

Министерство образования и науки Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова
Кафедра ботаники и микробиологии

Н. В. Шеховцова

Экология водных микроорганизмов

Методические указания

*Рекомендовано
Научно-методическим советом университета для студентов,
обучающихся по специальности Биология*

Ярославль 2011

УДК 574.5
ББК Е 48я73
Ш 54

*Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2010/2011 учебного года*

Рецензент
кафедра ботаники и микробиологии
Ярославского государственного университета им. П. Г. Демидова

Шеховцова, Н. В. Экология водных микроорганизмов:
Ш 54 методические указания / Н. В. Шеховцова; Яросл. гос. ун-т
им. П. Г. Демидова. – Ярославль : ЯрГУ, 2011. – 84 с.

Предлагаемые методические указания включают инструкцию для выполнения лабораторных занятий по определению основных параметров гетеротрофного бактериопланктона с помощью наиболее доступных методов. Совокупность микробиологических показателей позволит студентам дать заключение о качестве воды в водоеме, об эффективности бактериальной активности в процессах самоочищения. Во второй части указаний приводятся материалы для самостоятельной работы.

Предназначены для студентов, специализирующихся в области биоэкологии и охраны природы и обучающихся по специальности 020201.65 Биология (дисциплина «Экология водных микроорганизмов», блок ДС), очной формы обучения.

УДК 574.5
ББК Е 48я73

© Ярославский государственный
университет им. П. Г. Демидова,
2011

Введение

Индикация качества природных вод по микробиологическим показателям в большинстве случаев превосходит по чувствительности многие химические и биохимические методы. Гетеротрофные бактерии – одна из самых многочисленных и разнообразных групп гидробионтов. Они обладают высокими темпами размножения, пластичным метаболизмом и осуществляют важнейшие биогеохимические процессы, такие как минерализация органических веществ и круговороты углерода, кислорода, водорода, азота, серы, фосфора, металлов и других элементов. Полученные за последние три десятилетия данные убедительно доказывают, что гетеротрофные бактерии являются важнейшим компонентом пищевых сетей и играют важную роль в структурной организации и функциях морских и пресноводных экосистем. Бактерии и другие микроорганизмы осуществляют процессы, отвечающие за формирование качества поверхностных и подземных вод, разложение и детоксикацию органических и неорганических загрязняющих веществ, в огромных количествах поступающих в окружающую среду. Таким образом, знания об экологии, функциях и разнообразии бактерий необходимы для понимания закономерностей структурной организации и функционирования водных экосистем [5, 12].

Цель настоящего практикума состоит в оценке качества воды в модельном водоеме по показателям гетеротрофного бактериопланктона, среди которых ключевое значение имеет общая численность бактерий ($N_{\text{общ.}}$). Этот параметр определяют методом прямого счета. Также к традиционным микробиологическим показателям комплексных гидробиологических исследований относятся численность сапротрофов и олиготрофов, оцениваемых методом чашечного посева на стандартные питательные среды. Для понимания вклада бактериопланктона в формирование качества воды важны такие его характеристики, как биоразнообразие, биомасса и продукция. Биоразнообразие оценивают по фенотипическим признакам, в основном по культуральным,

морфологическим и тинкториальным. Биомассу рассчитывают по величине $N_{\text{общ}}$. Продукцию и скорость выедания бактерий зоопланктоном определяют методом изолированных проб. Для оценки полноты деградации первичной продукции или аллохтонного органического вещества в водоеме дополнительно устанавливают численность сульфатредукторов методом десятикратных разведений. Определение потенциальной удельной скорости роста бактерий поможет установить основной фактор, регулирующий обилие бактериопланктона.

Для выполнения исследовательской работы группа студентов делится на временные творческие коллективы (ВТК) из шести (иногда восьми) человек, каждый из которых изучает свой модельный водоем. Для сравнения студентам предлагают модельные водоемы разного происхождения. Одни имеют полную экосистему (например, аквариум с рыбками), другие заполнены водой и осадками из водоемов с различной антропогенной нагрузкой. График выполнения лабораторных работ (табл. 1) приводится ниже.

Таблица 1

График лабораторных занятий

<i>№ n/n</i>	<i>Содержание занятия</i>	<i>Результаты работы</i>	<i>Теоретическая часть</i>
1.	Отбор проб воды из разных слоев модельного водоема. Подготовка их к микробиологическому анализу. Приготовление препаратов для определения общей численности бактериопланктона. Посев воды на плотные питательные среды для определения числа гетеротрофов	Окрашенный препарат на предметном стекле, 12 чашек Петри с посевами, лабораторный журнал (занятие 1)	Инструктаж по технике безопасности Распределение тем докладов
2.	Подсчет колоний на чашках Петри и расчет $N_{\text{сапр.}}$, $N_{\text{олиг.}}$ и $K_{\text{троф.}}$. Определение качественного состава сапротрофов и олиготрофов Отбор и посев образцов ила для выявления сульфатредукторов	Лабораторный журнал (занятие 2) Пробирки с посевами	Оценка трофического статуса водоема по показателям $N_{\text{сапр.}}$, $N_{\text{олиг.}}$, $K_{\text{троф.}}$ и качественному составу гетеротрофов. Доклады
3.	Подсчет клеток на окрашенных препаратах и расчет показателей $N_{\text{общ.}}$, B , B_c и $K_{\text{сапр.}}$	Лаб. журнал (занятие 3) Контрольная проверка лаб. журналов (№ 1)	Оценка качества воды в модельном водоеме по величине $N_{\text{общ.}}$, B , B_c и $K_{\text{сапр.}}$. Доклады
4–5.	Определение интегральных показателей активности бактериопланктона. Подсчет клеток на стеклах и расчет интегральных показателей активности бактериопланктона: удельной скорости роста (μ), времени генерации (g), продукции (P), скорости выедания бактерий (G), потенциальной удельной скорости роста (μ')	Препараты для определения числа клеток до и после инкубации в разных вариантах опыта Лаб. журнал (занятия 4–5). Контрольная проверка лаб. журналов (№2)	Доклады Оценка факторов регуляции продукции и биомассы бактериопланктона
6.	Учет численности сульфатредукторов Составление и защита группового отчета	Лаб. журнал (занятие 6, часть 1) Итоговая проверка лаб. журналов (№ 3) Групповой отчет, презентация	Доклады Тест по теме «Микробиологические методы изучения водных экосистем»

Лабораторное занятие 1

Тема «Отбор и подготовка проб воды для микробиологического анализа»

Одной из методических проблем водной микробиологии остается стерильный отбор проб воды из природных водоемов, особенно с поверхности осадков. Количественные искажения микробиологических показателей возникают вследствие изменения физико-химических параметров пробы воды после её помещения в стерильный контейнер. Адсорбция микробных клеток на стенках склянок играет при этом особенно важную роль, так как она приводит к уменьшению видового разнообразия в целом, но вызывает резкое увеличение обилия отдельных видов обычно в течение 24 часов после отбора. ZoBell (1946) назвал это явление эффектом твердой фазы. Отчасти оно преодолевается использованием пластиковых устройств, обладающих меньшими адсорбционными свойствами. Другой причиной искажений является высокая чувствительность многих водных микроорганизмов к изменению физико-химических условий при их изъятии из водоема, поэтому предпочтение отдается немедленной микробиологической обработке природных проб после их отбора. В полевых условиях это возможно на исследовательских судах и стационарах, расположенных непосредственно вблизи водоема. В лаборатории действие многих искажающих факторов успешно преодолевается в случае изучения микробиологических показателей модельных водоемов.

Общая задача. Для количественного и качественного анализа бактериопланктона 3 пары студентов, обследующих один модельный водоем, стерильно отбирают 3 пробы воды в следующей последовательности:

- 1) из поверхностной пленки (не глубже 2–3 см от поверхности водного зеркала),
- 2) из середины основной толщи воды,
- 3) из придонного слоя (не далее чем 5 см от поверхности грунта).

Каждая пара студентов обрабатывает свою пробу воды в течение трех занятий.

Материалы и оборудование постоянного пользования:

- 1) микроскоп световой,
- 2) кювета со стеклянной реечкой для окрашивания бактериальных препаратов,
- 3) песочные часы,
- 4) промывалка со свежей дистиллированной водой,
- 5) микробиологический лоток, на котором размещены следующие предметы:

- кусочки хозяйственного мыла,
- предметные стекла,
- кусочки фильтровальной бумаги размером с предметное стекло,
- салфетка,
- стаканчик с ватой,
- склянка с иммерсионным маслом,
- флакончик с бензином,
- реторта (капельница) со стерильной дистиллированной водой,
- реторта с красителем,
- спиртовка,
- спички,
- пинцет,
- микробиологическая петля.

Дополнительные материалы и оборудование (здесь и далее расчет на одну пару студентов):

1) для отбора и подготовки проб воды для микробиологического анализа: флакончик со спиртом, микроизмельчитель тканей РТ-2 (гомогенизатор); стерильные пипетка на 50–100 мл, стеклянная воронка с вложенным в нее бумажным складчатым фильтром, колбочка на 100–200 мл;

2) для приготовления препарата на определение общей численности бактериопланктона: парафиновый стеклограф, картонный трафарет 15×15 мм, стерильная пипетка на 0,1 мл;

3) для посева проб воды на лабораторные среды: электрическая плитка, термостат (28°C); 3 пробирки с 10 мл стерильной водопроводной воды, стерильные пипетки на 1 мл (6 шт.), чашки Петри (12 шт.), колбы с РПА и РПА, разбавленным в 10 раз (РПА 1:10), из расчета 20 мл на одну ч. Петри.

Часть 1. Отбор и обработка проб воды из модельного водоема

Ход работы. Подготовить к работе микроизмельчитель тканей РТ-2 (гомогенизатор). Для этого кусочек ваты намотать на пинцет, смочить его спиртом, протереть ватным тампоном роторный нож и металлический стакан прибора. Затем обе части гомогенизатора простерилизовать обжиганием с помощью подожженного ватного тампона. Металлический стакан прибора при обжигании следует держать дном вверх под некоторым углом, чтобы открытое пламя само погасло после исчерпания кислорода воздуха.

Стерильной пипеткой на 50–100 мл отобрать соответствующий объем воды из выбранной точки модельного водоема и поместить его в стерильный металлический стакан. Пробу обработать на гомогенизаторе в течение 60 секунд при 4000 об/мин для дезагрегирования бактериопланктона.

Для дальнейшей гомогенизации и удаления минеральных частиц пробу воды профильтровать через предварительно смоченный дистиллированной водой стерильный складчатый бумажный фильтр, вставленный в стеклянную воронку.

Фильтрованную пробу собрать в пустую стерильную колбочку на 100–200 мл. Полученный образец готов для дальнейшего микробиологического анализа.

Часть 2. Подготовка препаратов для прямого счета на стеклах (модифицированный метод Виноградского – Брида)

Ход работы. На предварительно обезжиренном (лучше стерильном) предметном стекле парафиновым стеклографом (карандашом по стеклу) нарисовать 2 квадрата размером 15×15 мм, используя картонный трафарет.

Стерильной пипеткой на 0,1 мл нанести внутрь каждого квадрата минимальную каплю фиксированного объема. Микробиологической петлей, простерилизованной прокаливанием и охлажденной в рабочей зоне пламени, распределить каждую каплю по всей площади квадрата. Мазок высушить на воздухе.

Далее в один из квадратов поместить вторую каплю фиксированного объема, повторив всю процедуру до полного высыхания препарата.

Затем препарат зафиксировать в пламени спиртовки и окрасить фуксином в течение 1–3 мин, после чего промыть дистиллированной водой и просушить между кусочками фильтровальной бумаги.

Окрашенные препараты поместить в планшет, чтобы сохранить для микроскопии на третьем занятии.

Часть 3. Посев на твердые питательные среды

Ход работы. Из фильтрованного образца воды приготовить ряд из трех последовательных 10-кратных разведений с соблюдением правил стерильной работы.

Для глубинного посева из каждого разведения стерильной пипеткой внести по 1 мл в 4 пустые стерильные чашки Петри.

Затем инокулят первых двух чашек одного разведения залить РПА, а двух остальных – РПА 1:10. Среда предварительно расплавить на плитке и охладить до 40–45°C. Для равномерного распределения посевного материала незастывшую среду сразу перемешать с инокулятом, перемещая чашки Петри осторожными круговыми движениями по поверхности стола.

После застывания среды чашки подписать перманентным маркером, завернуть в бумагу доньшком вверх и поставить в термостат (28–30°C) на 7–14 суток. Более длительная инкубация смысла не имеет вследствие высыхания среды.

Надпись на чашках Петри должна указывать, из какой точки, какого модельного водоема, кем, когда и на какую среду сделан посев.

Часть 4. Образец оформления лабораторного занятия

Дата

Лабораторное занятие 1

Цель и задачи практикума (УИРС).

Материалы и оборудование (основные).

Цель и задачи лабораторного занятия.

Дополнительные материалы и оборудование (необходимые для данного занятия).

Описание объекта исследования (модельного водоема):

- происхождение,
- размеры, объем,
- внешний вид,
- прозрачность и цветность воды,
- наличие пленок на стенках или поверхности осадков (цианобактерии, водоросли),
- присутствие сосудистых растений и животных,
- осадки: характер грунта, слоистость, оттенки каждого слоя, наличие наилка или взвешенного ила в придонном слое,
- прочие признаки.

Описание пробы воды (место отбора, объем)

Ход работы:

1. Обработка пробы воды и подготовка ее для микробиологического анализа.

2. Приготовление препарата для прямого счета бактерий на предметном стекле в двукратной повторности.

Обязательно указать площадь квадратиков, нарисованных на стекле, объем капель, пошедший на приготовление каждого из двух параллельных препаратов (v_1 и v_2).

3. Посев проб воды глубинным методом по Коху.

Обязательно указать, какие разведения были приготовлены, и объем инокулята, внесенный в каждую ч. Петри, какие среды были использованы для выделения сапротрофов и олиготрофов.

Результаты лабораторной работы: препараты на стеклах в планшете, чашки Петри с посевами в термостате, лабораторный журнал с описанием хода работы.

Лабораторное занятие 2

Тема «Количественный и качественный анализ гетеротрофного бактериопланктона»

Основные деструкторы органического вещества в экосистемах – гетеротрофные микроорганизмы, которые по набору утилизируемых субстратов являются универсалами. Среди них выделяют две группы: 1) копиотрофы, нуждающиеся в относительно высоких концентрациях органического вещества; 2) олиготрофы, выигрывающие конкуренцию при низком его содержании.

Традиционное название копиотрофов – сапрофиты произошло от греческих слов: сапрос – гнилой и фитос – растение, им обозначали организмы, для которых источник питания – гниющие остатки животного, растительного или микробного происхождения. В настоящее время более корректным в научном отношении является термин сапротрофы, но старый термин «сапрофиты» тоже нередко употребляется. В экологии водоемов эта группа бактерий считается надежным и высокочувствительным индикатором загрязнения водоемов органическими веществами бытового происхождения и другими легкоразлагаемыми продуктами.

Однако истинно водные микроорганизмы являются олиготрофами и высокие концентрации органических веществ в стандартных питательных средах (более 4000 мгС/л в составе МПА по сравнению с 1–15 мгС/л в водоемах) для них губительны.

Поэтому при их выделении в специальных исследованиях используют агаризованную природную воду, а для получения более унифицированных результатов – стандартную среду – рыбопептонный агар (РПА), разбавленный в 10 раз. В водной микробиологии МПА заменяют на РПА для учета особенностей минерального состава природных вод [11].

Многочисленные исследования показывают, что устойчивы к различным воздействиям, в том числе и к загрязнению, только сложные биоценозы, включающие в себя разнообразные виды. В то же время сильное загрязнение водоемов приводит к снижению как микробной массы, так и числа видов. Если продукция биомассы и увеличивается, то за счет ускорения роста отдельных микроорганизмов, для которых новые условия являются более благоприятными. Поэтому снижение видового разнообразия гетеротрофов служит надежным индикатором загрязнения.

Установлено, что в большинстве природных вод доминируют подвижные грамотрицательные палочки. В осадках к ним присоединяются актиномицеты, не имеющие, однако, столь заметной роли, какую они играют в почвах [13]. Наличие спорообразующих бактерий коррелирует со степенью трофности водоема. В олиготрофных водах на их долю редко приходится более 10% сапрофитов. В мезотрофных они могут составлять 20–25%. В дистрофных водоемах спорообразующие бактерии занимают доминирующее положение, занимая более 85% [6].

В относительно чистых водах преобладают кокки – до 80% общего числа сапрофитов, при загрязнении возрастает доля спороносных и других палочковидных форм – до 80%. В значительном количестве появляются вибрионы (10% и более), а удельный вес кокков резко падает (10% и менее) [6].

Наряду с универсальным в отношении органических субстратов гетеротрофным населением природные бактериоценозы содержат большое количество микроорганизмов, осуществляющих различные специфические биогеохимические процессы. Их выделяют на селективных средах и для количественного определения используют метод предельных разведений. Последний менее точен, по сравнению с чашечным, но более удобен для учета микроорганизмов, плохо растущих на традиционных

лабораторных средах. Так, метод предельных разведений используют для определения количества облигатных анаэробов, бактерий, образующих различные газы и кислоты, а также для учета азотфиксаторов, нитрификаторов, сульфатредукторов и представителей многих других, так называемых физиологических (метаболических), групп.

