на их общую численность. В то же время в олиготрофных морских районах, например в водах желоба Св. Анны, в которых обилие фитопланктона сравнительно невелико, бактериопланктон вынужденно переключается на другие источники органического вещества, которые уже не связаны напрямую с фитопланктоном [11]. В целом, такой микробиологический параметр, как численность активно функционирующего бактериопланктона, показал большую вариабельность и взаимосвязь с содержанием хлорофилла *a*, чем наиболее часто анализируемый отечественными микробиологами показатель ОЧБ.

7. Заключение

Метод определения численности бактерий в водоемах является одним из основных биологических

методов экологического мониторинга, потому что от численности бактерий во многом зависит скорость процессов самоочищения водоемов от загрязнений, в том числе загрязнений антропогенного происхождения. При этом активность самоочищения водоемов зависит от количества активных бактериальных клеток в водоеме. Однако проведенные исследования показали, что доля активных клеток в составе ОЧБ в большинстве случаев значительно меньше 100% и варьирует в широких пределах в зависимости от условий окружающей среды. Использование в экологическом мониторинге стандартного биологического показателя — общей численности бактерий, без учета доли активно функционирующих клеток, — не обеспечивает достаточную точность оценок экологического состояния водоема и потенциальной способности к его самоочищению. Результаты наших исследований свидетельствуют о целесообразности и перспективности применения в рамках экологического мониторинга водных экосистем нового микробиологического метода учета численности бактериальных клеток с активным метаболизмом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sherr B., Sherr E., del Giorgio P. Enumeration of total and highly active bacteria / *Methods in Microbiology / Marine Microbiology* V. 30 / Ed. John H. Paul, Academic Press. 2001. P. 129–160.
2. Sherr B.F., del Giorgio P.A., Sherr E.B. Estimating abundance and single-cell characteristics of respiring bacteria via the redox dye CTC // *Aquat Microb Ecol.* 1999. V.18. P. 117–131.
3. Методические основы комплексного экологического мониторинга океана / Под ред. А.В. Цыбань. М.: Гидрометеоиздат, 1988.
4. Ильинский, В.В. Гетеротрофный бактериопланктон / *Практическая гидробиология: Учеб. для студ. биол. спец. университетов* под ред. Федорова В.Д. и Капкова В.И. М.: ПИМ, 2006. С. 331–365.
5. *Methods in Stream Ecology* / Ed. Hauer F.R., Lambert G.A. Elsevier. 2006. p. 876.
6. del Giorgio P.A., Scarborough G. Increase in the proportion of metabolically active bacteria along gradients of enrichment in freshwater and marine plankton: implication for estimates of bacterial growth and production rates // *J. of Plankton Research.* 1995. V. 17. № 10. P. 1905–1924.
7. Мошарова И.В., Ильинский В.В., Маторин Д.Н., Мошаров С.А., Акулова А.Ю., Протопопов Ф.А. Мониторинг вод реки Москвы с помощью микробиологических параметров и флуоресценции хлорофилла *a*. // *Микробиология.* 2015. Т. 84. № 6. С. 712–724.
8. Ильинский В.В., Мошарова И.В., Акулова А.Ю., Мошаров С.А. Современное состояние гетеротрофного бактериопланктона Косинского Трехозерья // *Водные ресурсы.* 2013. Т. 40. № 5. С. 477–487.
9. Акулова А.Ю., Ильинский В.В., Мошарова И.В., Москвина М.И., Мошаров С.А., Комарова Т.И. Состояние гетеротрофного бактериопланктона побережья озер Святое и Белое природно-исторического парка «Косинский» (город Москва) в 2011 году // *Известия Самарского научного центра РАН.* 2014. Т. 16. № 1. с. 1185–1192.
10. Мошарова И.В., Ильинский В.В., Мошаров С.А. Состояние гетеротрофного бактериопланктона эстуария реки Енисей и зоны Обь-Енисейского речного выноса в осенний период в связи с факторами среды // *Водные ресурсы.* 2016. Т. 43. № 2. С. 202–215.
11. Мошарова И.В., Мошаров С.А., Ильинский В.В. Особенности распространения бактериопланктона с активным метаболизмом в водной толще желоба Святой Анны в Карском море в осенний период 2011 г. // *Океанология.* 2017. Т. 57. № 1. С. 1–9.
12. Sommaruga R., Conde D. Seasonal variability of metabolically active bacterioplankton in the euphotic zone of a hypertrophic lake // *Aquat Microb Ecol.* 1997. V.13. P. 241–248.

REFERENCES

1. Sherr B., Sherr E., del Giorgio P. Enumeration of total and highly active bacteria / *Methods in Microbiology / Marine Microbiology* V. 30 / Ed. John H. Paul, Academic Press. 2001. P. 129–160.

