Астраханский государственный технический университет

Кафедра Прикладной

биологии и микробиологии

Курсовая работа по промышленной микробиологии

на тему:

«Выделение споровых микроорганизмов грунта пещеры Баскунчакская (Астраханской области)»

Астрахань 2007

**Введение**

Пещеры представляют собой элементы неживой природы, специфический подземный ландшафт, который существовал задолго до человека и имеет право на существование в настоящем как компонент ландшафтной оболочки планеты. Это среда обитания специфической фауны, часть из которой живет в них постоянно (троглобионты), а часть временно (троглофилы). Из-за стабильности климатических условий, сохраняющихся в полостях в течение длительного времени, среди пещерной фауны много эндемичных видов (http://www.ecocave.ru).

Пещеры являются геологическими памятниками природы; в которых можно изучать естественные обнажения горных пород, отбирать образцы для геологических, инженерно-геологических и геофизических исследований, прослеживать внутреннюю структуру залегания горных пород, их изменчивость, тектонические нарушения, ископаемую фауну и др. В пещерах открыт естественный доступ к водоносному горизонту, областям формирования и питания источников, питьевых и промышленных вод, существует возможность изучения формирования химического состава подземных вод. Пещеры имеют палеогеографическое значение: в них сохраняются следы давно минувших эпох, которые, как правило, уничтожены на поверхности земли; на основании изучения рыхлых отложений пещер, их строения и ледяных образований в них можно судить об истории развития не только пещеры, но и окружающей её местности. Многие пещеры имеют реакрационное значение и используются в качестве туристических объектов

На территории Астраханской области, в районе озера Баскунчак, находятся около 25 пещер карстового происхождения. Самая крупная и наиболее посещаемая из них, это пещера Баскунчакская (http:// www.ecocave.ru).

Поэтому целью работы стало исследование микробиологического пейзажа грунта пещеры Баскунчакская, для изучение рекреационного влияния, оказываемого на нее, как на объект туристического значения. Для осуществления целей исследования были поставлены следующие задачи:

1. определение численности и видового состава сапрофитной микрофлоры грунта пещеры Баскунчакская;

2. Определение санитарного состояния грунта пещеры Баскунчакская (на основе определения БГКП)

**Глава 1 Литературный обзор**

**1.1 Пещера Баскунчакская как объект различного рода исследований**

Пещера Баскунчакская - крупнейшая гипсовая пещера Прикаспийской карстовой области. Пещера горизонтального типа, имеет протяженность- 1480 м, максимальная глубина - около 32 м. Пещера известна и посещаема людьми более ста лет. Одна из надписей на стене привходовой части пещеры датирована 1874 г. Первые опубликованные исследования относятся, видимо, к 1947 г. По его данным, длина пещеры Большой Баскунчакской составляла 350 м (Белононич, Цой , 1998).

История современных исследований пещеры с 1979 г связана в основном с деятельностью Саратовской спелеологической секции. Секция спелеологов в саратовском университете была образована в декабре 1978 г. по инициативе студентки Сосновской Р.Л. и свои первые серьезные исследования начала в Баскунчакской пещере осенью 1979 г. В дальнейшем на протяжении почти двух десятков лет пещера является одним из основных исследовательских и учебно-тренировочных полигонов, любимой пещерой для всех поколений саратовских спелеологов. При всем многообразии широте научных исследований, спортивных, экскурсионных экспедиций, слетов и соревнований, проведенных здесь спелеологами Саратова и других городов Поволжья, эта пещера является слабо изученной объектом. С 1979 по 1998 г. саратовские спелеологи посещали пещеру Баскунчакскую более 30 раз (Белононич, Цой , 1998).

Для подтверждения наличия подземного хода, соединяющего оба сифона, в 1983 г. на поверхности были проведены геофизические исследования. Использовался метод вертикального электрического зондирования по нескольким профилям. Интерпретация геофизических данных позволяет предположить наличие искомого непройденного хода, вероятно, залитого водой (Белононич, Цой , 1998).