Сульфатвосстанавливающие бактерии (СВБ), или сульфатредукторы, – одна из тех индикаторных групп, которые определяют состояние водной экосистемы. Они участвуют в анаэробной минерализации органического вещества, являются основным источником сероводорода, поддерживают окислительно-восстановительный баланс в водоеме. В водах, обогащенных сульфатами, интенсивность сульфатредукции не только определяет скорость развития фотосинтезирующих и бесцветных серобактерий, но является катализатором круговорота веществ биотопа в целом [2]. Высокая численность СВБ свидетельствует о том, что бактериопланктон не справляется с органическим загрязнением и процесс деструкции переходит в анаэробную зону. В меньшей степени это может указывать на загрязнение водоема сульфатами.

Дополнительные материалы и оборудование:

1) **для посева донных осадков на выявление сульфатредукторов:** стерильные пипетка с отбитым носом на 10 мл, 5 пенициллиновых флаконов (пробирок) со стерильными резиновыми пробками, неповрежденная пипетка на 10 мл, жидкая среда ван Дельдена из расчета не менее 10 мл на пенициллиновый флакон, 5 пипеток на 1 мл;

2) **для подсчета числа сапротрофов и олиготрофов:** чашки Петри с посевами, маркер, прибор для подсчета колоний, микрокалькулятор;

3) **для описания основных морфотипов:** предметные стекла с луночкой, стаканчик с вазелином и глазной пипеткой, покровные стекла 24×24 мм, 3%-ный раствор КОН, метиленовый синий по Лефлеру, 0,5%-ный водный раствор нейтрального красного.

Часть 1. Посев донных осадков для определения числа сульфатредукторов методом предельных десятикратных разведений

Ход работы. Стерильной пипеткой на 10 мл с отбитым носом отобрать немного донных осадков, используя закон сообщающихся сосудов. 1 мл пробы внести в первый пенициллиновый флакон, долить в него 9 мл среды ван Дельдена [7].

Среда ван Дельдена является селективной для сульфатредукторов и имеет следующий состав (г/л):

аспарагин	– 1,0	лактат	– 5,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	– 1,0	FeSO ₄ ·7H ₂ O	– следы
K ₂ HPO ₄	– 0,5	водопроводная вода	– 1 л
pH = 7–7,5			

Свежей пипеткой содержимое первого флакона перемешать, отобрать 1 мл смеси и перенести его во второй флакон. Долить в него 9 мл среды ван Дельдена. Новой пипеткой на 1 мл содержимое перемешать и повторить процедуру, последовательно переходя к пятому флакону.

Для создания анаэробных условий все флаконы герметично закрыть резиновыми пробками.

Поскольку каждая пара студентов готовит свой ряд разведений, то в итоге получится 3–4 параллельных посева из одного модельного водоема.

Все посевы поставить на 3–4 недели в термостат при 28°C.

Часть 2. Определение числа сапротрофных и олиготрофных бактерий, коэффициента трофности

Ход работы. Разобрать чашки Петри с посевами по средам (РПА и РПА 1:10) и разведениям. Просмотреть посевы.

Подсчитать число колоний на каждой чашке. Результаты занести в протокол (форма 1), где n_1 и n_2 – число колоний, выросших на двух чашках, засеянных параллельно из одного разведения.

**Протокол учета числа колоний на чашках Петри (n_i)
с различными лабораторными средами**

<i>Разведение</i>	<i>РПА</i>	<i>РПА 1:10</i>
1:10 (10^{-1})	n_1	n_1
	n_2	n_2
1:100 (10^{-2})	n_1	n_1
	n_2	n_2
1:1000 (10^{-3})	n_1	n_1
	n_2	n_2

В водной микробиологии количество колоний обычно учитывают в тех разведениях, где их вырастает не менее 20. Если колоний слишком много и сделать пересев нельзя, то подсчет ведут следующим образом:

1) делят поверхность чашки на сектора (в зависимости от густоты колоний от 16 до 64 секторов), подсчитывают количество колоний в одном секторе и пересчитывают на всю поверхность агаровой пластины;

2) в бумажном фильтре размером с чашку вырезают квадратик площадью 1 см^2 и подсчитывают число колоний в нескольких таких квадратиках, перемещая фильтр по всей поверхности чашки. Затем подсчитывают среднее количество в одном квадратике и переводят на площадь агаровой пластины.

После заполнения протокола (форма 1) проанализировать результаты. При правильно произведенном посеве с увеличением разведения число выросших колоний должно уменьшаться не менее чем в 3 раза между соседними разведениями. Если эта закономерность имеет место, то для расчета числа гетеротрофных микроорганизмов соответствующей группы следует выбрать то разведение, из которого на чашке Петри выросло от 100 до 300 колоний.

Далее с помощью критерия χ^2 определить возможность усреднения результатов. Для этого заполнить статистическую таблицу по форме 2.

Вычисление среднего квадратичного отклонения χ^2

n_i	\bar{n}	$n_i - \bar{n}$	$(n_i - \bar{n})^2$
n_1			
n_2			
Сумма квадратичных отклонений			$\Sigma (n_i - \bar{n})^2$

Рассчитать критерий χ^2 по формуле:

$$\chi^2 = \frac{(n_i - \bar{n})^2}{\bar{n}}, \quad (2.1)$$

где \bar{n} является средним арифметическим результатов двух повторностей (см. пример в табл. 2).

Значение величин χ^2 можно найти в статистических таблицах. В случае двукратной повторности следует воспользоваться величинами, рассчитанными для числа степеней свободы (α), равного 1 ($\alpha=i-1$, где i – число повторностей). Из таблицы следует, что при 5%-ом уровне вероятности различие будет значимым при χ^2 не менее 3,841.

Таблица 2

Пример определения χ^2

n_i	\bar{n}	$n_i - \bar{n}$	$(n_i - \bar{n})^2$
201	192	9	81
183	192	-9	81
Сумма квадратичных отклонений			162

В данном примере $\chi^2 = 162/192 = 0,844$, что меньше 3,841. Следовательно, различия между повторными определениями не значимы, и результаты можно усреднять.

Если $\chi^2 \geq 3,841$, то различия между повторными определениями значимы, и усреднять результаты нельзя.

Тогда по совокупности признаков следует выбрать одну ч. Петри, число колоний которой с наименьшей ошибкой даст общий результат.

Пересчет среднего числа выросших колоний (\bar{n}) на численность бактерий соответствующей группы (N) производят, исходя из предположения, что одной колониеобразующей единицей (КОЕ) является отдельная микробная клетка. Для этого используют формулу:

$$N = \frac{\bar{n} \cdot r}{v} \text{ [КОЕ/мл]}, \quad (2.2)$$

где \bar{n} – среднее число колоний на чашках Петри, засеянных из одного разведения, r – коэффициент разведения, v – объем инокулята (мл).

Оптимальным разведением считается то, при посеве из которого вырастает около 300 колоний на одной чашке [10]. Если с увеличением разведения количество колоний закономерно уменьшается, то КОЕ действительно представлено одной клеткой, и для расчета численности можно использовать то разведение, которое дает максимальное значение N. Если эта закономерность нарушается, то нужно логическим путем установить причину (нестерильность посева, агрегированность бактериопланктона и т. п.) и взять то значение, которое дает наиболее реальную величину.

Численность сапротрофов ($N_{\text{сапр.}}$) рассчитать по числу колоний, выросших на РПА, численность олиготрофов ($N_{\text{олиг.}}$) – по числу колоний, выросших на РПА 1:10. Далее определить коэффициент трофности как

$$K_{\text{троф.}} = N_{\text{олиг.}} / N_{\text{сапр.}} \quad (2.3)$$

Сделать вывод о трофическом статусе водоема на основании численности сапротрофного бактериопланктона и по коэффициенту трофности [4].

Для группового отчета заполнить табл. 7.

Часть 3. Качественный анализ бактериопланктона

Ход работы. Отобрать чашки, где выросло достаточное количество колоний среднего размера на поверхности среды.

На основании внешних различий выделить основные морфологические типы строго аэробных колоний и подсчитать количество колоний каждого морфотипа. Описание колоний, выросших на поверхности, и их количество занести в протоколы учета качественного состава сапротрофов и олиготрофов (форма 3).

Затем из каждого морфологического типа колонии приготовить препараты для микроскопирования и определить основные признаки бактерий:

- морфологию клеток при простом окрашивании фуксином;
- наличие спор с помощью дифференциального окрашивания по Пешкову, если необходимо;
- дифференциацию по Граму без окрашивания;
- подвижность в препарате «висячая капля».

Результаты занести в протокол (форма 3).

Форма 3

Основные морфотипы сапротрофных (олиготрофных) бактерий

№ n/n	Внешний вид колонии (рис.)	Описание колонии	Микроско- пическая картина (рис.)	Свойства бактериаль- ных клеток	Число колоний на поверх- ности ч. Петри	Доля морфо- типа, в %
	Рисунок: вид сбоку, вид сверху	Форма, поверхность, консистенция, края, профиль, цвет, диаметр	Рисунок по- ля зрения с указанием в подрисуноч- ной подписи увеличения микроскопа, способа при- готовления препарата	1) отноше- ние к окраске по Граму, 2) морфоло- гия 3) подвиж- ность 4) наличие спор		

Морфологическое описание колоний

В протоколе рисуют внешний вид колонии в двух ракурсах: сверху и в профиль. Словесное описание проводят по следующей схеме:

- 1) *форма* – округлая, неправильная, ризоидная;
- 2) *поверхность* – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая с концентрическими кругами;
- 3) *консистенция* – плотная, мягкая, врастающая в агар, рассыпчатая и т. д.;
- 4) *края* – ровные, волнистые, зубчатые, бахромчатые и т. д.;
- 5) *профиль* – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т. д.;
- 6) *цвет* – бесцветный, белый, желтый, розовый, красный и т. д.;
- 7) *диаметр* – в мм.

Метод простого окрашивания бактерий

Предметное стекло (78×26 мм) обезжирить с помощью кусочка хозяйственного мыла: натереть им рабочую поверхность стекла, а затем удалить его следы салфеткой.

На обезжиренную поверхность нанести каплю стерильной дистиллированной воды. Внести в нее микробиологической петлей немного биомассы из колонии, приготовить суспензию перемешиванием и сделать мазок. При этом каплю суспензии распределить как можно более тонким слоем по поверхности стекла.

Приготовленный таким образом мазок высушить на воздухе при комнатной температуре или в термостате (28–40°C). Подогревать препарат категорически нельзя, т. к. при интенсивной потере влаги происходит быстрое свертывание белков и клетка теряет свою естественную форму.

Высушенный мазок зафиксировать в пламени горелки. Для этого стекло взять пинцетом и троекратно провести через верхнюю часть пламени 2–3 раза (около 2 с). Длительная фиксация может изменить структуру клеток, а недостаточно зафиксированный мазок смывается со стекла при последующей обработке. Как известно, убитые микробные клетки лучше

прикрепляются к стеклу и более интенсивно воспринимают окраску. После фиксации мазку дать остыть.

Фиксированный препарат полностью покрыть несколькими каплями красящего раствора. Красными красителями красят 1–2 мин, а синими – 3–5 мин.

Затем краску смыть дистиллированной водой, мазок просушить между кусочками фильтровальной бумаги или на воздухе, микроскопировать при максимальном увеличении с помощью масляной иммерсии.

Окраска спор по Пешкову

Мазок, приготовленный по вышеописанной методике и фиксированный в пламени горелки, окрасить при нагревании метиленовым синим по Лефлеру. Препарат нагреть в средней части пламени, осторожно передвигая стекло. Довести краситель до кипения (появления паров). Красить при кипении красителя 15–20 с, не допуская высыхания красителя (по мере испарения добавляя новые порции, дождавшись остывания стекла).

Остывший препарат промыть водой, докрасить 0,5%-ым раствором нейтрального красного в течение 30 с, а затем снова промыть водой и высушить между полосками фильтровальной бумаги.

При правильно выполненном окрашивании споры приобретают голубовато-синий цвет, а бактериальные клетки становятся розовыми.

Дифференциация бактерий по Граму без окрашивания

На предметное стекло нанести каплю 3%-го водного раствора КОН. Микробиологической петлей внести в нее немного биомассы из колонии и тщательно размешать круговыми движениями. Через 5–8 с петлю можно резко поднять. Суспензия грамотрицательных бактерий становится вязкой и тянется за петлей, образуя мукоидные тяжи. Грамположительные бактерии равномерно распределяются в щелочи (как в воде). Реакция считается отрицательной, если образования слизистых тяжей не наблюдается в течение 60 с.

Увеличение вязкости вызвано лизисом клеточных стенок грамотрицательных бактерий в щелочном растворе и освобождением внутриклеточных полимеров [8].

Метод с КОН является более быстрым, простым и дешевым, по сравнению с традиционной методикой дифференциального окрашивания, и может использоваться в полевых условиях.

Приготовление препарата «висячая капля»

Предварительно края луночки предметного стекла аккуратно смазать тонким слоем вазелина.

Взять большое (24×24 мм) покровное стекло, обезжирить, нанести на его поверхность каплю стерильной воды. Микробиологической петлей поместить в каплю небольшое количество культуры.

Покровное стекло накрыть предметным так, чтобы капля оказалась в центре под сводом луночки, и большими пальцами обеих рук герметично притереть покровное стекло к предметному до появления радужных колец Ньютона.

Затем аккуратно перевернуть препарат на 180°. Тогда в полученной камере капелька с бактериями будет свисать с покровного стекла, не касаясь дна луночки. Препарат осторожно рассматривают при максимальном увеличении микроскопа с помощью масляной иммерсии.

В заключение, обобщая полученные данные, распределить все морфологические типы бактерий (сапротрофных и олиготрофных отдельно) на 4 основные группы:

- 1) кокки,
- 2) грамотрицательные неспорообразующие палочки,
- 3) грамположительные спорообразующие палочки,
- 4) грамположительные палочки, не образующие спор, с указанием доли каждого морфотипа бактерий в составе соответствующей группы аэробного бактериопланктона.

Отметить наличие пигментных форм.

Сделать вывод о состоянии воды в водоеме по результатам качественного анализа бактериопланктона.

Для группового отчета составить табл. 8.

Часть 4. Образец оформления лабораторного занятия

Дата

Лабораторное занятие 2

Цель и задачи лабораторного занятия.

Материалы и оборудование.

Ход работы.

1. Отбор проб и посев донных осадков для определения численности сульфатредуцирующих бактерий методом наиболее вероятного числа.

Обязательно отметить, сколько параллельных посевов было сделано из каждого разведения студентами, обследующими один модельный водоем.

2. Подсчет колоний на чашках Петри с РПА (для сапротрофов) и РПА 1:10 (для олиготрофов).

Результаты занести в протокол 1 (форма 1).

3. Описание основных морфотипов колоний сапротрофных (протокол 2) и олиготрофных (протокол 3) бактерий (форма 3).

4. Расчет численности сапротрофов по протоколу 1.

Указать то разведение, посеvy из которого будут взяты для расчета. Определить возможность усреднения результатов по критерию χ^2 . Составить таблицу по форме 2. Указать число колоний на ч. Петри, взятое для расчета $N_{\text{сапр}}$, вычислить искомый показатель.

5. Расчет численности олиготрофных бактерий (протокол 1).

Повторить вышеописанную процедуру с результатами учета колоний, выросших на РПА1:10.

6. Расчет коэффициента трофности.

Выводы (о качестве воды в исследуемой пробе по каждому из определенных показателей).

Результаты УИРС: обобщенная таблица для группового отчета (табл. 8).

Лабораторное занятие 3

Тема «Количественные характеристики бактериопланктона»

Общее количество бактерий, учитываемое прямым счетом, составляет ту основную массу микроорганизмов, которая определяет процессы деструкции органического вещества в водоемах, как в водной массе, так и в донных отложениях. Быстро реагируя на изменения внешних условий, количество бактерий с учетом интенсивности размножения отражает напряженность процессов деструкции органического вещества. Содержание бактерий хорошо коррелирует со степенью трофности водоема, причем зависит не от общего количества растворенного органического вещества (РОВ), а от его усвояемой биотой части (табл. 3).

В донных отложениях органическое вещество, осевшее из водной толщи, также в основном разрушается микроорганизмами. Обычно общее количество бактерий в грунтах на три порядка выше, чем в водной толще, и положительно коррелирует со степенью заиленности грунта, а также с наличием сбросов сточных вод.

Таблица 3

Общая численность бактерий в различных природных озерах и водохранилищах [6]

<i>Трофность водоема</i>	<i>Общее число бактерий ($\times 10^3$ кл/мл)</i>
Олиготрофные озера	50–340
Мезотрофные озера	450–1 400
Эвтрофные озера	2200–12 300
Эвтрофные водохранилища	1000–57 900
Дистрофные озера	430–2 300

По последним данным [5], количество бактериопланктона, несмотря на значительные вариации физических и химических характеристик водоемов, является довольно консервативным показателем и колеблется в пределах 10^5 – 10^7 кл/мл. Диаметр клеток большей части планктонных бактерий составляет 0,2–0,6 мкм,

поэтому они входят в размерную фракцию пикопланктона. Однако есть водные бактерии, которые относятся к фемтопланктону, т. е. их размеры $<0,2$ мкм, и нанопланктону (>2 мкм).

В водной микробиологии микроскопический метод учета бактерий по С. Н. Виноградскому на стеклах нашел широкое применение в 1920-х гг. Однако после того как для концентрирования планктонных бактерий стали применять фильтрование через ядерные мембранные фильтры с диаметром пор $0,23$ мкм, счет микроорганизмов стали осуществлять непосредственно на фильтрах после их просветления с помощью иммерсии (Разумов, 1932). Оба варианта учета не лишены недостатков. На стеклах невозможно сконцентрировать большие объемы воды. При фильтровании утрачиваются ультрамикроскопические формы бактерий [1]. При простом окрашивании на фильтрах не всегда удастся отличить микроорганизмы от иных органических частиц. С 1970-х гг. началось применение прямого учета водных бактерий с помощью эпифлюоресцентной микроскопии и флюорохромов: АО, ДАФИ и др., которые специфически связываются с нуклеиновыми кислотами бактериальных клеток. В конце 1980-х гг. для определения численности и размеров бактериопланктона стали использовать проточную цитометрию.

