

Департамент образования и науки города Севастополя
Государственное бюджетное образовательное учреждение
Центр дополнительного образования «Малая академия наук»
Центр выявления и поддержки одаренных детей
города Севастополя «Альтаир»

Направление: «Прикладная клеточная
биология, биотехнология генетика и селекция

**СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП
МИКРООРГАНИЗМОВ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ БУХТЫ
КРУГЛАЯ (СЕВАСТОПОЛЬ, ЧЁРНОЕ МОРЕ)**

Работу выполнила:

Мельник Илона Александровна,
учащаяся творческого объединения
«Микробиология» ГБОУ ЦДО «Малая
академия наук», ГБОУ СОШ №48,
10 класс;

Научный руководитель:

Дорошенко Юлия Валерьевна,
педагог дополнительного образования
ГБОУ ЦДО «Малая академия наук»,
старший научный сотрудник ФИЦ
ИнБИОМ, кандидат биологических наук

Севастополь
2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1. Методы изучения экологии микроорганизмов	5
1.2. Круговорот веществ в природе и участие в нём микроорганизмов	6
1.3. Микроорганизмы бухты Круглой	7
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	8
2.1. Материал для исследования	8
2.2. Оборудование	8
2.3. Постановка эксперимента	9
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	11
3.1. Экологическая характеристика района исследования	11
3.2. Выявление различных физиологических групп бактерий	11
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	15
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	16

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Выделение микроорганизмов из природных местообитаний и изучение их физиолого-биохимических особенностей, безусловно, относится к одному из важнейших методов микробной экологии. Однако давно установлено, что при посевах на питательные среды удаётся получить рост лишь очень незначительной части природной микробной популяции. По разным оценкам не более 0,1–10 % [7, 10]. Несмотря на то, что методы культивирования постоянно совершенствуются, информация, получаемая методами посева заведомо неполная. Это подтверждает сравнение результатов посева и данных, полученных с использованием методов ДНК диагностики.

Колонка Виноградского остаётся одним из важнейших инструментов в биотехнологии и микробиологии. Она является моделью, позволяющей представить взаиморасположение в водоёме разных групп микроорганизмов, прежде всего связанных с метаболизмом углерода и серы. Можно обозначить главные области применения, например – выведение новых популяций бактерий, изучение экосистем того или иного водоёма, а также изучение метаболического разнообразия микроорганизмов. Кроме того, с помощью колонки Виноградского можно выявить действие абиотических факторов на микроорганизмы [11].

Ввиду того, что бухта Круглая имеет высокую соэкологическую, эстетическую и природоохранную ценность, её изучению всегда уделялось особое внимание [6]. Кроме того, это популярное место отдыха для жителей и гостей г. Севастополя. Несмотря на то, что микробиологическая составляющая морской воды указанной акватории хорошо изучена [8], данные по аэробным и анаэробным группам бактериобентоса весьма ограничены. В этой связи выявление и изучение различных физиологических групп микроорганизмов бактериобентоса, участвующих в круговороте веществ в экосистеме б. Круглой, представляет бесспорный интерес.

Цель работы – с помощью колонки Виноградского выявить различные физиологические группы микроорганизмов донных отложений б. Круглая (Севастополь, Чёрное море).

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- Дать экологическую характеристику района исследования;
- Отобрать пробы воды и донных отложений для постановки колонки Виноградского;
- Выявить зоны, соответствующие экологическим нишам разных групп бактерий;
- Определить какие абиотические факторы влияют на развитие бактериальных сообществ в морской экосистеме.

Объект исследования – донные отложения.

Предмет исследования – отдельные физиологические группы морских бактерий.

Методы исследования – комплексные методы гидробиологии и морской микробиологии (для выделения из донных осадков различных физиологических групп морских бактерий).

Научная новизна полученных результатов. Получены качественно новые данные, касающиеся микроорганизмов Чёрного моря. Впервые выявлены фотогетеротрофы (несерные бактерии), пурпурные серные бактерии, зелёные серные бактерии и сульфатредуцирующие бактерии в составе аэробно-анаэробного бактериобентоса с помощью колонки Виноградского.