2. Sherr B.F., del Giorgio P.A., Sherr E.B. Estimating abundance and single-cell characteristics of respiring bacteria via the redox dye CTC // *Aquat Microb Ecol.* 1999. V.18. P. 117–131.
3. *Metodicheskie osnovy kompleksnogo ekologicheskogo monitoringa okeana* [Methodical bases of complex ecological monitoring of the ocean]. Moscow, Gidrometeoizdat Publ., 1988, 286 p. (in Russian)
4. Il'inskiy, V.V. Geterotrofnyy bakterioplankton [Heterotrophic bacterioplankton]. *Prakticheskaya gidrobiologiya* [Applied Hydrobiology]. Moscow, PIM Publ., 2006, pp. 331–365. (in Russian)
5. *Methods in Stream Ecology* / Ed. Hauer F.R., Lamberti G.A. Elsevier. 2006. p. 876.
6. del Giorgio P.A., Scarborough G. Increase in the proportion of metabolically active bacteria along gradients of enrichment in freshwater and marine plankton: implication for estimates of bacterial growth and production rates // *J. of Plankton Research.* 1995. V. 17. I. 10. P. 1905–1924.
7. Mosharova I.V., Il'inskiy V.V., Matorin D.N., Mosharov S.A., Akulova A. Yu., Protopopov F.A. Monitoring vod reki Moskvy s pomoshch'yu mikrobiologicheskikh parametrov i fluorestsentsii khlorofilla a [Monitoring of the Moscow River water by microbiological parameters and chlorophyll fluorescence as well]. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. 2015, V. 84, I. 6, pp. 712–724. (in Russian)
8. Il'inskiy V.V., Mosharova I.V., Akulova A. Yu., Mosharov S.A. Sovremennoe sostoyanie geterotrofnogo bakterioplanktona Kosinskogo Trekhozer'ya [The current state of the heterotrophic bacterial Kosinski Three Lakes]. *Vodnye resursy* [Water Resources]. 2013, V. 40, I. 5, pp. 477–487. (in Russian)
9. Akulova A. Yu., Il'inskiy V.V., Mosharova I.V., Moskvina M.I., Mosharov S.A., Komarova T.I. Sostoyanie geterotrofnogo bakterioplanktona pribrezh'ya ozer Svyatoye i Beloe prirodno-istoricheskogo parka "Kosinskiy" (gorod Moskva) v 2011 godu [Status heterotrophic bacterial coasts and lakes of the Holy White natural-historical park "Kosinski" (Moscow) in 2011]. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN* [Bulletin of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences]. 2014, V. 16, I. 1, pp. 1185–1192.
10. Mosharova I.V., Il'inskiy V.V., Mosharov S.A. Sostoyanie geterotrofnogo bakterioplanktona estuariya reki Enisey i zony Ob'-Eniseyskogo rechnogo vynosa v osenniy period v svyazi s faktorami sredey [Heterotrophic bacterial condition of the estuary of the river Yenisei and Ob and Yenisei zone alluvial river in the autumn due to environmental factors]. *Vodnye resursy* [Water Resources]. 2016, V. 43, I. 2, pp. 202–215. (in Russian)
11. Mosharova I.V., Mosharov S.A., Il'inskiy V.V. Osobennosti rasprostraneniya bakterioplanktona s aktivnym metabolizmom v vodnoy tolshche zheloba Svyatoy Anny v Karskom more v osenniy period 2011 g. [Features of distribution of the active bacterial metabolism in the water column of St. Anna Trench in the Kara Sea in autumn 2011]. *Okeanologiya* [Oceanology]. 2017, V. 57, I. 1, pp. 1–9. (in Russian)
12. Sommaruga R., Conde D. Seasonal variability of metabolically active bacterioplankton in the euphotic zone of a hypertrophic lake // *Aquat Microb Ecol.* 1997. V.13. P. 241–248.

Environmental Monitoring of Water Ecosystems Based on a New Microbiological Method

I.V. Mosharova, Ph.D. in Biology, Senior Researcher Lomonosov Moscow State University

V.V. Ilinskiy, Doctor of Biology, Professor Lomonosov Moscow State University

M.N. Korsak, Ph.D. in Biology, Associate Professor, Bauman Moscow State Technical University

One of water ecosystems' main components is heterotrophic bacterial plankton, carrying out processes of organic substance destruction that provides water ecosystems self-cleaning. The tasks facing modern environmental monitoring of water ecosystems demand the account not only the total number and number of separate physiological groups of bacteria, but also determination of quantity for microorganisms which are actively functioning during this time period. Now it is obvious that the results of bacterial plankton number and biomass determination received by direct account's traditional methods don't reflect quantity of the microorganisms which are really functioning and participating in biogeochemical cycles. The methods allowing carry out such researches based on use of special fluorescent dyes which are used as biochemical markers of various physiological processes proceeding in a bacterial cage. Results for application of a method for accounting of bacterial cages with active metabolism for marine and fresh-water ecosystems' environmental monitoring have been presented. This method has been applied at researches of the microbial population in river, lake, estuarial, shelf marine ecosystems, and also in deep-water sea hollows for the purpose of actively functioning bacteria' number determination. Respiratory activity markers use has shown that only an insignificant share (generally from 0.1 to 30%, and in some cases – to 90% of cages in the bacterial plankton's total number) possesses the active metabolism and provides processes of organic substance destruction in water ecosystems. The received results testify to prospects for application of this microbiological method within environmental monitoring of water ecosystems for accounting of the bacterial plankton possessing active metabolism.

Keywords: microbiological methods, environmental monitoring, bacterial plankton, bacterial cages with active metabolism, microbiological parameters, fresh-water ecosystems, marine ecosystems.