Дополнительные материалы и оборудование: препараты для прямого счета на стеклах; сменные окуляры со вставленной в них сеточкой Гаженко; объект-микрометр; счетчик лейкоцитов; калькулятор, таблицы Брадиса или логарифмическая линейка для вычисления логарифмов.

Часть 1. Определение общей численности бактерий планктона

Ход работы. С помощью сеточки Гаженко, вставленной в окуляр, подсчитать число бактериальных клеток в каждом из двух препаратов, сделанных на одном предметном стекле. Результаты занести в протокол по форме 4.

Микроскопирование проводят при максимальном увеличении, используя масляную иммерсию и синий светофильтр для более контрастной видимости клеток. Для прямого счета микробных

клеток вставляют в окуляр микроскопа сеточку Гаженко, 9 маленьких квадратиков которой обычно составляют поле зрения.

На правильно приготовленных препаратах микроорганизмы равномерно распределены по поверхности и в поле зрения находится около 50 микробных клеток, поэтому обычно просматривают 15–20 полей зрения с тем, чтобы сумма подсчитанных микроорганизмов составляла не менее 1 000. Если микробных клеток слишком много или слишком мало, изменяют объем анализируемого образца воды.

При невозможности переделать препараты объем анализируемых образцов исходной воды следует варьировать сразу при первоначальном приготовлении нескольких препаратов из одной пробы воды.

При неравномерном распределении микроорганизмов пустые поля зрения ($n_i=0$) также вносят в протокол (форма 4), отмечая нулем отсутствие микробных клеток.

Форма 4

Результаты прямого счета бактерий

№ n/n поля зрения	Кол-во микробных клеток (n_i)	
	Квадрат 1 ($v_1 = \dots$)	Квадрат 2 ($v_2 = \dots$)
1	n_1	n_1
2	n_2	n_2
...		
z	n_z	n_z
Итого:	$\sum n_i$	$\sum n_i$

Общую численность бактерий ($N_{\text{общ.}}$) для каждой повторности (N_i) рассчитывают по формуле:

$$N_{\text{общ.}} = \frac{S \cdot \sum n_i}{z \cdot s \cdot v} \text{ [кл/мл]}, \quad (3.1)$$

где S – общая площадь окрашенного на фильтре или стекле препарата (мм^2), $\sum n_i$ – сумма подсчитанных под микроскопом микробных клеток, z – количество просмотренных полей зрения,

s – площадь одного поля зрения (мм^2), v – объем образца воды, затраченной на приготовление окрашенного препарата (мл).

Площадь одного квадратика сеточки Гаженко оценивают, определяя размер его стороны с помощью объект-микрометра, который помещают вместо препарата на предметный столик, имея в виду, что минимальное деление его линейки составляет 0,005 или 0,01 мм (уточняется по маркировке объект-микрометра).

При усреднении значений общей численности бактерий, полученных в разных повторностях, определяют значимость различий по χ^2 (форма 2) и считают, что $N_{\text{общ.}}$ есть случайная величина, подчиняющаяся, как эмпирически установлено, нормальному распределению Пуассона. В этом случае среднее квадратичное отклонение (σ) равно \sqrt{N} , поэтому доверительный интервал для величины $N_{\text{общ.}}$ находится по формуле $N \pm \alpha \sqrt{N}$, где α – коэффициент, зависящий от выбранного значения доверительной вероятности ($\alpha = 2$ при вероятности, равной 0,95 и трехкратной повторности).

Часть 2. Определение биомассы микроорганизмов

Биомассу микроорганизмов (B) находят на основании общей численности бактерий ($N_{\text{общ.}}$) по формуле:

$$B = N \cdot v \cdot \rho \cdot f \text{ [г /мл]}, \quad (3.2)$$

где $N_{\text{общ.}}$ – численность бактериопланктона (кл/мл), v – вычисленный из измерений объем одной клетки (в среднем для водных бактерий равный $0,5 \text{ мкм}^3$), ρ – плотность сырой бактериальной массы ($\approx 1 \text{ г/см}^3$) и f – фактор усыхания клеток ($\approx 1,6$).

Для вычисления необходимо единицы объема унифицировать и выразить в см^3 (мл). Чтобы избавиться от отрицательных степеней, г/мл переводят в мкг/мл или мг/л .

Для определения сухой массы (B_c) в весовых единицах содержания углерода исходят из того, что сухое вещество в бактериальных клетках составляет 15% (85% – вода). Содержание угле-

рода в сухом веществе бактерий обобщенно приравнивают к 50%. Тогда расчет принимает вид:

$$B_c = B \cdot 0,15 \cdot 0,5 \text{ [мкг С/мл, мг С/л]}. \quad (3.3)$$

На практике если на препарате имеется несколько типов бактериальных клеток, различных по форме и размерам, то подсчет следует вести отдельно для каждого морфотипа [7].

Часть 3. Определение коэффициента сапробности

Коэффициент сапробности является стандартной характеристикой санитарного состояния водоема (табл. 5). Чем чище вода, тем больше разница между числом сапротрофов, установленным чашечным посевом, и общей численностью бактерий в планктоне, определенной методом прямого счета. В практически чистых водах сапротрофные бактерии составляют порой 10^{-3} – 10^{-5} % от общей численности бактериопланктона.

Рассчитать коэффициент сапробности ($K_{\text{сапр.}}$) как отношение числа сапротрофов ($N_{\text{сапр.}}$) к общему числу бактерий ($N_{\text{общ.}}$), выраженное в процентах ($\times 100$):

$$K_{\text{сапр.}} = (N_{\text{сапр.}} / N_{\text{общ.}}) \times 100 \text{ [%]}. \quad (3.4)$$

Сравнить полученный результат с данными табл. 4. Сделать вывод о качестве воды в исследованной точке водоема.

Результаты занести в табл. 7 группового отчета.

Таблица 4

Характеристика воды по коэффициенту сапробности

$K_{\text{сапр.}}, \%$	Категория воды
не более 0,03	Особо чистая
0,03	Чистая
0,30	Грязная
3,00	Особо грязная

Часть 4. Образец оформления лабораторного занятия

Дата

Лабораторное занятие 3

Цель и задачи лабораторного занятия.

Материалы и оборудование.

Ход работы.

1. Подсчет клеток на препаратах для прямого счета бактерий (протокол 4 по форме 4).

2. Определение площади поля зрения.

Обязательно указать, сколько самых маленьких делений линейки объект-микрометра (m) укладывается в полное количество сторон маленьких квадратиков сеточки Гаженко (k), и привести расчет площади поля зрения в мм^2 .

3. Расчет N_1 и N_2 по формуле 3.1.

4. Определение возможности усреднения значений N_1 и N_2 по критерию χ^2 для млн кл/мл. Составить таблицу по форме 2. Выбрать величину для расчета $N_{\text{общ}}$.

5. Рассчитать $N_{\text{общ}}$ как статистическую величину с доверительным интервалом по формуле.

6. Пересчет $N_{\text{общ}}$ в значение сырой биомассы (В).

7. Пересчет В в единицы сухой биомассы (V_c).

8. Расчет коэффициента сапробности ($K_{\text{сапр.}}$) по формуле 3.4..

Выводы (о качестве воды в исследуемой пробе по каждому определенному показателю).

Результаты УИРС: обобщенная таблица для группового отчета (табл. 7).

Лабораторные занятия 4–5

Тема «**Определение интенсивности микробиологических процессов**»

Согласно современной парадигме водной микробиологии гетеротрофные бактерии являются важным компонентом планктонных пищевых сетей. До появления концепции «микробной петли» (Померой, 1974) роль микроорганизмов игнорировалась и низшим уровнем в планктонных пищевых сетях считался фитопланктон, создающий свою массу за счет ассимиляции CO_2 и используемый в пищу зоопланктоном, который в свою очередь выедается молодью рыб. С появлением новых методов исследования, таких как учет бактерий методом эпифлюоресцентной микроскопии и определение бактериальной продукции по включению радиоактивного тимидина в ДНК, были получены доказательства того, что гетеротрофные бактерии и простейшие играют ключевые роли в трофических взаимоотношениях планктонных организмов и циклах биогенных элементов в морских и пресноводных экосистемах. Согласно модели функционирования микробных планктонных пищевых сетей (Эзем и др., 1983), названной «микробной петлей», бактерии усваивают растворимые органические вещества, выделяемые фитопланктоном, и тем самым переводят их во взвешенную форму. Главные потребители бактерий – гетеротрофные жгутиконосцы и инфузории, которые, в свою очередь, выедаются метазойным планктоном. Таким образом, простейшие осуществляют взаимодействие микробной и пастбищной пищевых сетей.

Как уже отмечалось выше, биомасса гетеротрофных бактерий составляет значительную часть суммарной биомассы планктона. Хотя биомасса бактерий в озерах, особенно в эвтрофных, обычно ниже таковой фитопланктона, но скорость их роста и соответственно время удвоения их биомассы примерно на порядок выше. Поэтому даже в продуктивных экосистемах значение этих двух групп гидробионтов в круговороте углерода вполне сопоставимо.

В эвтрофных пресных и морских водоемах масса гетеротрофных бактерий составляет обычно от 3 до 20% суммарной микробной биомассы. В мезо- и олиготрофных экосистемах

бактерии составляют большую часть взвешенного органического вещества, и их биомасса может превышать биомассу фитопланктона.

Традиционно основной функцией гетеротрофного бактериопланктона считается минерализация органических веществ до CO_2 , в процессе которой происходит также выделение неорганических соединений азота и фосфора, необходимых для первичного продуцирования фитопланктоном. Обычно более 90% органических веществ, образующихся во внутриводоемных процессах и поступающих извне, метаболизируются гетеротрофными бактериями, но не доходят до многоклеточных консументов, находящихся на высших уровнях планктонных трофических сетей. Органические субстраты, потребляемые бактериями, расходуются на их рост и дыхание.

Учитывая, какие важные функции выполняют гетеротрофные бактерии, можно утверждать, что факторы, которые регулируют их обилие, структуру сообщества и скорость роста, – это в значительной мере факторы, влияющие на функционирование водной экосистемы в целом. Выделяют два основных регулирующих механизма: либо бактериотрофными организмами (контроль «сверху»), либо ресурсами, т. е. доступностью органических субстратов и соединений биогенных элементов (контроль «снизу»). Высказано предположение, что продукция бактериопланктона регулируется в основном запасами ресурсов, а его биомасса – консументами [5].

Определение реальной бактериальной продукции P (мг/л/ч) тесно связано с оценкой таких обобщенных кинетических параметров, как удельная скорость роста μ (ч^{-1}), время генерации – g (ч) и скорость выедания зоопланктоном бактерий – G (мг/л/ч или кл/л/ч). Способы их определения *in situ* впервые были разработаны в водной микробиологии [7].

Общая задача. ВТК студентов предлагается определить эти параметры методом изолированных проб М. В. Иванова (1955) в суммарной пробе воды своего водоема. Каждая пара студентов ставит один из вариантов опыта и определяет общую численность бактерий до и после экспозиции, как это описано в лабораторных занятиях 1 и 3.

Время экспозиции должно соответствовать времени генерации бактерий. Эмпирически установлено, что в мезотрофных водоемах в летнее время $g = 1-6$ ч [7]. Чтобы удлинить экспозицию, если возможно, оба занятия удобно проводить в один день.

Определив показатели общей численности бактерий в разных вариантах опыта, студенты ВТК сводят их в протокол по форме 5, на основании которого каждая пара самостоятельно делает полный расчет μ , μ' , g , R и G и дает свое заключение о регулировании продукции и биомассы в модельном водоеме.

Форма 5

Общая численность бактерий в изолированных пробах (кл/мл)

<i>Вариант опыта</i>	<i>До экспозиции</i>	<i>После экспозиции</i>
Проба без зоопланктона	N_0	N_t
Проба с зоопланктоном	n_0	n_t
Проба без зоопланктона с внесением глюкозы	N'_0	N'_t

Вариант опыта 1
Определение удельной скорости роста
и времени генерации бактерий

С истинной скоростью бактерии растут при отсутствии элиминирующих их факторов, в частности зоопланктона, для удаления которого пробу воды (100–200 мл) фильтруют через прокипяченный, сложенный вдвое мельничный газ № 76 или через предварительный мембранный фильтр № 6 (\varnothing пор 3,5 мкм).

В одной половине фильтрованного образца сразу определяют общую численность бактерий N_0 методом прямого счета (лабораторные занятия 1 и 3). Вторую часть образца инкубируют в течение времени t в месте отбора проб или в термостате при температуре *in situ*. После инкубации и в этой части образца также определяют общую численность бактерий N_t .

На основании того, что размножение микроорганизмов и синтез ими биомассы осуществляются по первому порядку реакции, удельную скорость роста бактерий рассчитывают по формуле:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t} = \frac{\ln B_t - \ln B_0}{t} \text{ (ч}^{-1}, \text{сут}^{-1}), \quad (4.1)$$

где В – биомасса микроорганизмов.

Время генерации при бинарном делении бактерий связано с удельной скоростью роста следующим соотношением:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \text{ (ч, сут)}. \quad (4.2)$$

Хотя эти формулы являются общепринятыми, следует четко понимать их приближенный характер, поскольку они применимы только для экспоненциального роста.

Вариант опыта 2

Определение продукции и скорости выедания бактерий

Продукцию (Р) и скорость выедания бактерий (G) определяют на основании показателей общей численности, определенных в нефильтрованной пробе с зоопланктоном, до (n_0) и после (n_t) инкубации и пересчитанных в единицы биомассы (b_0 и b_t соответственно) по формулам (3.2) и (3.3).

Реальное изменение биомассы в нефильтрованной пробе определяется уравнением:

$$\frac{db}{dt} = P - G \text{ или } \frac{b_t - b_0}{t} = P - G,$$

где Р – продукция, или скорость синтеза бактериальной массы, определяемая по формуле:

$$P = \mu \cdot b_0. \quad (4.3)$$

Тогда скорость выедания бактерий описывается равенством:

$$G = \mu \cdot b_0 - \frac{b_t - b_0}{t} \text{ (мг/л/сут)}. \quad (4.4)$$

Если вместо значений биомассы использовать показатели общей численности, то скорость выедания можно определить в кл/л/сут.

Часто для P и G используют более сложные выражения, но их применение неоправданно. С одной стороны, они базируются на моделях, адекватность которых не доказывается. С другой стороны, расчет по ним, при условии, что $\frac{b_t}{b_0} \approx 2$, которое обычно реализуется на практике путем подбора времени экспозиции, дает результаты, отличающиеся от (4.3) и (4.4) не более чем на 30%.

Вариант опыта 3 ***Определение потенциальной скорости*** ***роста бактерий***

С точки зрения современной теории микробного роста вышеописанный метод имеет один недочет [9]. Дело в том, что в случае эвтрофных водоемов устранение зоопланктона приводит к прекращению притока РОВ, которые включают и прижизненные выделения зоопланктона. Чтобы преодолеть этот недостаток, следует поставить третий вариант опыта – фильтрованную (без зоопланктона) пробу, но с добавлением легкоокисляемого субстрата – глюкозы (25–100 мг/л). Тогда, определяя численность бактерий до (N'_0) и после (N'_t) экспозиции, можно вычислить по формуле (4.1) потенциальную удельную скорость роста бактерий (μ'). Сравнение величины μ' с кажущейся μ позволит оценить, имеет ли место субстратное ингибирование и какой фактор является решающим в регуляции биомассы и продукции гетеротрофного бактериопланктона.

Часть 4. Образец оформления задачи

Дата

Лабораторные занятия 4–5

Цель и задачи УИРС (лабораторного занятия).

Материалы и оборудование.

Описание варианта опыта

Ход работы.

9. Подсчет клеток на препаратах для прямого счета бактерий (протокол 4 по форме 4) до экспозиции.

10. Определение площади поля зрения.

Обязательно указать, сколько самых маленьких делений линейки объект-микрометра (m) укладывается в полное количество сторон маленьких квадратиков сеточки Гаженко (k), и привести расчет площади поля зрения в мм².

11. Расчет N_1 и N_2 по формуле 3.1.

12. Определение возможности усреднения значений N_1 и N_2 по критерию χ^2 для млн кл/мл. Составить таблицу по форме 2. Выбрать величину для расчета N_0 .

13. Рассчитать N_0 .

14. Повторить пункты 1–5 для определения N_t .

15. Составить обобщенную таблицу по форме 5.

16. Рассчитать показатели активности бактериопланктона по следующему алгоритму использования приведенных в таблице данных.

<i>Вариант опыта</i>	<i>Определенные показатели</i>	<i>Расчетные параметры</i>
Проба без зоопланктона	N_0, N_t	μ, g
Проба с зоопланктоном	n_0, n_t	b_0, b_t, P, G
Проба без зоопланктона с внесением глюкозы	N'_0, N'_t	μ', g'

Выводы (о факторах, регулирующих продукцию и биомассу бактериопланктона в водоеме).

Результаты УИРС: обобщенная таблица для группового отчета (табл. 9).