Практическое значение полученных результатов. Выявленные физиологические группы бактерий в донных отложениях бухты Круглой могут быть использованы для дальнейшего исследования, а также выделения отдельных видов, имеющих биотехнологическую ценность. Колонка Виноградского может использоваться в качестве объекта изучения на уроках биологии и внеурочной деятельности.

Связь работы с научными программами. Научная работа выполнена на базе лаборатории хемозкологии ФИЦ ИнБЮМ в рамках работы творческого объединения «Микробиология».

Личный вклад учащейся. Мельник Илона Александровна принимала непосредственное участие в разработке темы «Экология микроорганизмов донных отложений бухты Круглая (Севастополь, Чёрное море)»: подбирала литературу по выбранной теме, осваивала микробиологические и гидробиологические методики. Подготовка посуды и компонентов для колонки Виноградского проводилась учащейся самостоятельно по рекомендациям Дорошенко Ю. В. Наблюдения и фиксация на разных этапах развития колонки выполнены лично согласно инструкциям научного руководителя.

Структура и объём работы. Научная работа изложена на 16 страницах машинописного текста, состоит из введения, трёх разделов, заключения, списка использованных источников, который содержит 13 источников. Текст работы иллюстрирован 8 рисунками.

РАЗДЕЛ 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Методы изучения экологии микроорганизмов

Метод стекол обрастания. Микробиологом Николаем Григорьевичем Холодным (1882-1935) был разработан такой метод прямого микроскопического изучения почвенных микроорганизмов, как метод стекол обрастания. Суть метода заключается в микроскопическом изучении зафиксированных и окрашенных микробных обрастаний на предметных стеклах, инкубируемых в почве [7].

Постановка опыта в природных условиях происходит следующим образом: в исследуемой почве острым ножом делают вертикальный срез. В него вставляют стерильное предметное стекло, плотно прижимают к почве и оставляют на разные сроки – от нескольких дней до недель и месяцев. Во время инкубации стекло покрывается почвенным раствором и на его поверхности начинают размножаться различные микроорганизмы. При микроскопировании отмечают взаимное расположение микроорганизмов, плотность обрастания, доминирующие формы. Следует отметить, что метод стекол обрастания давно применяется и в водной микробиологии; в лимнологических исследованиях он был впервые применен гидробиологом Э. Науманном при изучении микроорганизмов ила. Метод пластин обрастания Н.Г. Холодного не позволяет проследить за жизнедеятельностью живых микроорганизмов, обитающих на их поверхности, поскольку наблюдения за ними производятся только после фиксации и окраски [5, 7]. Это можно отнести к недостаткам данного метода.

Метод Капилляров Перфильева. Микробиологом Борисом Васильевичем Перфильевым (1891-1969) был разработан метод, позволяющий выявить «микробный пейзаж» в природных субстратах. Учёный предложил использовать капилляры с плоскопараллельными стенками. Для наблюдения за развитием микроорганизмов в илах Б.В. Перфильевым были сконструированы специальные приборы, представляющие собой наборы нескольких плоских капилляров, закреплённых на стеклянной палочке или специальном держателе и были названы пелоскопы. Пелоскоп помещается вертикально в стакан, куда ранее внесён ил из водоёма. Иловый раствор проникает в капилляры и распределяется, образуя микрзоны с различными физико-химическими условиями, аналогично тому, как это имеет место в образце ила. Через некоторое время (от 2-3 дней до нескольких месяцев) капилляры извлекают из ила, тщательно протирают снаружи и микроскопируют, отмечая состав и характер распределения микроорганизмов. Использование пелоскопа позволило Перфильеву исследовать микрзональное строение ила и происходящие в нём процессы минералообразования, а также обнаружить и описать новые необычные микроорганизмы, которые не удавалось выделить на питательных средах [7].