Лабораторное занятие 6

Тема «Обобщенная микробиологическая характеристика модельного водоема»

Часть 1. Определение численности сульфатредуцирующих микроорганизмов

Численность сульфатредуцирующих бактерий, как и микроорганизмов других метаболических групп в пробах воды и/или осадков, определяют на жидких элективных питательных средах методом десятикратных разведений, а результаты оценивают методом наиболее вероятного числа по таблице Мак-Креди [10].

Для работы берут последовательный ряд десятикратных разведений из испытуемого материала с таким расчетом, чтобы последние разведения были бы выше того, при котором один микроб будет содержаться в 1 мл.

Например, в исследуемой нами жидкости содержится до $1 \cdot 10^6$ кл/мл. Делаем 8 последовательных десятикратных разведений. Предполагая, что микробы довольно равномерно распределены в разведениях, считаем, что в пятом разведении будет находиться приблизительно 10 кл/мл; в шестом разведении 1 кл/мл; в седьмом – 1 клетка в 10 мл и в восьмом – 1 клетка в 100 мл.

Из четырех последних разведений (четвертое берется для большей надежности) делают посеvy по 1 мл в пробирки с элективной для данных микробов жидкой питательной средой, отмечают, из какого именно разведения был произведен посев в ту или иную пробирку. После посева пробирки ставят в термостат при соответствующей температуре. По прошествии времени инкубации (от 10 до 30 суток в зависимости от вида микроорганизма) отмечают, при каких разведениях и в скольких пробирках наблюдается рост.

Если в нашем примере имеются признаки роста микроорганизмов в пятом и шестом разведениях, а начиная с седьмого разведения их нет, то количество микробов можно предполагать в пределах от 10^6 до 10^7 . Эти пределы можно сузить, заражая

каждым разведением несколько пробирок (от 2 до 5). Тогда, если из двух зараженных из седьмого разведения пробирок ни одна не дала роста, следовало бы установить вероятные числа микробов между одним и пятью миллионами. Если бы рост наблюдался только в одной пробирке из двух, то количество микробов находится в пределах между пятью и десятью миллионами. В целях упрощения вместо пределов можно брать среднюю величину между этими пределами. Так, в нашем примере, если количество микробов колеблется в пределах между одним и десятью миллионами, то за вероятное число можно принять их среднее арифметическое $\frac{1+10}{2} = 5,5$ миллионов.

Метод предельных разведений требует особенной чистоты и аккуратности в выполнении всех, по существу весьма простых, операций. Так, нужно особенно оберегать от загрязнения пипетки и другую посуду, поскольку каждая попавшая извне клетка может сразу в 10 раз повысить найденный предел. Для каждого разведения следует брать другую пипетку и следить за тем, чтобы до употребления она ни к чему не прикасалась.

Приведенные выше расчеты в значительной степени усложняются в тех, далеко не редких случаях, когда вследствие не вполне равномерного распределения клеток в исследуемом материале, наблюдаются «перебои» в получаемых результатах. Для упрощения и уточнения работы с методом предельных разведений в 1929 г. Мак-Креди на основании методов вариационной статистики вывел общую формулу зависимости от всех возможных случаев и составил таблицу, облегчающую пользование этой формулой [10]. Поскольку в нашем практикуме наиболее часто используют трехкратные (иногда четырехкратные) повторности, то ниже приводится таблица Мак-Креди для этих случаев (табл. 6).

Ход работы. Достать посеvy из термостата и разобрать по разведениям. Определить число посевов каждого разведения, в которых обнаруживаются признаки развития сульфатредуцирующих микроорганизмов: запах сероводорода или черный осадок. Результаты заносят в протокол по форме 6.

Результаты метода предельных разведений

Разведение	0	1:10	1:100	1:1000	1:10 000	1:100 000
Число зараженных пробирок	3	3	3	3	3	3
Число пробирок с положительной реакцией	3	3	1	0	1	0
Числовая характеристика – 311; вероятное число – 7,5						
Количество микробов в 1 мл – 75						

На основании полученных результатов составляют так называемую числовую характеристику. Она состоит из трех цифр и складывается следующим образом: на первом месте (слева) отмечают число пробирок с положительной реакцией последнего разведения, где во всех пробирках наблюдали микробный рост; следующие две цифры обозначают число пробирок с положительной реакцией из двух последующих разведений. Получается трехзначное число. Это и есть числовая характеристика. В том случае, если в посевах следующего за последним значимым разведением также обнаруживают пробирки с растущими культурами, их число прибавляют к последней цифре числовой характеристики (см. пример в форме 6). Используя таблицу Мак-Креди (табл. 6), находят наиболее вероятное число, которое соответствует данному значению числовой характеристики. Количество микроорганизмов в 1 мл исходного образца будет равно этому числу, умноженному на то разведение, которое было взято для получения первой цифры числовой характеристики [10].

Таблица 6

Наиболее вероятное число (НВЧ) микроорганизмов при заражении трех-четырёх параллельных пробирок

Число- вая ха- ракте- ристика	НВЧ при засеве параллельных пробирок в числе		Число- вая ха- ракте- ристика	НВЧ при засеве параллельных пробирок в числе		Число- вая ха- ракте- ристика	НВЧ при засеве параллельных пробирок в числе		Число- вая ха- ракте- ристика	НВЧ при засеве параллельных пробирок в числе	
	3	4		3	4		3	4		3	4
000	0,0	0,0	120	1,1	0,8	232	4,0	—	401	—	3,5
001	0,3	0,2	121	1,5	1,1	240	—	2,0	402	—	5,0
002	—	0,5	122	—	1,3	241	—	3,0	403	—	7,0
003	—	0,7	123	—	1,6	300	2,5	1,1	410	—	3,5
010	0,3	0,2	130	1,6	1,1	301	4,0	1,6	411	—	5,5
011	0,6	0,5	131	—	1,4	302	6,5	2,0	412	—	8,0
012	—	0,7	132	—	1,6	303	—	2,5	413	—	11,0
013	—	0,9	140	—	1,4	310	4,5	1,6	414	—	14,0
020	0,6	0,5	141	—	1,7	311	7,5	2,0	420	—	6,0
021	—	0,7	200	0,9	0,6	312	11,5	3,0	421	—	9,5
022	—	0,9	201	1,4	0,9	313	16,5	3,5	422	—	13,0
030	—	0,7	202	2,0	1,2	320	9,5	2,0	423	—	17,0
031	—	0,9	203	—	1,6	321	15,0	3,0	424	—	20,0
040	—	0,9	210	1,5	0,9	322	20,0	3,5	430	—	11,5
041	—	1,2	211	2,0	1,3	323	30,0	—	431	—	16,5
100	0,4	0,3	212	3,0	1,6	330	25,0	3,0	432	—	20,0
101	0,7	0,5	213	—	2,0	331	45,0	3,5	433	—	30,0
102	1,1	0,8	220	2,0	1,3	332	110,0	4,0	434	—	35,0
103	—	1,0	221	3,0	1,6	333	140,0	5,0	440	—	25,0
110	0,7	0,5	222	3,5	2,0	340	—	3,5	441	—	40,0
111	1,1	0,8	223	4,0	—	341	—	4,5	442	—	70,0
112	—	1,1	230	3,0	1,7	350	—	—	443	—	140,0
113	—	1,3	231	3,5	2,0	400	—	2,5	444	—	160,0

Часть 2. Составление и защита группового отчета по теме «Микробиологическая характеристика модельного водоема»

Комплекс микробиологических показателей, полученных всеми студентами одного ВТК, позволяет составить групповой научный отчет о состоянии исследованного водоема.

Отчет должен быть отдельно написан, как правило, во вне-аудиторное время в виде краткого научно-исследовательского отчета и оформлен в соответствии с ГОСТом. Он должен включать титульный лист, содержание, введение, краткий аналитический обзор литературы, экспериментальную часть, выводы или заключение и список использованной литературы.

В аналитическом обзоре литературы должны быть сведения по тем методическим и теоретическим проблемам, с которыми студенты встретились в процессе выполнения работы. Эти сведения могут быть найдены в учебной и научной литературе, включая те статьи, анализ которых служит содержанием докладов, а также в интернет-источниках.

Экспериментальная часть должна состоять из методического раздела, а также результатов и их обсуждения. В разделе «Объекты и методы» следует уделить внимание особенностям объекта и методов, которыми они отличались на практике. Результаты должны быть представлены в виде трех обязательных таблиц (табл. 7–9) и графического материала, в выборе которого студенты могут чувствовать себя свободно. Детальное описание представленных результатов и их обсуждение должны логично приводить к тем заключениям, которые будут сделаны ВТК в итоге.

Для защиты группового отчета студенты готовят презентацию для сопровождения основного доклада. Читать доклад может один студент, но на вопросы должны отвечать все члены ВТК.

Таблица 7

Количественная характеристика бактериопланктона

№ n/n	Показатель	Горизонт		
		Верхний	Средний	Нижний
1.	Общая численность бактерий			
2.	Биомасса сырая			
3.	Биомасса сухая			
4.	Число сапротрофов			
5.	Число олиготрофов			
6.	Коэффициент трофности			
7.	Коэффициент сапробности			

Таблица 8

Качественный анализ аэробного бактериопланктона

№ n/n	Горизонт	Доминантные морфотипы	
		Описание	Доля, %
Сапротрофы			
1.	Верхний	Кокки Грамотрицательные палочки Грамположительные неспорообразующие палочки Грамположительные споровые палочки	
2.	Средний		
3.	Нижний		
Олиготрофы			
1.	Верхний		
2.	Средний		
3.	Нижний		

Таблица 9

Параметры продукционно-трофического состояния водоема

№ n/n	Параметр	Значение
1.	Удельная скорость роста бактериопланктона, истинная	
2.	Удельная скорость роста бактериопланктона, потенциальная	
3.	Продукция	
4.	Скорость выедания	
5.	Число сульфатредуцирующих бактерий	

Список использованных источников

1. Горбенко А. Ю. Вклад фильтрующихся форм в биомассу и продукцию бактериопланктона // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1991. № 6. С. 906–913.
2. Горленко В. М., Дубинина Г. А., Кузнецов С. И. Экология водных микроорганизмов. М.: Наука, 1977. 289 с.
3. Дзюбан А. Н., Горбенко А. Ю. Оптимизация метода прямого счета бактерий в донных отложениях водоемов // Микробиология. 1989. Т. 58, вып. 5. С. 871–875.
4. Кондакова Г. В. Санитарная микробиология: текст лекций. Ярославль: ЯрГУ, 2005. 84 с.
5. Копылов А. И. Бактериопланктон водохранилищ Верхней и Средней Волги. М.: Изд-во СГУ, 2008. 377 с.
6. Кузнецов С. И. Микрофлора озер и ее геохимическая деятельность. Л.: Наука, 1970. 440 с.
7. Кузнецов С. И., Дубинина Г. А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 288 с.
8. Лысак Л. В., Добровольская Т. Г., Скворцова И. Н. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. М.: МАКС Пресс, 2003. 120 с.
9. Паников Н. С. Кинетика роста микроорганизмов. М.: Наука, 1992. 311 с.
10. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.; под ред. А. И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.
11. Романенко В. И., Кузнецов С. И. Экология микроорганизмов пресных водоемов: лабораторное руководство. – Л.: Наука, 1974. 194 с.
12. Шеховцова Н. В. Экология водных микроорганизмов: учебное пособие. Ярославль: ЯрГУ, 2008. 132 с.
13. Rheinheimer G. Aquatic Microbiology. 4th ed. New York: John Wiley&Sons, 1994. 363 p.

Методические материалы для самостоятельной работы студентов

Примерный перечень контрольных вопросов

1. Предмет и задачи водной микробиологии.
2. Начальный этап развития водной микробиологии, его предпосылки и итоги.
3. Развитие водной микробиологии в 1925–1940 гг.
4. Развитие микробиологических исследований водоемов после Второй мировой войны.
5. Прикладное значение водной микробиологии.
6. Морфофизиологическое направление водной микробиологии: предмет, методы и задачи современного этапа.
7. Характеристика продукционно-трофологического направления водной микробиологии.
8. Предмет и задачи биогеохимического направления водной микробиологии.
9. Таксономия водных бактерий.
10. Способы существования микроорганизмов в водной среде.
11. Сущность олиготрофии водных бактерий.
12. Характеристика бактерий нейстона.
13. Характеристика аэробного бактериопланктона.
14. Микробоценоз жидкого дна.
15. Характеристика анаэробного бактериопланктона.
16. Характеристика бактериоценоза иловых отложений.
17. Аллохтонные и автохтонные микроорганизмы водоемов.
18. Основные функциональные группы автохтонных микроорганизмов в водоеме: специалисты и универсалы, «микрофлора рассеивания», микроорганизмы генофонда.
19. Общая схема круговорота углерода в водоеме и участие в нем бактерий.
20. Метилотрофные бактерии: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.
21. Метанооксиляющие бактерии: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

22. Углеродородокисляющие бактерии: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

23. Целлюлозоразрушающие бактерии: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

24. Ацетогенные бактерии: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

25. Маслянокислые бактерии: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

26. Метанобразующие бактерии: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

27. Бактерии, определяющие санитарную загрязненность водоемов: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

28. Круговорот азота в водоемах и участие в нем бактерий.

29. Азотфиксаторы: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

30. Аммонификаторы: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

31. Хемолитотрофные нитрификаторы: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

32. Гетеротрофные нитрификаторы: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

33. Денитрификаторы: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

34. Круговорот серы в водоемах и участие в нем бактерий.

35. Микроорганизмы, осуществляющие ассимиляционную сульфатредукцию в водоемах: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

36. Сульфатредуцирующие бактерии: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

37. Сероредуцирующие бактерии: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

38. Основные физиологические группы бактерий – продуцентов сероводорода в водоеме.

39. Микроорганизмы, окисляющие серу: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

40. Фотосинтезирующие бактерии: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

41. Хемолитотрофные сероокисляющие бактерии: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

42. Бесцветные серобактерии: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

43. Круговорот фосфора в водоемах и участие в нем бактерий.

44. Микроорганизмы, осуществляющие круговорот фосфора в водоемах: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

45. Круговорот железа и марганца в водоемах и участие в нем бактерий.

46. Микроорганизмы, восстанавливающие железо и марганец в водоемах: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

47. Микроорганизмы, окисляющие железо и марганец в водоемах: общая характеристика, методы выделения, роль в круговороте вещества и энергии в водоеме.

48. Определение численности водных бактерий методами прямого счета на мембранных фильтрах.

49. Определение численности водных бактерий методами прямого счета на стеклах и в счетных камерах.

50. Биохимические методы определения массы водных бактерий.

51. Методы определения бактериальной продукции в водоемах.

52. Оценка продукции водных бактерий по скорости потребления кислорода.

53. Оценка продукции водных бактерий по скорости гетеротрофной ассимиляции углекислого газа.

54. Определение продукции и скорости выедания бактерий методом разведений.

55. Р/В-коэффициент как интегральный показатель бактериальной активности в водоемах.

56. Удельная скорость роста и время генерации как показатели интегральной активности бактерий в водоемах.

57. Интенсивность дыхания как интегральный показатель бактериальной активности в водоемах.

58. Методы определения скорости выедания бактерий.

59. Ассимиляционный коэффициент A и его значение для оценки физиологической активности водных бактерий.

60. Коэффициент энергетического обмена K_2 и его значение для оценки физиологической активности водных бактерий.

61. Роль бактерий в продуктивности водоемов.

62. Микробное сообщество детрита и его роль в продуктивности водоемов.

63. Бактерии как пища водных животных.

64. Факторы, определяющие возможность выедания бактерий водными животными.

65. Проблемы самоочищения в водоемах.

66. Основные процессы самоочищения водной среды.

67. Абиотические факторы, влияющие на самоочищение водной среды.

68. Изучение деструкции ксенобиотиков. Универсальные подходы и определение биоокисляющей способности конкретного водоема.

69. Методические основы самоочищения водной среды.

Рекомендуемая литература

Основная

1. Шеховцова, Н. В. Экология водных микроорганизмов: учебное пособие / Н. В. Шеховцова; Яросл. гос. ун-т. – Ярославль: ЯрГУ, 2008. – 132 с.

Дополнительная

1. Вербина, Н. М. Гидромикробиология с основами общей микробиологии / Н. М. Вербина. – М.: Пищевая промышленность, 1980.

2. Горленко, В. М. Экология водных микроорганизмов / В. М. Горленко, Г. А. Дубинина, С. И. Кузнецов. – М.: Наука, 1977. – 289 с.

3. Громов, Б. Д. Экология бактерий: учеб. пособие / Б. Д. Громов, Г. В. Павленко. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1989. – 246 с.

4. Гусев, М. В. Микробиология: учебник / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – 4-е изд. – М.: Академия, 2003. – 464 с.

5. Дубинина, Г. А. Методы изучения водных микроорганизмов / Г. А. Дубинина, С. И. Кузнецов. – М.: Наука, 1989. – 288 с.

6. Копылов, А. И. Бактериопланктон водохранилищ Верхней и Средней Волги / А. И. Копылов, Д. Б. Косолапов. – М.: Изд-во СГУ, 2008. – 377 с.

7. Микробиология загрязненных вод / под ред. Р. Митчелла. – М.: Медицина, 1976.

8. Современная микробиология: Прокариоты: в 2 т. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля; пер. с англ. – М.: Мир, 2005. – Т. 2. – 496 с.

9. Экология микроорганизмов: учебник для студ. вузов / А. И. Нетрусов, Е. А. Бонч-Осмоловская, В. М. Горленко и др.; под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Академия, 2004. – 272 с.

10. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 563 с.

11. Статьи из журналов «Микробиология», «Водные ресурсы», «Биология внутренних вод».