Колонка Виноградского. Основоположниками экологической микробиологии по праву считаются С. Н. Виноградский и М. В. Беринг, разработавшие принципы

получения элективных культур. Виноградский впервые использовал градиенты света, сульфида и кислорода для изучения природных популяций сульфид окисляющих фотоавтотрофных бактерий, сульфатвосстанавливающих и хемоавтотрофных сульфид и серо окисляющих бактерий, одновременно присутствующих в одном местообитании и осуществляющих взаимозависимые процессы. Созданная модельная система получила название колонка Виноградского и была создана в 1880-х годах [10].

Колонка Виноградского, названная по имени крупнейшего русского ученого микробиолога Сергея Николаевича Виноградского, представляет собой один из способов получения накопительной культуры фотоавтотрофных бактерий. При постановке колонки Виноградского используют высокий цилиндр объёмом 500 мл, на дно которого помещают ил из исследуемого водоёма. Ил должен быть как можно более свежим, желателно отобрать его в день постановки колонки. В цилиндр также вносят немного CaSO_4 и небольшое количество органического вещества. Это может быть тонко нарезанная фильтровальная бумага, разлагающиеся растительные остатки и т. д. Затем цилиндр доверху наполняют водой и закрывают ватной пробкой или колпачком из фольги и помещают на свет. Полученную таким образом колонку выдерживают в течение 2-3 месяцев при комнатной температуре в условиях естественного освещения.

В разные периоды времени в различных зонах колонки создаются условия для развития многочисленных групп микроорганизмов, входящих в состав экосистемы водоёма (рис. 1.1). Полнота их учёта зависит от времени инкубации колонки и тщательности наблюдений.

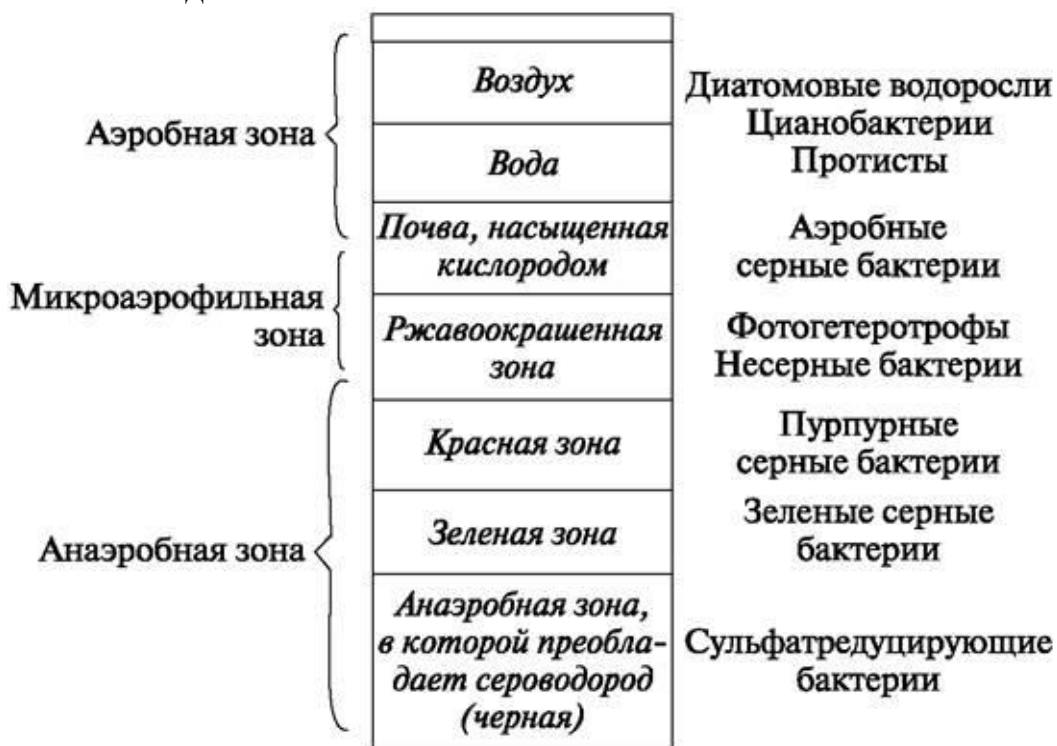


Рис. 1.1. Схема распределения различных групп микроорганизмов в колонке Виноградского [10]

1.2. Круговорот веществ в природе и участие в нём микроорганизмов

Жизнь на Земле возможна только при непрерывном разложении органического вещества, синтезированного растениями и животными. Эта грандиозная переработка всех отмерших остатков осуществляется микроорганизмами. В ходе своей жизнедеятельности они производят минерализацию органических веществ – белков, жиров, углеводов – с образованием в конечном итоге, углекислоты, воды, аммиака, нитратов, неорганических соединений серы и фосфора. Эти вещества вовлекаются в новый круговорот [3].

Такая работа возможна из-за широкого распространения микроорганизмов в природе, чрезвычайной быстротой размножения, широким разнообразием типов питания и ферментных систем.

Каждая физиологическая группа микробов разлагает определённые органические соединения, а так как различных групп много, то практически они разлагают любое органическое соединение. Однако редко наблюдается, чтобы микроорганизмы доводили процессы разложения сразу до конечных продуктов. Обычно работа распределяется между отдельными физиологическими группами бактерий, благодаря чему разложение разделяется на ряд последовательных этапов [7].

Все эти процессы могут совершаться только при определённых благоприятных условиях внешней среды: при достаточной температуре, влажности, реакции среды и т.д. [3, 7].

1.3. Микроорганизмы бухты Круглой

Поступающие в воду органические вещества служат пищей микроорганизмов, поэтому при обогащении воды этими веществами, наблюдается вспышка численности микрофлоры. Гетеротрофные бактерии являются одним из показателей эвтрофирования водоёма и позволяют оценить качество морской воды. Численность гетеротрофных бактерий, бактерий группы кишечной палочки, углеводородокисляющих и фенолоксиляющих бактерий характеризует степень антропогенного загрязнения морской среды [7].

По данным [8] наибольшая численность гетеротрофных и углеводородокисляющих бактерий отмечена летом и вначале осени, что автор связывает с оптимальной для роста бактерий температурой и повышенными концентрациями органического вещества. Наименьшая численность микроорганизмов наблюдалась в зимний период.

Также отмечается способность роста бактериопланктона на различных источниках углерода, таких как глюкоза, крахмал, жир, фенол, нефть. Это свидетельствует о наличии отмеченных компонентов в морской воде бухты Круглой.

Однако данные по анаэробному бактериобентосу весьма ограничены. Согласно [2], ранее исследовали распространение и численность сульфатредуцирующей группы бактерий в прибрежных наносах бухты Круглой (Севастополь, Чёрное море). Отмечена высокая вариабельность полученных данных: от 0,4 до $9,5 \cdot 10^3$ кл./г. Сезонные закономерности по численности бактерий не выявлены.

РАЗДЕЛ 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал для исследования

Пробы донных осадков и морской воды отбирались в осенний период времени (апрель 2024 г) в кутовой части б. Круглая (рис. 2.1).

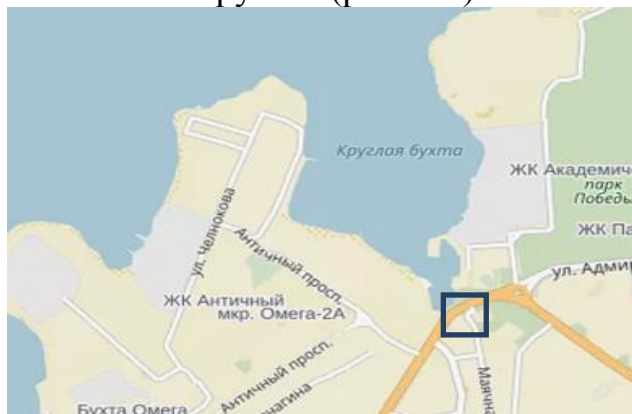


Рис 2.1. Карта отбора проб в Круглой бухте



Рис. 2.2. Мельник И.А. выполняет отбор донных отложений

2.2. Оборудование

Для постановки классической колонки Виноградского необходимо: стеклянные колонки (цилиндры) высотой не менее 30 см и диаметром 8 см (объем 500–1000 мл), ил из водоёма или грязь (250–500 г, в зависимости от объёма цилиндра), карбонат кальция (CaCO_3), сульфат кальция (CaSO_4), измельчённая газетная или фильтровальная бумага, миска или контейнер для ила, ложка или шпатель для перемешивания, дистиллированная вода, кусок алюминиевой фольги, пластиковая крышка или парафил, источник света (окно или лампа дневного света) [10].