Примерный перечень научных статей для докладов

1. Бактериальные процессы цикла метана в донных осадках озера Байкал / О. П. Дагурова и др. // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 2. – С. 248–257.
2. Влияние водорослей и инфузорий на бактериальное окисление метана / П. П. Уморин // Биология внутренних вод. – 2007. – № 1. – С. 23–29.
3. Влияние температуры и pH на рост аэробных алкалотермофильных бактерий гидротерм Бурятии / С. В. Зайцева и др. // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 4. – С. 443–448.
4. Микробиологическая деструкция органического вещества в донных осадках озер Литвы / А. Кревш // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 2. – С. 257–262.
5. Микробиологическая характеристика глубоководной части южного Каспия / М. А. Салманов // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 2. – С. 250–256.
6. Определение содержания активных клеток в бактериопланктоне Рыбинского водохранилища / Д. Б. Косолапов, А. И. Копылов // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 5. – С. 687–683.
7. Распределение вирусов и их влияние на бактериопланктон в эвтрофном и мезотрофном водохранилищах / А. И. Копылов и др. // Биология внутренних вод. – 2008. – № 1. – С. 49–57.
8. Распределение и трансформация нефтяных углеводородов в донных отложениях Онежского озера / И. А. Белкина и др. // Водные ресурсы. – 2008. – Т. 35, № 4. – С. 472–481.
9. Распределение планктонных микроорганизмов и беспозвоночных в горном озере в период осенней гомотермии / Д. Б. Косолапов и др. // Биология внутренних вод. – 2007. – № 3. – С. 21–31.
10. Сульфатредукция и метаногенез в меромиктических озерах Шира и Шунет (Хакасия) / А. Ю. Калистратова и др. // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 6. – С. 828–835.
11. Функционирование экосистемы Азовского моря / Ж. П. Селифонова // Биология внутренних вод, – 2008. – № 3. – С. 3–7.
12. Экофизиологические свойства фотосинтезирующих бактерий из зоны хемоклина Черного моря / В. М. Горленко и др. // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 2. – С. 239–247.

План анализа научной статьи

1. Указать, к какому направлению водной микробиологии относится настоящее исследование. Проанализировать цель и задачи исследования.

2. Дать характеристику объекта исследования как среды обитания водных микроорганизмов.

3. Перечислить методы, использованные в настоящем исследовании. Дать их краткую характеристику.

4. Перечислить качественные показатели, определенные в настоящем исследовании. Дать их определения и общую характеристику.

5. Перечислить количественные показатели, определенные в настоящем исследовании. Дать их определения и общую характеристику.

6. Выделить интегральные показатели бактериальной активности в исследованном водоеме.

7. Описать табличный и графический материалы.

8. Описать экологические, систематические и метаболические (физиологические) группы микроорганизмов, изученные в настоящем исследовании. Дать их полную характеристику.

9. Описать круговороты элементов, изученные в настоящем исследовании.

10. Оценить роль изученных авторами микробиологических показателей в оценке продукционных процессов и самоочищения водной среды.

11. Доказать адекватность примененных методов и сделанных авторами статьи выводов поставленным задачам.

12. Оценить стиль изложения результатов исследования авторами, степень научности или популярности статьи.

13. Сделать вывод о практической значимости исследования.

14. Описать научную новизну полученных в настоящем исследовании результатов.

15. Описать, что нового Вы узнали при прочтении и анализе данной статьи.

Образец научного анализа статьи*

Научный анализ статьи Е. И. Компанцевой с соавт. «Фототрофное сообщество соленого щелочного озера Хилганта (Юго-Восточное Забайкалье)»

1. Данное исследование в основном имеет отношение к первому направлению развития водной микробиологии, связанному с изучением морфологического и физиологического разнообразия водных бактерий, в данном случае способных к фотосинтезу. Кроме того, оценку вклада фототрофных бактерий в продукционные процессы оз. Хилганта можно причислить к продукционно-трофологическому направлению и отчасти к биогеохимическому, поскольку был применен радиоуглеродный анализ и исследовалась динамика содержания сульфида в воде аналитическим методом.

Цель настоящей работы – продолжить изучение фототрофного сообщества соленого щелочного озера Хилганта (Юго-Восточное Забайкалье) в плане исследования аноксигенных фототрофных бактерий (АФБ). Авторы особое внимание уделили изучению приспособленности АФБ к условиям обитания, динамике вертикальной стратификации микробного мата, а также роли фототрофного микробного сообщества в продукционных процессах и детоксикации сульфида.

2. Объектом исследования являлся микробный мат, который покрывал всю поверхность дна оз. Хилганта, и фототрофные микроорганизмы, из него выделенные. Озеро Хилганта отличается от большинства солоноватых озёр Юго-Восточного Забайкалья повышенной минерализацией воды (45 г/л) и наиболее выраженным развитием микробных матов.

Максимальная площадь оз. Хилганта составляет 0,5 км². Уровень воды в озере зависит от климатических условий и подвержен значительным колебаниям. В соответствии с ним также меняются минерализация и щелочность воды. В периоды исследования (05.07.1995 и 14–15.07.1996) физико-химические условия и водный режим озера были сходными: глубина состав-

* Статья в сокращённом варианте приведена в приложении.

ляла – 35–45 см, общая минерализация – 40–46 г/л, щелочность 1.0–1.5 г/л (22–30 мг-экв/л), рН 9.5–9.8, температура воды в дневное время колебалась от 25 до 35°C.

Окислительно-восстановительная обстановка менялась в течение суток: максимальное содержание кислорода в воде 6–8 мг/л наблюдали днем с 13.00 до 20.00, а сульфида от 800 до 1000 мгHS⁻/л в ночное время с 23.00 до 8.00 часов утра (рис. 1).

3. Видовое разнообразие и пространственную структуру фототрофного сообщества изучали с помощью фазово-контрастной микроскопии проб мата, стекол обрастания и мазков. Пробы мата отбирали в разных точках озера в разное время суток по слоям. Каждый слой отделяли скальпелем, помещали в пенициллиновый флакон и фиксировали 30% глицерином. Стекла обрастания ставили *in situ* на 8–12 часов. Мазки наносили на предметные стекла из мест массового развития бактерий как в мате, так и вне его.

Интенсивность фотосинтеза определяли радиоуглеродным методом, подавляя активность фотосистемы II диуроном в конечной концентрации 7 мкМ.

Количественный учет фототрофных бактерий проводили методом серийных разведений гомогенизированного образца мата (1 см³). Для более полного учета разных групп АФБ использовали 2 варианта питательной среды. Численность бактерий определяли по максимальному росту на одном из вариантов среды при рН 9.5. Посевы инкубировали в люминостане при 25°C и освещенности около 2000 лк. Окрашенные колонии, выросшие при разных разведениях посевного материала, подсчитывали и микроскопировали.

На жидких средах того же состава получали накопительные культуры при рН 9.5 и 10.4, из которых выделяли чистые культуры на агаризованных средах.

Отношение пурпурных бактерий к условиям среды обитания (рН, соленость) исследовали на чистых культурах *Ectothiorhodospira* sp. А-220Е *Thiocapsa* sp. А-20Т, выделенных из микробного мата оз. Хилганта.

Ультратонкие среды бактерий, полученные стандартным методом, исследовали под электронным микроскопом JEM 100С.

4. Качественными микробиологическими показателями являются таксономическая и пространственная структуры фототрофного сообщества.

По фенотипическим (морфофизиологическим) признакам были идентифицированы диатомовые водоросли и кокковидная зеленая микроводоросль *Chlorella minutissima*, цианобактерии, нитчатые *Microcoleus chthonoplastes*, *Phormidium molle*, *Oscillatoria* sp., *Spirulina* sp. и одноклеточные *Aphanothece salina*, пурпурные бактерии *Ectothiorhodospira* sp., *Allochromatium* sp., *Thiocapsa* sp. и *Rhodovulum* sp., зеленые нитчатые бактерии *Chloroflexus* sp.

В пространственной структуре фототрофного сообщества наибольшее значение имеет распределение отдельных видов по толщине мата, где было обнаружено 6 основных зон, каждая из которых в свою очередь обладала слоистостью, обусловленной чередованием микробных пленок и минеральных слоев. В верхней первой зоне (толщина 1–2 мм) хрящевой консистенции темно-зеленые слои цианобактерий в основном *Microcoleus chthonoplastes* перемежались с беловатыми минеральными слоями.

Во второй зоне (толщиной 1.5–2.5 мм), располагающейся под первой, слои, окрашенные в различные оттенки пурпурного (от розового до темно-малинового), перемежались с минеральными слоями беловатого или сероватого оттенков. Пурпурные тона обусловлены массовым развитием АФБ родов *Ectothiorhodospira* sp., *Allochromatium* sp., *Thiocapsa* sp., *Rhodovulum*.

Третья зона (толщиной 2–3 мм) также характеризовалась слоистой структурой, но менее плотной (рыхловатой) консистенцией. Коричневато-зеленая окраска слоев была связана с присутствием детритных частиц и нитей *Microcoleus chthonoplastes*, как живых, так и частично минерализованных. Пурпурный оттенок был обусловлен АФБ родов *Ectothiorhodospira*, *Allochromatium*, *Thiocapsa*....

В горизонтальной структуре верхней зоны были выявлены светлые желто-зеленые пятна, где поверх *Microcoleus chthonoplastes* обнаружили тонкий (0,2–0,5 мм) слой нитчатых цианобактерий *Phormidium molle* и массовое развитие диатомовых водорослей.

5. К количественным показателям относятся численность разных видов фототрофных бактерий на стеклах обрастания (кл/мм²), в пробах мата и накопительных культурах (кл/мл), а также интенсивность фотосинтеза, или продукция (гС/м²/час).

6. Суммарная интенсивность фотосинтеза, или суммарная продукция (гС/м²/час), является интегральным показателем фотосинтетической активности фототрофного микробного сообщества оз. Хилганта.

7. В таблице приведены физико-химические условия в озере Хилганта в разные годы. Из приведенных данных следует, что в июне – августе с 1995 по 2001 годы температура воды колебалась от 24 (08.08.1999) до 43°C (23.06.2001). Сезон 2001 г. был аномальным, озеро обмелело до 5 см и минерализация увеличилась до 253 г/л, величина рН понизилась до 9,0±0,1

На рис. 2 изображена схема вертикальной структуры микробного мата в оз. Хилганта в светлое и темное время суток. На ней указано, что нижние IV–VI зоны остаются неизменными по толщине и составу, а в верхних трех происходят суточные изменения. Ночью бактерии из I и II зон выходят в водную толщу, обнажая минеральные слои, а в третьей зоне появляются коричневатозеленые слои из *M. chthonoplastes*, обогащаются пурпурными бактериями и приобретают пурпурно-коричневатозеленую окраску.

Рис. 3 включает фотографии микроорганизмов, образующих цианобактериальный мат озера Хилганта, сделанные с помощью фазово-контрастной (а–и) и электронной (к) микроскопии.

На рис. 4 изображено вертикальное распределение четырех доминантных и субдоминантных видов фототрофных микроорганизмов ($\times 10^3$ кл (трихомов)/мм²) на стеклах обрастания в дневное (а) и ночное (б) время. Выявлен ряд закономерностей. В светлое время цианобактерии *M. chthonoplastes* имеют 2 максимума в распределении на глубине 0,5–1,0 (1,5 тыс. трихомов/мм²) и 4,0 мм (около 1,0 тыс. трихомов/мм²). Далее на глубине 2 мм наблюдается пик *Allochromatium* sp. (3,5 тыс. кл/мм²), на глубине 2,5 мм – пик *Thiocapsa* sp. (1,0 тыс. кл/мм²) и глубине 3 мм – максимум *Ectothiorhodospira* sp. (примерно 3,5 тыс. кл/мм²). Ночью первый пик *M. chthonoplastes* становится уже и передвигается ближе к поверхности мата, второй – не смещается, но со-

кращается в 2 раза. Другие виды перемещаются на большую глубину и количество их клеток сокращается, меняется порядок чередования видов: на глубине 3,5 мм наблюдается пик *Thiocapsa* sp., на 4,0 мм – максимум *Allochromatium* sp. и 5,0 мм – пик *Ectothiorhodospira* sp.

8. В данной статье рассмотрены такие экологические группы, как галотолеранты по отношению к минерализации среды, алкалофилы и алкалотолеранты по отношению к pH; основные систематические группы фототрофных прокариот: цианобактерии, пурпурные серные и несерные бактерии, зеленые нитчатые бактерии; физиологические группы: кислородные и анакисгенные фотосинтезики, сульфатредукторы.

9. Анакисгенный фотосинтез имеет отношение к циклам углерода и серы.

10. Озеро Хилганта относится к высокопродуктивным озерам. Суммарная продукция составляла в 1995–1996 гг. 1,4–1,6 гС/м²/час, из них на долю кислородного фотосинтеза, который регистрировался только в верхней зоне, проходило от 3 до 15%. Таким образом, анакисгенный фотосинтез, который регистрировался в трех верхних зонах, определяет продуктивность экосистемы озера. С другой стороны, анакисгенные фотобактерии вносят существенный вклад в самоочищение водной среды, поскольку играют основную роль в окислении сульфида. Большое количество сульфида – результат интенсивной сульфатредукции в этом эвтрофированном озере.

11. Для получения достоверных результатов авторы везде, где можно, использовали высокочувствительные методы физико-химического и радиоактивного анализа, электронной микроскопии. Для изучения динамики вертикальной стратификации микробного мата авторы применили ряд методов, дублирующих результаты друг друга: микробные пейзажи на стеклах обростания, отбор мазков, выделение накопительных и чистых культур фототрофных бактерий из соответствующих зон. Решению каждой из поставленных задач авторы посвятили специальный раздел в описании результатов исследования.

12. Результаты исследования описаны последовательно и подробно. Статья написана научным, доступным языком. Живой

интерес представляет обсуждение результатов исследования, где экосистема оз. Хилганта сравнивается с водоемами морского происхождения. Показано, что в щелочном озере отсутствуют представители нейтрофильной группы зеленых серных бактерий. Наиболее адаптированными к лимитированию высокой соленостью и рН среди фототрофов оказались *Ectothiorhodospira*.

13. Практическую значимость, возможно, имеет детоксикация сульфида с помощью аноксигенных фотобактерий микробных матов. Этот способ очистки стоков может быть где-то реализован.

14. Расшифровка структуры фототрофного сообщества этого мелководного соленого щелочного озера даст новые представления о формировании наземной биоты на Земле, поскольку экстремально алкалофильные микробные сообщества, согласно гипотезе, рассматриваются как реликтовый аналог наземной биоты раннего протерозоя.

15. Новым оказалось экспериментальное свидетельство того, что цианобактерии могут осуществлять аноксигенный фотосинтез за счет фотосистемы I.

Тестовые задания

1. Прикладные направления водной микробиологии

- а) биогеохимическое
- б) гидротехническое
- в) оценка общей численности и биоразнообразия водных бактерий
- г) пищевое
- д) продукционно-трофологическое

2. Особенности воды как среды обитания микроорганизмов

- а) защита от высоких температур
- б) защита от высыхания
- в) защита от высоких перепадов температур
- г) отсутствие острых стрессовых воздействий
- д) хроническое воздействие экстремальных факторов

3. Признаки типично водных бактерий

- а) клеточная стенка грамотрицательного типа
- б) клеточная стенка грамположительного типа
- в) копиотрофия
- г) нейтрофильность
- д) экстремофильность
- е) олиготрофия

4. Адаптации бактерий к обитанию в водной среде

- а) газовые вакуоли
- б) зерна волютина
- в) жгутики
- г) прикрепительные диски
- д) эндоспоры

5. Группы водных бактерий, представляющие собой обособленные эволюционные ветви

- а) актинопланы
- б) водородные термофилы
- в) зеленые нитчатые
- г) пурпурные серные
- д) протеобактерии

6. Ф.И.О. ученого, который открыл водные бактерии до начала развития методов культивирования бактерий

- а) Г. Касерер
- б) А. Клейбер
- в) Ф. Кон
- г) Р. Кох
- д) Б. Фишер

7. Группы аллохтонных микроорганизмов в иле мезотрофной реки

- | | | |
|------------------------|---------------------|------------------------|
| а) <i>Bacteroides</i> | в) <i>Chlamidia</i> | д) <i>Leptothrix</i> |
| б) <i>Bdellovibrio</i> | г) <i>Geobacter</i> | е) <i>Sphaerotilus</i> |

8. Признаки *Planctomycetes*

- а) автотрофы
- б) наличие ядерного тела, окруженного мембраной
- в) отсутствие пептидогликана
- г) планктонные актиномицеты
- д) почкующиеся бактерии
- е) фототаксис

9. Продуценты озерных экосистем

- а) азотфиксаторы
- б) водоросли
- в) гидрофиты
- г) грибы
- д) цианобактерии

10. Хемоавтотрофы, дающие вспышки массового развития в водоемах

- а) денитрификаторы
- б) железоокисляющие
- в) марганецвосстанавливающие
- г) нитрификаторы
- д) сероокисляющие

11. Ключевой фермент водородных бактерий

- а) алкогольдегидрогеназа
- б) гидрогеназа
- в) дегидрогеназа
- г) лактатдегидрогеназа
- д) нитрогеназа

12. Карбоксидобактерии рода *Pseudomonas* –

- а) *p. Acidovorans*
- б) *p. Carboxidoflava*
- в) *p. Carboxidovorans*
- г) *p. Gazotropha*
- д) *p. Hydrogenovora*

13. Свойства метаногенов

- а) автотрофы
- б) азотфиксаторы
- в) археи
- г) аэробы
- д) бактерии
- е) нейтрофилы

14. Группа прокариот, не способных к окислению углеводов нефти

- а) актиномицеты
- б) бациллы
- в) коринеформные бактерии
- г) метилотрофы
- д) псевдомонады

15. Стадии круговорота серы, осуществляемые только прокариотами

- а) ассимиляция сульфата
- б) деструкция органических веществ
- в) восстановление серы
- г) окисление сульфатов
- д) окисление сероводорода

16. Специфические железоредукторы

- а) *Bacillus cereus*
- б) *Bacillus subtilis*
- в) *Escherichia coli*
- г) *Escherichia fergusonii*
- д) *Thiobacillis ferrooxidans*
- е) *Thiobacillis thiooxidans*

17. Основной источник бактериальной продукции в градиентных слоях –

- а) осажденное органическое вещество

- б) взвешенное органическое вещество
- в) растворимое органическое вещество
- г) а, б
- д) а, б, в

18. Функция агрегированного бактериопланктона

- а) основной источник пищи для грубых фильтраторов в эвтрофных водах
- б) дополнительный источник пищи для детритоядных животных
- в) дополнительный источник пищи для планктонных животных во всех водоемах
- г) депо энергии
- д) промежуточное звено между инфузориями и хищным зоопланктоном

19. Наука, один из разделов которой рассматривает роль микроорганизмов в процессах продукции и деструкции органического вещества в водоемах, –

20. Группа микроорганизмов, которую собственно водные бактерии составляют в водоемах, –

21. Ф.И.О. ученого, который впервые применил $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ для определения скорости фотосинтеза в олиготрофных водоемах, – _____

22. Название ступенчатого разложения органического вещества гетеротрофными микроорганизмами _____

23. Условия, при которых происходит неполное окисление органического вещества в водоемах.

24. Группа бактерий, осуществляющих реакцию $24\text{CO} + 11\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 23\text{CO}_2 + (\text{CH}_2\text{O})$.

25. Группа облигатно аэробных бактерий, способных использовать в качестве единственного источника углерода и энергии C_1 -соединения, –

26. Среда, в которой бактерии получают энергию от окисления железа, –

27. Скорость роста единицы биомассы – ... скорость роста бактериопланктона.

28. Универсальный подход, позволяющий сопоставлять потоки вещества и энергии в водоеме, –

29. Соответствие между современной задачей водной микробиологии и методом, с помощью которого она решается

- | | |
|--|---|
| а) определение специфических микробных серотипов | 1) анализ многообразия последовательностей нуклеотидов в 16S рРНК |
| б) определение численности саморегулирующихся популяций | 2) иммунологический |
| в) регистрация геномов, имеющих очень низкую частоту встречаемости | 3) полимеразная цепная реакция (пцр) |
| г) филогенетическое многообразие микроорганизмов в водной среде | 4) проточная цитометрия |

30. Соответствие между принципом классификации прокариот (слева) и группами организмов (справа)

- | | |
|---|------------------------------|
| а) по количеству утилизируемых субстратов | 1) ауксотрофы
копиотрофы |
| б) по необходимой концентрации углерода в среде | 2) олиготрофы
прототрофы |
| в) по потребностям в наборе питательных веществ | 3) специалисты
универсалы |

31. Соответствие между принципом классификации способов жизни прокариот (слева) и группой организмов (справа)

- | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| а) по источнику углерода | 1) автотрофы
анаэробы |
| б) по источнику энергии | 2) аэробы
гетеротрофы |
| в) по донору электронов | 3) литотрофы
органотрофы |
| г) по конечному акцептору электронов | 4) фототрофы
хемотрофы |

32. Соответствие между способом существования и группой бактерий

- | | |
|---------------------------|-------------------------|
| а) фотолитоавтотрофия | 1) галоархеи |
| б) фотолитогетеротрофия | 2) пурпурные несерные |
| в) фотоорганотрофия | 3) цианобактерии |
| г) фотоорганогетеротрофия | 4) зеленые серобактерии |

33. Соответствие родов группам бактерий, которые они представляют

- | | |
|-------------------------------|---------------------|
| 1) метаногены | а) Methanobacterium |
| | б) Methanococcus |
| 2) облигатные метилотрофы | в) Methanosarcina |
| | г) Methylobacillus |
| 3) факультативные метилотрофы | д) Methylocystis |

34. Соответствие групп хемолитотрофов и субстратов, ими окисляемых

- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| 1) водородные | а) NH_3 |
| 2) карбоксидобактерии | б) NO_2 |
| 3) нитрификаторы | в) CO |
| 4) серобактерии | г) H_2S |
| | д) S^0 |
| | е) H_2 |

35. Соответствие между интегральным показателем биологической активности природных вод и формулой

- | | |
|-----------------------------|-----------------------|
| 1) продукция бактерий | а) P/B |
| | б) $P + R$ |
| 2) оборачиваемость биомассы | в) P/A |
| | г) $\mu B_{\text{ж}}$ |
| 3) коэффициент ассимиляции | д) $(1 - K_2)/K_2$ |

36. Соответствие между показателями и единицами измерения

- | | |
|----------|---|
| 1) A | а) ккал |
| 2) g | б) $\text{мг O}_2 / \text{кл/сут}$ |
| 3) μ | в) $\text{мг O}_2 / \text{мг биомассы/сут}$ |
| 4) Q | г) $\text{мг O}_2 / \text{сут}$ |
| 5) R | д) сут^{-1} |
| | е) ч |

37. Соответствие между методом и ученым, который ввел его в практику исследования водных микроорганизмов

- | | |
|-------------------------------|--------------------|
| 1) капиллярная микроскопия | а) Ф. Кон |
| 2) светопольная микроскопия | б) Д. И. Никитин |
| 3) флюоресцентная микроскопия | в) Б. В. Перфильев |
| 4) электронная микроскопия | г) А. Г. Родина |

38. Хронологический порядок введения в практику водной микробиологии методов оценки интенсивности микробиологических процессов

- а) по величине экспрессии генов, которые кодируют структуру ферментов, определяющих скорость специфического процесса
- б) по скорости включения радиоактивной метки в продукты реакции после введения в изолированные пробы меченого субстрата
- в) по скорости изменения концентрации субстратов или продуктов реакции, определенной методами аналитической химии в изолированных пробах
- г) по численности микроорганизмов соответствующей физиологической группы на селективной питательной среде

39. Порядок формирования микробоценозов от поверхности вглубь водоема

- а) бактериобентос
- б) бактерионейстон
- в) бактериопланктон анаэробный
- г) бактериопланктон аэробный
- д) микробоценоз генофонда водоема
- е) микробоценоз жидкого дна

40. Хронологический порядок обнаружения в водоемах следующих групп микроорганизмов

- а) метилотрофы – симбионты моллюсков
- б) типично водные сапротрофы
- в) некультивируемые виды бактерий
- г) фильтрующие формы
- д) хемолитоавтотрофы

41. Порядок окисления метана бактериями

- а) CH_4
- б) CO_2
- в) HCON
- г) CH_3OH
- д) HCOOH

42. Порядок изменения Р/В-коэффициента по мере увеличения трофности водоема

- а) $\text{P/V}=0$
- б) $0 < \text{P/V} < 0,5$
- в) $\text{P/V} > 0,5$

43. Пищевая цепь в микробной петле «цветущего» водоема:

- а) бактериопланктон
- б) дафнии
- в) детрит
- д) инфузории
- е) массовые виды фитопланктона

44. Порядок смены групп микроорганизмов в анаэробном целлюлозоразлагающем микробном сообществе

- а) ацетогены
- б) бродильщики
- в) метаногены
- г) сульфатредукторы
- д) целлюлолитики

45. Соответствие между видом гидролитика микробоценоза жидкого дна и гидролизуемым субстратом:

- | | |
|--------------|-------------------|
| а) агар | 1) Agrobacterium |
| б) крахмал | 2) Beneckia |
| в) хитин | 3) Mucococcus |
| г) целлюлоза | 4) Sporocytophaga |

46. Ваши действия, если при определении общей численности бактерий в одном поле зрения окулярной сеточки находится не более 1–2 клеток.

47. Наиболее вероятные ошибки, если для определения численности сапротрофов вы произвели посев проб воды на РПА из разведения 10^{-6} и получили сплошной рост под агаром.

48. Разведение, которое следует взять для расчета числа микроорганизмов при наличии следующих результатов

Разведение	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Кол-во колоний на ч. Петри	120	55	3	36

49. Число колоний на чашке для расчета численности олиготрофов

Разведение	1:10 (10^{-1})	1:100 (10^{-2})	1:1000 (10^{-3})
РПА 1:10	237	150	35
	40	83	5

50. Числовая характеристика и разведение для расчета численности микробов

Разведение	0	1:10	1:100	1:1000	1:10 000	1:100 000
Число зараженных пробирок	4	4	4	4	4	4
Число пробирок с положительной реакцией	4	4	3	2	0	1
Числовая характеристика – ?; вероятное число – X						
Количество микробов в 1 мл – $X \times ?$						

51. Варианты опыта для определения продукции бактериопланктона методом изолированных проб

- а) с зоопланктоном и глюкозой
- б) без зоопланктона и глюкозы
- в) без зоопланктона, но с глюкозой
- г) с зоопланктоном без глюкозы

52. Ваши действия, если при подсчете клеток методом прямой микроскопии на препарате оказалось, что в одном квадратике окулярной сеточки находится более 100 клеток.

53. Сырая и сухая биомассы бактерий, если общая численность составляет 2,5 млн кл/мл.

54. Время удвоения бактериопланктона, если удельная скорость роста равна $0,014 \text{ ч}^{-1}$.

Приложения

Приложение 1

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2005, том 74, № 3, с. 410–419
УДК 579.262(571.53-285.2)

Фототрофное сообщество соленого щелочного озера Хилганта (Юго-Восточное Забайкалье)

Е. И. Компанцева*, Д. Ю. Сорокин*, В. М. Горленко*, Б. Б. Намсараев**

*Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН. Москва

**Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН. Улан-Удэ

Исследовали структуру фототрофного сообщества мелководного (глубина 35–45 см) соленого (минерализация воды 45 г/л) содового (щелочность 30 мг-экв/л, рН 9.5) озера Хилганта (Агинский Бурятский автономный округ). Дно озера было покрыто микробным матом толщиной 10–15 мм, основу которого составляли нитчатые цианобактерии *Microcoleus chthonoplastes*. Мат имел выраженную слоистость и содержал значительное количество минералов. По вертикали выделялось 6 зон, имеющих характерную окраску, консистенцию, чередование слоев. Живые фототрофные бактерии присутствовали в трех верхних зонах. Основная масса цианобактерий была сосредоточена в верхней зоне. Ниже наблюдалось развитие пурпурных бактерий. Описана суточная динамика вертикального распределения фототрофных микроорганизмов в связи с колебаниями физико-химических параметров среды. Среди аноксифотобактерий доминировали *Ectothiorhodospira* sp. Их численность, учтенная методом посева, составляла 10^6 – 10^7 кл/мл. Также присутствовали пурпурные бактерии родов *Allochromatium*, *Thiocapsa*, *Rhodovulum*. Эксперименты с чистыми культурами выделенных бактерий показали, что аноксигенные фотосинтетики в озере Хилганта являются галотолерантами и алкалотолерантами, или алкалофилами.

Соотношение видов аноксифотобактерий в жидких накопительных культурах при pH 9.5 было близким к наблюдаемому в озере. При повышении pH до 10.4 развивались преимущественно *Ectothiorhodospira*, наиболее приспособленные к жизни в условиях повышенной минерализации и щелочности в среде. Фотосинтетическая активность наблюдалась в трех верхних зонах мата и составляла в среднем 1.5 г С/(м² ч). При этом 75–95% общей продуктивности приходилось на долю аноксигенного фотосинтеза. Основная роль в окислении сульфида принадлежала фототрофным микроорганизмам – аноксифотобактериям и цианобактериям. По физико-химическим условиям и структуре фототрофного сообщества озеро Хилганта сходно с мелководными солеными водоемами морского происхождения. Основное отличие состоит в повышенной щелочности и, как следствие, преобладании среди микроорганизмов алкалофильных и алкалотолерантных форм, отсутствии представителей нейтрофильной группы зеленых серных бактерий.

Ключевые слова: соленые содовые озера, микробный мат, вертикальная стратификация, аноксифотобактерии, алкалотолерантные и алкалофильные бактерии.

В последнее время содовые озера привлекают внимание микробиологов многих лабораторий мира. Исследованы щелочные водоемы разного типа, описано много новых таксонов практически всех известных физиологических групп микроорганизмов [1].

Благодаря повышенной минерализации и щелочности, биота содовых озер состоит преимущественно из прокариотных организмов, чей метаболизм отличается рядом особенностей, обусловленных спецификой условий существования. Возрастание интереса к экстремально алкалофильным микробным сообществам связано также с гипотезой, рассматривающей их как реликтовый аналог наземной биоты раннего протерозоя [2].

Предметом данного исследования было соленое щелочное озеро Хилганта, расположенное в криоаридной зоне Юго-Восточного Забайкалья, на территории Агинского Бурятского автономного округа. От большинства озер этого региона, которые являются солоноватыми, озеро Хилганта отличается повышенной минерализацией воды (45 г/л) и наиболее выраженным развитием

микробных матов. По классификации М. Г. Валяшко, оно относится к соленым озерам сульфатно-натриевого типа [3]....

Наша работа посвящена дальнейшему изучению фототрофного сообщества озера Хилганта. Основное внимание уделено аноксифотобактериям и их приспособленности к условиям обитания, динамике вертикальной стратификации микробного мата, а также роли фототрофного микробного сообщества в продукционных процессах и детоксикации сульфида.

Объекты и методы исследования

Объектом исследований являлся микробный мат, порывающий всю поверхность дна озера Хилганта. Полевые исследования проводились в июле 1995 и 1996 годов. Более детальные исследования, включая суточную динамику параметров среды и структуры мата, проводились в 1996 г.

Во время полевых работ определяли физико-химические параметры среды: температуру воды – ртутным термометром, рН – кондуктометром и бумажным индикатором, щелочность – титрованием [6], общую минерализацию воды – ареометром и кондуктометром. Концентрацию сульфида в воде определяли йодометрическим титрованием содержание кислорода – методом Винклера для вод, содержащих сульфид, с добавлением к пробе нитрата ртути [6].

Образцы для описания вертикальной структуры микробного мата отбирали в разных точках озера и в разное время суток. Толщину слоев мата измеряли с помощью миллиметровой бумаги.

Стекла обрастания ставили на 8–12 часов в разное время суток. В лаборатории стекла окрашивали кристалл-виолетом [7] и просматривали в световом микроскопе с фазовым контрастом. Из мест массового развития бактерий (как в мате, так и вне его) брали мазки, которые наносили на предметные стекла и высушивали. В дальнейшем их окрашивали и просматривали так же, как стекла обрастания. Для последующего микроскопирования отбирали пробы мата по слоям. Каждый слой отделяли скальпелем, помещали в пенициллиновый флакон и фиксировали 30-процентным глицерином.

Интенсивность фотосинтеза определяли в изолированных пробах радиоуглеродным методом [8]. Для подавления активности II фотосистемы применяли диурон в конечной концентрации 7 мкМ.

Количественный учет фототрофных бактерий проводили методом посева серийных 10-кратных разведений гомогенизированного образца мата (1 см²) в столбики агаризованной среды. Для более полного учета разных групп аноксифотобактерий использовали два варианта питательной среды... Количественный учет и выделение культур пурпурных бактерий проводили при pH 9.5. В опытах кислотность среды варьировали внесением разных соотношений карбоната и бикарбоната натрия с сохранением их суммарной концентрации. Посевы инкубировали в люминистате при температуре 25°C и освещенности около 2000 лк. Окрашенные колонии, выросшие при разных разведениях посевного материала, подсчитывали и микроскопировали.

Также были получены накопительные культуры на жидких средах того же состава с pH 9.5 и 10.4, из которых в свою очередь были сделаны посевы с разведениями в агаризованные столбики.

Отношение пурпурных бактерий к условиям среды обитания (pH, соленость) исследовали на чистых культурах *Ectothiorhodospira sp.* A-20E и *Thiocapsa sp.* A-20T, выделенных из микробного мата озера Хилганта.

Ультратонкие срезы бактерий, полученные стандартным методом [9], исследовали под электронным микроскопом JEM 100C.

Результаты

Физико-химические условия

Озеро Хилганта имеет округлую форму, чуть вытянуто с северо-востока на юго-запад (длина 45–50 м). Его максимальный размер – 0.5 км². Уровень воды в озере зависит от климатических условий и подвержен значительным колебаниям. В соответствии с ним меняются минерализация, щелочность и pH воды (таблица).

Структуру фототрофного сообщества, развивающегося в озере Хилганта, исследовали в 1995 (05.07) и 1996 (14–15.07) годах. Физико-химические условия и водный режим озера в эти

периоды были сходными (табл.). Глубина составляла 35–45 см, общая минерализация 40–46 г/л, щелочность 1.0–1.5 г/л (22–30 мг-экв/л), рН 9.5–9.8, температура воды в дневное время колебалась от 25 до 35⁰С.