Однако колонку Виноградского может сделать любой человек в домашних условиях, для этого вам понадобится любой сосуд 30 см длиной, более 5 см шириной, газета, песок/грязь/грунт из водоёма, желток и скорлупа яйца и вода из водоёма [13].

Для нашего эксперимента мы взяли (рис. 2.3):

- 3 бутылки без горлышка
- Газета
- Грунт из бухты Омега
- Желток от яйца
- Скорлупа яйца
- Вода из бухты Круглая (Омега)



Рис. 2.3. Материалы и оборудование для постановки колонки Виноградского

2.3. Постановка эксперимента

- Грунт перемешиваем с нарезанной на мелкие кусочки газетой (колонка №1)
- Добавляем перетёртую в мелкую крошку скорлупу яйца и желток (колонка №2 и №3).
- Полученной массой мы заполняем нижнюю треть тары (бутылка без горлышка). В колонке №3 грунт и вода в соотношении 50:50.
- Заливаем морской водой и заполняем ёмкость до верха, простукиваем ёмкость для того, чтобы вышел воздух
- Накрываем бутылку сверху пленкой для герметичного закрытия
- Выставляем колонку на свет и наблюдаем.

Полученные колонки имели вид, представленный на рис. 2.4.

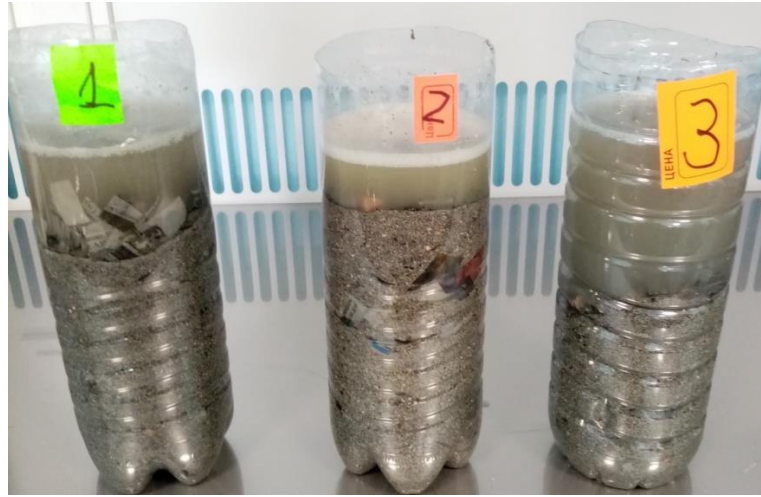


Рис. 2.4. Начало эксперимента

РАЗДЕЛ 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Экологическая характеристика района исследования

Бухта Круглая расположена на северной стороне Гераклеийского полуострова, являющегося оконечностью Юго-Западного Крыма, и представляет собой мелководную акваторию, вытянутую в направлении с юга на север и протяжённостью до 1 км. Это затопленная морем устьевая часть небольшой балки.

Площадь акватории – 0,64 км², её водосборная площадь – около 5 км². Длина – 1,3 км, максимальная ширина – 0,8 км, протяжённость береговой линии – 3,5 км. Средняя глубина не превышает 5 м, в вершине бухты глубина варьирует от 0,5 до 2 м [12].

На границе с открытым морем глубины достигают 15–16 м. Расположение акватории бухты Круглой и особенности режима её эксплуатации в качестве пляжной зоны и зоны отдыха населения создают высокую степень нагрузки на экосистему бухты.