Таблица

Физико-химические условия в оз. Хилганта в разные годы

<i>Год</i>	<i>Дата</i>	<i>Температура, °С</i>	<i>Минерализация, г/л</i>	<i>рН</i>	<i>Глубина, см</i>
1995	05.07	28	46	9.8	34
1996	15.07	34	45	9.5	35
1997	10.08	32	43	9.7	36
1998	16.06	29	40	9.9	37
1999	02.07	27	38	10.0	40
1999	08.08	24	42	9.8	42
2000	25.07	32	56	9.6	28
2001	18.06	30	102	9.1	8
2001	23.06	43	253	8.9	5
2001	20.08	26	82	9.0	10

Окислительно-восстановительная обстановка в озере менялась в течение суток (рис. 1). Днем в результате интенсивного фотосинтеза, главным образом цианобактериального, содержание кислорода в воде повышалось и достигало 6–8 мг/л. Сульфид, образуемый в мате и иле сульфатредукторами, потреблялся микроорганизмами и химически окислялся кислородом. С наступлением темноты и прекращением как окислительного, так и анакислительного фотосинтеза содержание O_2 резко падало. Оставшийся в воде кислород потреблялся аэробной микрофлорой и химически восстанавливался сульфидом. В свою очередь сероводород по мере снижения освещенности и концентрации O_2 накапливался в иле и мате и даже обнаруживался в воде в значительном количестве (до 1 мМ). Содержание бикарбоната несколько снижалось в дневные часы, тогда как концентрация карбоната незначительно возрастала.

Структура микробных матов

Микробные маты толщиной 10–15 мм полностью покрывали дно озера. Большая часть поверхности матов имела темно-зеленую (иногда почти черную) окраску. Местами, в виде «пятен», встречались светлые желто-зеленые участки.

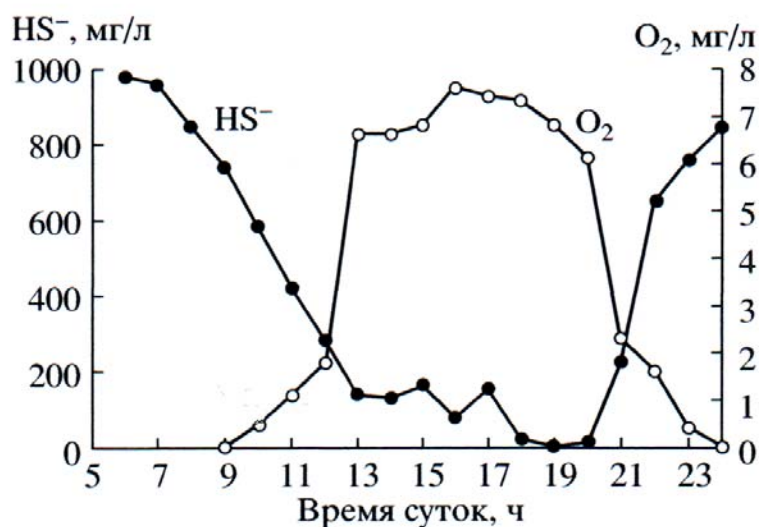


Рис. 1. Суточная динамика содержания кислорода и сульфида в воде оз. Хилганта

На всем протяжении маты имели хорошо выраженную тонкослоистую структуру. В них активно протекали процессы минералообразования. Между слоями бактерий располагались слои минералов, которые, как было показано ранее Герасименко с соавт. [5], представлены в основном карбонатами и фосфатами кальция. Частицы минералов встречались и внутри микробных слоев. Это придавало матам плотную, часто хрящеватую, консистенцию и прочность.

В центральной части озера наблюдалось образование твердых выростов разной формы, возвышающихся над поверхностью мата на несколько сантиметров. Они состояли из отделившихся кусков мата, покрытых коркой минералов. Очевидно, их образование связано с выходами подземных минеральных вод.

Некоторые куски мата отрывались и всплывали. На таких кусках, так же, как и на разлагающихся частях растений, попадающих в озеро с берега, наблюдалось массовое развитие пур-

пурпурных бактерий в виде розового налета. В местах опускания или нарушения матов иногда отмечалось окрашивание воды в красный цвет. В 1995 г. наблюдали образование на поверхности воды розовой пены.

Для микробных матов характерна выраженная вертикальная стратификация как физико-химических параметров среды, так и микробных сообществ. При этом, несмотря на некоторую изменчивость во времени и пространстве, в структуре матов и ее динамике можно выявить общие закономерности.

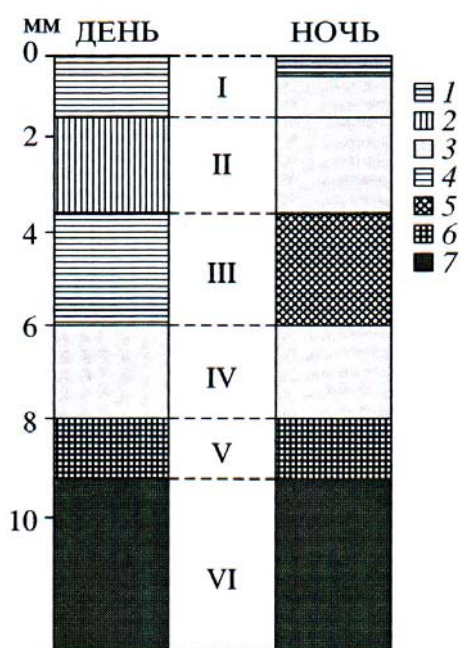


Рис. 2. Схема вертикальной структуры микробного мата в оз. Хилганта в светлое и темное время суток: 1 – темно-зеленые слои, образованные преимущественно *Microcoleus chthonoplastes*; 2 – пурпурные слои с преобладанием пурпурных бактерий; 3 – беловатые и сероватые слои, состоящие в основном из минералов; 4 – коричневато-зеленые слои, содержащие живые и частично разложившиеся, частично минерализованные нити *M. chthonoplastes*; 5 – пурпурно-коричневато-зеленые слои, состоящие преимущественно из нитей *M. chthonoplastes* (разной степени сохранности) и пурпурных бактерий; 6 – светло-коричневые слои, образованные в основном нитями *M. chthonoplastes* и их фрагментами, находящимися на разных стадиях разрушения и минерализации; 7 – темно-серые, почти черные слои с преобладанием сульфатредуцирующих бактерий

После просмотра многих образцов мата, взятых в разных участках озера и в разное время суток, визуального изучения их вертикальной структуры и послойного микроскопирования было выделено 6 основных зон, присутствовавших во всех образцах (рис. 2). Каждая зона, в свою очередь, обладала слоистостью.

Поскольку во время экспедиций 1995 и 1996 г. уровень воды и физико-химические показатели в озере Хилганта были близки, структура микробных матов в эти периоды была сходной, различаясь в основном по степени выраженности отдельных зон. Результаты послойного изучения образца мата, отобранного однократно в 1995 г., приведены в работе Герасименко с соавт. [5]. В 1996 г. во время более длительного пребывания на озере удалось проследить суточную динамику вертикальной структуры микробного мата, обусловленную колебаниями физико-химических параметров среды.

I зона, расположенная у поверхности мата, обычно имела толщину 1–2 мм. Ее основу составляли нитчатые цианобактерии *Microcoleus chthonoplastes* (рис. 3а). Она имела слоистую структуру – темно-зеленые слои цианобактерий были разделены беловатыми слоями, содержащими минералы. В зависимости от времени суток темно-зеленые и беловатые слои чередовались равномерно или темно-зеленые слои сосредоточивались в верхней части зоны, а беловатые – в нижней. Зона в целом имела плотную хрящеватую консистенцию, тогда как отдельные зеленые слои были более мягкими и слизистыми благодаря значительному развитию гликокаликса, окружающего пучки нитей *M. chthonoplastes*.

При микроскопировании (рис. 3) фиксированных проб, стекол обрастания и сухих препаратов в этой зоне обнаружены также диатомовые водоросли, одноклеточные цианобактерии *Aphanothese salina*, отдельные нити *Phormidium molle*, *Oscillatoria sp.*, кокковидная микроводоросль, определенная Л. М. Герасименко как *Chlorella minutissima* [5], простейшие. Здесь также присутствовали в небольшом количестве пурпурные бактерии – *Ectothiorhodospira sp.*, *Allochromatium sp.*, *Thiocapsa sp.*

На некоторых участках мата, которые с поверхности выглядели как светлые желто-зеленые «пятна» на темно-зеленом фоне, над верхним слоем *Microcoleus* располагался тонкий (0.2–0.5 мм) желто-зеленый слой. Он был образован в основном нитчатыми цианобактериями *Phormidium molle*. Там же отмечено наибольшее количество диатомовых водорослей.

II зона, расположенная под I, имела толщину в среднем 1.5–2.5 мм, слоистую структуру и обычно хрящеватую или слизистую консистенцию. Часть слоев была окрашена в различные оттенки пурпурного (от розового до темно-малинового), другие имели беловатую или сероватую окраску и состояли в основном из минералов. Соотношение слоев менялось в течение суток. Пурпурная окраска слоев этой зоны была обусловлена массовым развитием фототрофных бактерий родов *Ectothiorhodospira*, *Allochromatium*, *Thiocapsa*, *Rhodovulum*. При микроскопировании здесь также отмечалось присутствие единичных диатомовых водорослей, нитей *Microcoleus* и *Phormidium*. В нижней части зоны встречались зеленые нитчатые бактерии *Chloroflexus sp.* (рис. 3).

III зона имела толщину в среднем 2–3 мм. Для нее также была характерна слоистая структура, но менее плотная (рыхловатая), по сравнению с другими зонами, консистенция. Основной цвет слоев коричневато-зеленый с пурпурным оттенком, проявление которого менялось в течение суток.

Коричневато-зеленая окраска этой зоны была связана с присутствием детритных частиц и нитей *M. chthonoplastes*, как живых, так и частично разрушенных, частично минерализованных (рис. 3). Следует отметить, что высокая фотосинтетическая продуктивность, зарегистрированная в этой зоне, свидетельствовала о наличии в ней значительного количества физиологически активных клеток цианобактерий. Пурпурный оттенок был обусловлен аноксифотобактериями родов *Ectothiorhodospira*, *Allochromatium*, *Thiocapsa*. При микроскопировании отмечено также присутствие одноклеточных цианобактерий *Aphanothece salina* и нитчатых *Spirulina sp.*

IV зона имела толщину в среднем 1–3 мм. Для нее были характерны преобладание серой окраски, слоистость и плотная хрящеватая консистенция. Основу этой зоны составляли минералы, среди которых встречались минерализованные фрагменты цианобактерий.

V зона толщиной 1–2 мм имела слоистую структуру. Слои плотные, но непрочные, легко рвущиеся, большей частью светло-коричневого цвета. Они были образованы в основном нитями *Microcoleus* и их фрагментами, находящимися на разных стадиях разрушения и минерализации.

Ниже V зоны находился темно-серый восстановленный ил. Его верхний слой являлся структурным продолжением мата, был механически с ним связан и по существу являлся его последней VI зоной. Темно-серый слой ила толщиной от 3 до 8 мм сохранялся на извлеченном из озера мате.

Эта зона имела рыхлую консистенцию и слабо выраженную слоистость. При микроскопировании отмечались минерализованные нити цианобактерий и их фрагменты, детритные частицы и одноклеточные бактерии, среди которых преобладали вибрионы, скорее всего, сульфатредукторы. Темно-серый, почти черный цвет и запах сероводорода свидетельствовали об интенсивном процессе сульфатредукции в этой зоне.

В приведенном выше описании зон структура микробного мата рассматривалась нами с точки зрения фототрофных микроорганизмов. Хотя мы не упоминали бактерий других физиологических групп, следует отметить, что они присутствовали в том или ином количестве во всех слоях мата. Однако наибольшая численность и разнообразие нефототрофных бактерий отмечались в I и II зонах.

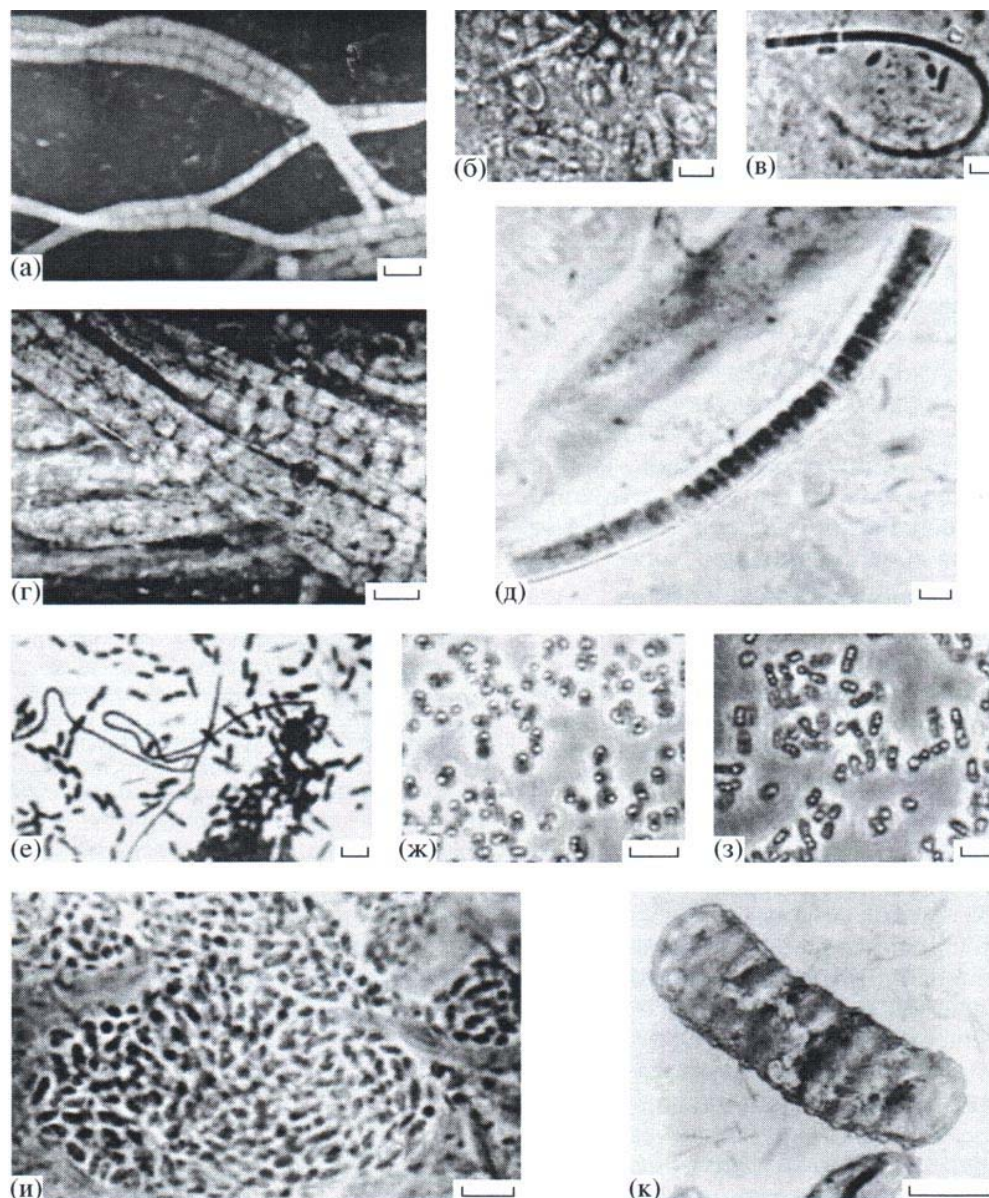


Рис. 3. Микроорганизмы, образующие цианобактериальный мат озера Хилганта: а – *M. chthonoplastes*, пучки нитей; б – простейшие; в – *Phormidium molle*; г – частично минерализованные пучки нитей *M. chthonoplastes*; д – *Oscillatoria sp.*; е – нити *Chloroflexus sp.* и палочковидные клетки *Ectothiorhodospira sp.*; ж – *Thiocapsa sp.* с внутриклеточными каплями серы; з – *Allochromatium sp.* с внутриклеточными каплями серы; и – «клубки», образуемые *Ectothiorhodospira sp.* в зоне контакта с кислородом; к – ультратонкий срез клетки *Ectothiorhodospira sp.*, мембранный аппарат фотосинтеза в виде стопок ламелл. Световой микроскоп, фазовый контраст (а – и). Электронный трансмиссионный микроскоп (к). Масштаб 5 мкм (а – и) и 1 мкм (к)

Суточная динамика вертикальной структуры микробного мата

Описанная выше структура микробного мата в общих чертах сохранялась на всем протяжении озера. Образцы, взятые из разных точек, отличались лишь толщиной и нюансами окраски отдельных зон и слоев. Однако существенные различия вертикальной структуры мата были отмечены в пробах, отобранных в разное время суток.

Как показано на рис. 2, зоны IV–VI, в которых живые фототрофные микроорганизмы отсутствовали, сохраняли постоянную структуру и окраску в течение дня, в то время как три верхние зоны претерпевали значительные изменения.

В середине дня темно-зеленые слои, образованные *M. chthonoplastes*, распределялись равномерно по всей I зоне, чередуясь с беловатыми минеральными слоями. В ранние утренние и вечерние часы (в ночное время наблюдений нет) темно-зеленые слои сосредоточивались в верхней части (0.2–0.5 мм) зоны, в то время как нижняя часть состояла лишь из беловатых слоев.

Пурпурные бактерии в светлое время суток располагались в основном во II зоне. При этом обычно наблюдалось следующее чередование слоев (сверху вниз): сиренево-розовые, беловатые, темно-пурпурные, беловатые. В это время III зона имела коричнево-зеленую окраску слоев, обусловленную присутствием детрита, *Microcoleus* и небольшого количества пурпурных бактерий.