Проведённые в бухте исследования указывают на высокий уровень видового богатства и количественного развития донной макрофауны бухты в условиях значительного антропогенного пресса. За период 1990, 2004 и 2013 годов было зарегистрировано 173 вида макробентосных животных, в том числе кольчатые черви – 67 видов, ракообразные – 50, моллюски – 43, мшанки – 4, стрекающие – 3, иглокожие – 2, хордовые – 1 вид. Также были зарегистрированы представители семейств хирономид (личинки), плоских червей и нематод [1].

Климат в районе исследований приморский, мягкий. В тёплое время года температура воды в вершине бухты выше по сравнению со средней её частью на 1,0–3,3°C, а в холодное, наоборот, ниже на 0,2–3,0°C. Основными источниками поступления пресных вод являются терригенные стоки и грунтовые воды, реже хозяйственно-бытовые стоки от коллектора насосной станции при аварийном сбросе.

Установлена высокая природоохранная ценность бухты, связанная с формированием крупных сезонных скоплений гидрофильных птиц, высокой степенью разнообразия биоты, наличием охраняемых видов и биотопов [4].

3.2. Выявление различных физиологических групп бактерий

Важнейшей закономерностью, которую можно выявить, наблюдая за развитием колонки Виноградского, является возникновение вертикального градиента окислительно-восстановительных условий (от анаэробных в нижней части к аэробным в верхней части) и создание многочисленных экологических ниш для разных групп бактерий. Колонка Виноградского имитирует события, происходящие в природном водоёме, и, как и в природной системе, многие параметры в ней являются неконтролируемыми, не зависящими от исследователя. Вместе с тем, меняя некоторые условия можно добиться преимущественного развития определённых групп микроорганизмов [9].

После герметичного закрытия колонки первыми начинают развиваться анаэробы, которые потребляют целлюлозу в качестве источника энергии. Цикл начинается, как только они будут производить углекислый газ, используемый другими представителями сообщества. Первые изменения в колонках мы обнаружили уже через 2 недели наблюдений. Они начала расслаиваться, изменяя цвет. В верхней части колонки появились зелёные и бордовые пятна.



Рис. 3.1. Колонки Виноградского через 2 недели

При инкубации колонок на подоконнике в течение нескольких месяцев в них сформировалось несколько градиентных уровней, в каждом из которых, развиваются и проживают целые популяции бактерий разных физиологических групп. Следует отметить, что температура и световые условия для всех колонок были одинаковые. По количеству питательных веществ есть отличия, которые не могли не сказаться на развитии бактерий. Отметим некоторые из них.

Колонка № 1

При постановке эксперимента в данную колонку мы добавили только источник целлюлозы (газета), но не добавили яйцо. Через 2 месяца наблюдений произошло активное развитие зелёной и красной зон – это свидетельствует о преобладании серных и пурпурных бактерий. Однако чёрная зона в колонке не сформировалась. Следовательно, у нас не развились сульфатредуцирующие бактерии, которые продуцируют сероводород (рис. 3.2 а).



Рис. 3.2. Колонки Виноградского через 2 месяца

Колонка № 2

В данной колонке присутствовали все необходимые питательные вещества источник серы, кальция и целлюлоза. Здесь активно развивается аэробная зона. Мы можем отчётливо видеть красную анаэробную зону, где развивается пурпурные серные бактерии и чёрная восстановительная зона, содержащая сероводород и бактерии, восстанавливающие соединение серы (рис. 3.2 б).

Колонка № 3

При постановке колонки 3 мы заложили грунт такого же состава, как и в колонке 2, но добавили больше воды. Поэтому колонки хоть и одинаковым составом, но развивались по-разному. В данной колонке мы видим, что преобладает зелёная зона – зелёные серные фотосинтезирующие бактерии. Также хорошо различима анаэробная зона, в которой преобладает сероводород (рис. 3.2 в).

Исходя из эксперимента, мы можем выявить 3 этапа развития колонки во времени: зелёная зона, красная зона и чёрная, которая появилась позже остальных.

Кроме того, на примере колонок № 2 и № 3, мы можем отметить, что пурпурные бактерии развиваются активнее с той стороны колонки, где градиент света больше (рис. 3.3).



Рис. 3.3. Пурпурные бактерии в колонках № 2 и №3

Исходя из результатов эксперимента, мы можем выявить положительные и отрицательные стороны использования колонки Виноградского.

Положительные:

- Возможность наблюдать за целыми сообществами бактерий. В колонке создаются вертикальные градиенты окислительно-восстановительных условий, которые способствуют росту разных групп микроорганизмов.

- Возможность дальнейшего определения и выделения основных физиологических групп бактериальных сообществ в образцах. Это важно в экологической микробиологии.

Отрицательные:

- Невозможность увидеть плотность или отдельные колонии бактерий.
- Длительное время для завершения цикла.
- Чувствительность к температурному режиму и свету.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе дана экологическая характеристика бухты Круглой и изучены аэробно-анаэробные группы бактериобентоса донных отложений. С помощью метода колонки Виноградского мы выявили зоны, соответствующие экологическим нишам разных групп бактерий, таких как фотогетеротрофы (несерные бактерии), пурпурные серные бактерии, зелёные серные бактерии и сульфатредуцирующие бактерии.

Исследование колонки Виноградского способствует выявлению факторов влияния внешней среды на популяции бактерий. В нашем случае отмечено, что сульфатредуцирующие бактерии не развиваются, если в состав колонки не входит источник серы. Кроме того, на развитие пурпурных бактерий влияет градиент света.

Использование колонки Виноградского на уроках биологии может привнести много нового и интересного в повседневный учебный процесс, делая его ещё более интересным и насыщенным.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Болтачева Н.А. и др. Донная фауна бухты Круглой (Чёрное море, Крым). Сообщение II. Таксономический состав и количественное развитие макрозообентоса рыхлых грунтов // Труды Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского – природного заповедника РАН. 2022. Т. 7, № 2 (22). – С. 3-22. <https://doi.org/10.21072/eco.2022.22.01>
2. Бурдиян Н. В. Сульфатредуцирующая группа бактерий в прибрежных наносах бухты Круглой (Севастополь, Чёрное море) // Экология моря. – 2007. – Т. 74. – С. 10-12.
3. Германов Н.И. Микробиология. Пособие для учителей. – М.: Просвещение, 1969. – 227 с.
4. Гиригосов В.Е. и др. Биологическое разнообразие бухты Круглой и перспективы создания орнитологического заказника (юго-западный Крым, Чёрное море) // Теоретическая и прикладная экология. 2023. № 3. С. 179-185. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2023-3-179-185>
5. Горбенко Ю. А. Экология морских микроорганизмов перифитона. – К.: Наукова думка, 1977. – 252 с.
6. Панкеева Т. В., Миронова Н. В. Пространственное распределение макрофитобентоса с учётом ландшафтной структуры дна в бухте Ласпи (Чёрное море) // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле. 2019. Т. 29, № 1. С. 111-123.
7. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений/ Под ред. А.И. Нетрусова. – М.:Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
8. Рубцова С.И. Гетеротрофные бактерии – показатели загрязнения и самоочищения морской среды // Экология моря, 2002. – вып. 62. – с. 81-85.
9. Сазонов Д.Д., Дружбин А.Н. Изучение воздействия абиотических факторов на микроорганизмы с использованием колонки С.Н. Виноградского // Вестник магистратуры. 2018. № 4-1(79). – С. 10-13.
10. Экологическая микробиология : учеб.-метод. пособие / М. И. Чернявская [и др.]. – Минск : БГУ, 2016. – 63 с.
11. Lalla C., Calvaruso R., Dick S., Reyes-Prieto A. Winogradsky columns as a strategy to study typically rare microbial eukaryotes // Eur. J. Protistol., 2021 – 80:125807. doi: 10.1016/j.ejor.2021.125807. [Электронный ресурс] – Режим доступа <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34091379/>
12. [Электронный ресурс] Режим доступа <http://envjournal.ru/ari/v2023/v3/23319.pdf>
13. [Электронный ресурс] Режим доступа <https://www.instructables.com/Winogradsky-Columns/>