В ранние утренние и вечерние часы II зона приобретала беловатую или сероватую окраску и состояла в основном из минералов, пурпурных бактерий там оставалось очень мало. В это же время в III зоне появлялся отсутствовавший днем выраженный пурпурный оттенок, вызванный увеличением числа пурпурных бактерий. Однако, судя по стеклам обрастания (рис. 4), в целом численность пурпурных бактерий в мате в ночное время была ниже, чем днем.

Интересно, что, благодаря значительной минерализации и плотной консистенции большинства слоев, при изменении условий среды и вертикального распределения микроорганизмов сохранялась основа мата, его «скелет». Несмотря на различия между «дневным» и «ночным» матами, местоположение основных зон в них не менялось, даже их размеры изменялись мало.

Так, в «ночном» мате большинство фототрофных микроорганизмов покидали нижнюю часть I зоны и II зону. Эти участки теряли свою дневную окраску, но сохраняли размеры. В результате между тонким темно-зеленым слоем *Microcoleus* и пурпурно-коричнево-зеленой III зоной образовывался лишенный фотосинтетиков «обесцвеченный» горизонт толщиной до 3 мм.

Суточные изменения вертикального распределения основных видов фототрофных микроорганизмов можно проследить также на стеклах обрастания (1996 г.). Стекла ставились на 8–12 ч в разное время суток. На рис. 4 представлены два примера, отражающие структуру «дневного» и «ночного» матов. Хорошо заметно происходившее в ночное время смещение зоны развития *M. chthonoplastes* к поверхности мата, а пурпурных бактерий в нижерасположенные слои.

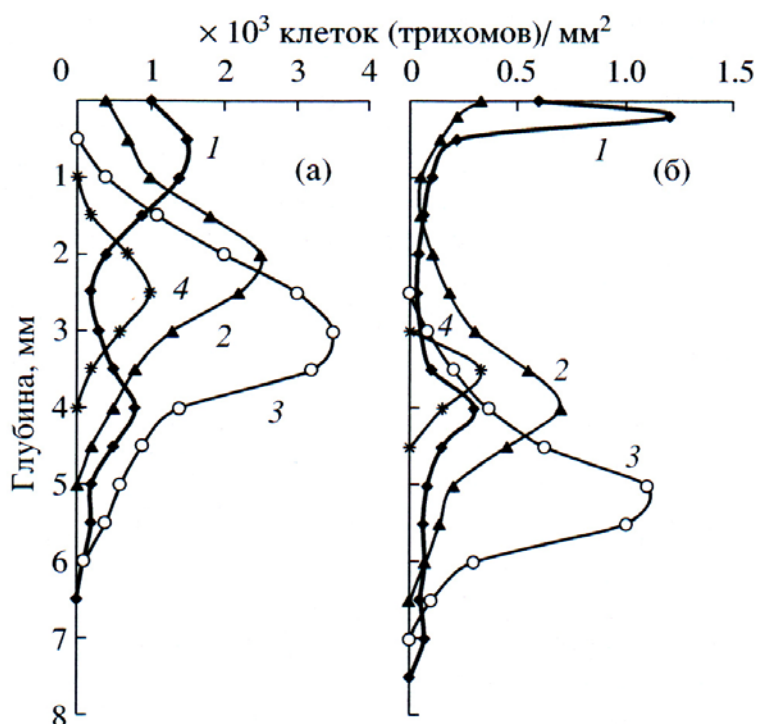


Рис. 4. Вертикальное распределение фототрофных микроорганизмов на стеклах обрастания в дневное (а) и ночное (б) время:
1 – *M. chthonoplastes*, 2 – *Allochromatium sp.*, 3 – *Ectothiorhodospira sp.*,
4 – *Thiocapsa sp.*

Концентрация *Microcoleus* у верхней границы мата совпадала по времени с низкой освещенностью и повышенным содержанием сульфида в воде, в то время как их распространение в пределах I зоны происходило при возрастании освещенности и концентрации кислорода (рис. 1). Очевидно, описанная миграция *Microcoleus* является ответом на изменения окружающей среды, главным образом освещенности, и свидетельствует о способности цианобактерий активно перемещаться в сторону более благоприятных условий. Сходные вертикальные миграции в зависимости от суточных изменений уровня освещенности были описаны для нитчатой цианобактерии *Oscillatoria boryana* [10].

Отсутствие пурпурных бактерий во II зоне «ночного» мата может быть связано с их миграцией в двух направлениях: вверх в воду и вниз в III зону. Скорее всего, оба эти процесса имеют место. В пользу первого свидетельствуют описанные выше случаи массового скопления пурпурных бактерий вне мата. В пользу второго – увеличение в темное время суток численности пурпурных бактерий в III зоне.

Со сменой дня и ночи меняется освещенность и, как следствие, окислительно-восстановительная обстановка в воде и мате. Подвижные бактерии реагируют на эти изменения миграцией в направлении более благоприятных условий. Очевидно, в темное время суток зона II, основное место дневной локализации пурпурных бактерий, становится неблагоприятной для большинства из них. Некоторые бактерии, менее толерантные к сульфиду и предпочитающие менее восстановленные условия, мигрируют в воду. Другие предпочитают низкие значения E_h , высокие концентрации H_2S и мигрируют в нижерасположенную III зону. Возможно, в дневное время они вынуждены находиться во II зоне из-за низкой освещенности в нижних слоях, более благоприятных для них в других отношениях.

Численность и экологическая приспособленность аноксифотобактерий

...Для определения численности и видового состава аноксифотобактерий был проведен их количественный учет путем посева 10-кратных разведений суспензии мата в столбики

агаризованной питательной среды. В посевах доминировали *Ectothiorhodospira* sp., фенотипически сходные с *Ect. mobilis* (10^7 клеток/мл). Вторыми по численности были представители сем. *Chromatiaceae* – *Allochromatium* sp. и *Thiocapsa* sp. Причем в 1995 г. преобладали *Thiocapsa* sp. (10^6 – 10^7 клеток/мл), а численность *Allochromatium* sp. составляла от 10^3 до 10^5 клеток/мл в разных пробах. В 1996 г., напротив, численность *Chromatium* sp. достигала 10^6 – 10^7 клеток/мл, а *Thiocapsa* sp. – 10^4 – 10^5 клеток/мл. К числу субдоминирующих видов (10^5 – 10^7 клеток/мл) следует отнести несерные пурпурные бактерии *Rhodovulum* sp., которые по своим морфофизиологическим характеристикам (размер, пигменты, подвижность, отложение серы в качестве промежуточного продукта окисления сульфида) близки к *Rdv.euryhalinum* [11]. В значительном количестве в образцах мата присутствовали также бактерии рода *Ectothiorhodospira* с газовыми вакуолями, относимые в настоящее время к виду *Ect. shaposhnikovii*. Ранее эти микроорганизмы выделяли в отдельный вид *Ect. vacuolata*, который недавно был упразднен [12].

Для определения влияния экстремальных значений pH на видовой состав аноксифотобактерий в озере Хилганта пробы мата были посеяны на жидкую среду с pH 9.5 и 10.4. Полученные таким образом накопительные культуры были пересеяны с разведениями в столбики агаризованной среды с последующим подсчетом и микроскопированием выросших колоний.

При pH 9.5 соотношение пурпурных бактерий в накопительной культуре было близким к наблюдаемому в микробном мате, в то время как при pH 10.4 резко преобладали *Ectothiorhodospira* sp., а присутствие остальных видов было незначительным. Полученные результаты показывают, что повышение pH до экстремальных значений определяет видовой состав и ограничивает видовое разнообразие аноксифотобактерий, способствуя выраженному доминированию наиболее приспособленных форм, т. е. играет роль лимитирующего фактора.

Из микробного мата озера Хилганта были выделены чистые культуры *Ectothiorhodospira* sp. А-20Е и *Thiocapsa* sp. А-20Т. Исследовали отношение этих бактерий к условиям среды обитания – к pH и солености (рис. 5). *Ectothiorhodospira* sp. А-20Е

оказались алкалофилами и галотолерантами. Оптимальный рост наблюдался при pH 9.5, в то время как при pH 7 рост практически отсутствовал. Бактерии хорошо росли как на пресной среде, так и на средах, содержащих до 40 г/л NaCl. *Thiocapsa* sp. A-20T лучше развивались при меньших значениях pH и солености, являясь алкало- и галотолерантами. Наилучший рост наблюдался на пресной среде при pH около 8, хотя бактерии были способны расти в диапазоне pH 7–9 и при концентрации NaCl до 30 г/л.

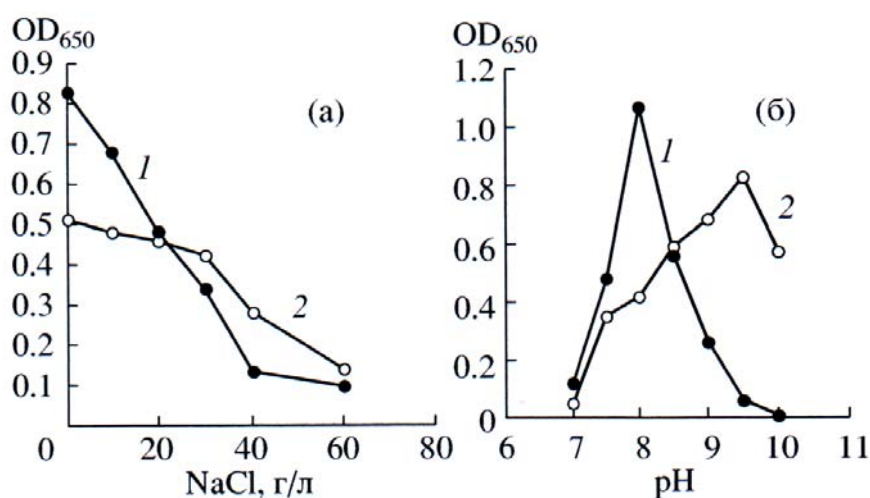


Рис. 5. Зависимость роста чистых культур *Thiocapsa* sp. A-20T (1) и *Ectothiorhodospira* sp. A-20E (2) от концентрации NaCl (a) и pH среды (б)

Функционирование фототрофного сообщества

Основная роль фототрофных микроорганизмов в сообществе – продукция органического вещества за счет энергии света. Для озера Хилганта, так же, как для мелководных соленых водоемов, характерна высокая продуктивность. Суммарная интенсивность фотосинтеза, определенная радиоуглеродным методом, в 1996 г. составляла 1.4–1.6 гС/м²/час. С применением диурона было показано, что основная часть органического вещества синтезировалась путем аноксигенного фотосинтеза и лишь 3–4% – за счет оксигенного. При раздельном определении фотосинтетической активности в разных зонах мата по вертикали сходная интенсивность фотосинтеза была зарегистрирована в

трех верхних зонах мата и отсутствовала в нижерасположенных зонах. При этом кислородный фотосинтез отмечен лишь в I (верхней) зоне мата, где его доля от общей продукции составляла 25%. Во II и III зонах продукция органического вещества осуществлялась целиком за счет анакисгенного фотосинтеза. Высокая интенсивность фотосинтеза в III зоне свидетельствует о присутствии там в достаточном количестве жизнеспособных нитей *Microcoleus*. Сходные результаты были получены в 1995 г. – суммарная продукция составляла 1.6 гС/м²/час, из них на долю кислородного фотосинтеза приходилось 15%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в озере Хилганта не только анакисфотобактерии (II зона), но и цианобактерии (I и III зоны) осуществляют преимущественно анакисгенный фотосинтез с использованием I фотосистемы. Это связано с высоким содержанием сульфида в воде в течение большей части суток (рис. 1). В лабораторных опытах [13] вклад анакисгенного фотосинтеза в общую продуктивность культуры *M. chthonoplastes* на среде без сульфида составлял несколько процентов, а в присутствии 0.5 мМ Na₂S достигал 95%. При этом величина общей продуктивности изменялась незначительно.

...

Фототрофные бактерии играют основную роль в окислении сульфида в озере Хилганта. Скланки с изолированными пробами (70 мл озерной воды и 7 см² микробного мата) инкубировали в озере: 1) на свете, 2) на свете с добавлением диурона и 3) в темноте в течение светового дня, периодически измеряя содержание сульфида в воде (рис. 6). Было установлено, что окисление сульфида происходит в основном на свете за счет анакисгенного фотосинтеза цианобактерий и анакисфотобактерий. Вклад нефототрофных микроорганизмов в окисление сульфида, видимо, был незначительным. В темноте образование сероводорода значительно превышало его окисление, концентрация H₂S постоянно возрастала и к вечеру достигала 1.8 мМ. На свете в присутствии диурона, подавляющего кислородный фотосинтез, содержание сероводорода в воде было лишь немногим выше, чем в пробе без диурона, что свидетельствует о незначительном вкладе кислородного фотосинтеза в процесс окисления сульфида.

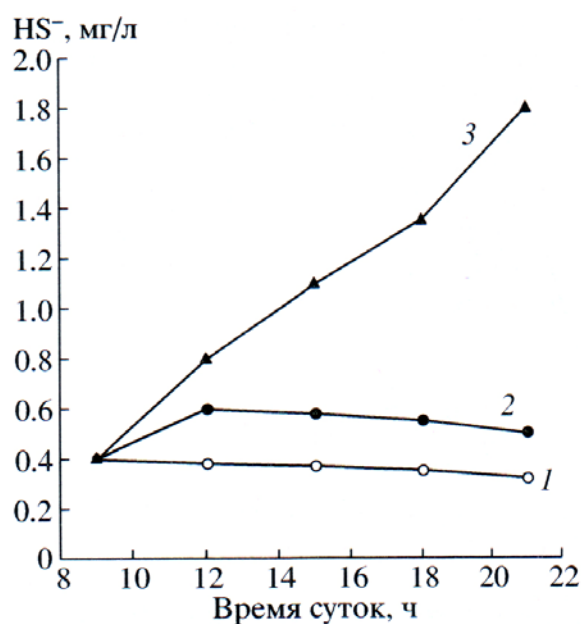


Рис. 6. Динамика содержания сульфида в воде в изолированных пробах (вода + мат), отобранных в озере Хилганта и инкубированных *in situ*:
1 – на свету; 2 – на свету в присутствии диурона; 3 – в темноте

Обсуждение

По физико-химическим условиям соленое содовое озеро Хилганта сходно с мелководными солеными водоемами морского происхождения [5, 14, 15], от которых отличается повышенными значениями щелочности и pH. Для водоемов обоих типов характерны хорошая освещенность, высокое содержание биогенов и, как следствие, естественная эвтрофикация, интенсивная сульфат-редукция в осадках, значительный вертикальный градиент физико-химических условий на границе вода – ил. Таким образом, создаются условия, благоприятные для развития фотосинтезирующих микроорганизмов, в том числе аноксифотобактерий. Микробные маты, развивающиеся в мелководных соленых и соленых содовых озерах, также имеют много общего [5, 14]. Что касается аноксифотобактерий, то и в тех, и в других водоемах доминируют пурпурные бактерии семейств *Ectothiorhodospiraceae* и *Chromatiaceae*; широко распространены несерные пурпурные бактерии рода *Rhodovulum*; аноксифотобактерии представлены

галотолерантными и галофильными формами [14, 15]. Однако в отличие от нейтральных соленых водоемов в соленом содовом озере Хилганта отсутствуют представители нейтрофильной группы зеленых серных бактерий, а пурпурные бактерии представлены алкалотолерантными и алкалофильными формами.

... Как показали опыты с чистыми и накопительными культурами, среди обитающих в озере Хилганта аноксифотобактерий, *Ectothiorhodospira* являются наиболее конкурентноспособными как в условиях повышенной минерализации, так и при возрастании pH до экстремальных значений. Очевидно, при периодическом увеличении минерализации или pH в озере Хилганта доминирование *Ectothiorhodospira* среди аноксигенных фотосинтетиков должно возрастать.

Таким образом, сообщество аноксифотобактерий в галоалкалофильных микробных матах озера Хилганта по своей структуре близко к сообществам соленых мелководных водоемов морского происхождения. Основное отличие, обусловленное повышенной щелочностью воды, заключается в преобладании алкалофильных и алкалотолерантных форм, а также в отсутствии зеленых серобактерий. Для фототрофного сообщества озера Хилганта в целом характерны высокая продуктивность, в основном за счет аноксигенного фотосинтеза, и ведущая роль в детоксикации сульфида...

Оглавление

Введение.....	3
Лабораторное занятие 1. Тема «Отбор и подготовка проб воды для микробиологического анализа»	6
Лабораторное занятие 2. Тема «Количественный и качественный анализ гетеротрофного бактериопланктона»	11
Лабораторное занятие 3. Тема «Количественные характеристики бактериопланктона»	23
Лабораторные занятия 4–5. Тема «Определение интенсивности микробиологических процессов»	29
Лабораторное занятие 6. Тема «Обобщенная микробиологическая характеристика модельного водоема»	35
Список использованных источников.....	41
Методические материалы для самостоятельной работы студентов	42
Рекомендуемая литература.....	46
План анализа научной статьи	48
Образец научного анализа статьи	49
Тестовые задания.....	55
Приложения	64

Учебное издание

Шеховцова Нина Валентиновна

ЭКОЛОГИЯ ВОДНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методические указания

Редактор, корректор И. В. Бунакова
Верстка Е. Л. Шелехова

Подписано в печать 24.01.11. Формат 60×84 ¹/₁₆.
Бум. офсетная. Гарнитура "Times New Roman".
Усл. печ. л. 4,88. Уч.-изд. л. 3,21.
Тираж 100 экз. Заказ

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе
Ярославского государственного университета
им. П. Г. Демидова.

Отпечатано на ризографе.

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова.
150000, Ярославль, ул. Советская, 14.

Н. В. Шеховцова

**Экология
водных
микроорганизмов**