Несмотря на ариадность климата Прикаспия (200-300 мм осадков в год), в некоторые годы при резком снеготаянии в пещере возможны мощные паводки. Продолжительность их не более 2-3 дней в году и поэтому наблюдать паводок в Баскунчакской пещере непросто. Для установления высоты подъема пещерных вод проводился специальный эксперимент: в тальвеги запускались мелкие пенопластовые шарики, которые после спада поводковых вод частично оставались на стенах и потолке, указывая уровень стояния воды. В марте 1994 г. одному из авторов удалось наблюдать такой паводок. При резком снеготаяние многие воронки в верховьях Пещерной балки превратились поглощающие водяные потоки поноры, а во вход №2 втекал мощный ручей из тальвеги балки. В пещере с потолка в некоторых местах низвергались водопады, а многие пониженные участки, особенно дальняя часть Основной Галереи, были полностью затоплены (Белононич, Цой , 1998).

В пещере также проводились микроклиматические исследования, которые включали в себя наблюдения за температурой воздуха в Основной Галерее и вдоль тальвега лабиринтовой части пещеры. Наблюдения проводились круглосуточно с интервалом между замерами в 3-4 часа в течение 1-2 суток в разные месяцы 1979-1981 гг.: в октябре, ноябре, феврале, марте и мае. Целью наблюдений было не только получение характерных и экстремальных значений метеопораметров, но и режимные исследования температуры воздуха: суточный и сезонный ход температуры в зависимости от удаленности от входа; вертикальные градиентные измерения (Белононич, Цой , 1998).

Температура почвы (аллювиальных отложений) в пещере в целом отличается от температуры воздуха не более чем на 0,2-0,5 ◦C. Влажность воздуха меняется в зависимости от внешних условий лишь до 50-60 м от входа, далее ее значения близки к 100% (97-98%) (Белононич, Цой , 1998).

В Баскунчакской пещере неоднократно проводились целенаправленные поиски спелеофауны, в результате которых пещерных обитателей (троглобионтов) обнаружено не было. Однако в пещере встречаются случайно попавшие или временно живущие под землей (троглоксены и троглофилы) виды животных (Белононич, Цой , 1998).

Постоянной колонии летучих мышей в пещере нет, однако она может использоваться как временное убежище при миграциях этих животных. Была поймана одна летучая мышь (рыжая вечерница).

Часто в Основной Галерее встречаются желтобрюхие полозы. Данный вид полоза широко распространен в окрестностях пещеры и большей частью, видимо, в пещеру случайно (Белононич, Цой , 1998).

Довольно многочисленны в пещере Баскунчакской грызуны подсемейства Хомяковых. Один экземпляр большой песчанки был выловлен живоловкой. Проникновение их в глубь пещеры, видимо, объясняется появляющимися на месте подземного спелеолагеря отбросами (Белононич, Цой , 1998).

Иногда встречаются различные беспозвоночные (пауки, многоножки, мокрицы), то есть виды, приспособленные к обитанию во влажной и прохладной среде. Растения представлены мхами и лишайниками в привходовой части пещеры (Белононич, Цой , 1998).

Микробиологических исследований в пещере Баскунчакская не проводилось. Однако подобного рода исследования проводились в пещере Мраморная, в пещере Большая Орешная и в Воронцовской системе пещер.

**1.2 Исследования карстовых пещер по микробиологическим показателям**

Пещера Мраморная расположена в приброочной части северо-западного замыкания плато Чатыр-Даг. Обнаружена Симферопольскими спелеологами в 1987 году (http:⁄⁄ www.ecocave.ru).

С целью оценки микробиологической обстановки пещеры Мраморная проводились определения качественного и количественного состава микрофлоры грунта и воздуха. Отбор производился в пяти стационарных точках, расположенных в пределах Галереи сказок. Кроме упомянутых точек пробы отбирались: в нижнем этаже и в Люстровом зале. В этих двух точках отбирались только пробы грунта. Отбор проб, анализ и обработка полученных материалов производились сотрудниками ИМР АН Украины.

 Отбор проб грунта осуществлялся по общепринятой методике, в стерильные мешочки. После доставки проб в лабораторию определялись влажность образцов, готовилась серия последовательных разведений из проб грунта и осуществлялся посев известным образом, контроль за микробиологической обстановкой проводился в элективных средах:

1. Эшби - для выделения азотфиксирующих микроорганизмов;

2. МПА - для выделения гетеротрофов, развивающихся на органическом субстрате;

 3. Чапека - для выделения микроскопических грибов;

 4. Среда Тамия - для выделения микроводорослей.

 Кроме исследований в упомянутых точках, были исследованы образцы микрофлоры, отобранные на сталактитах, и грунте в Люстровом зале Пятна плесени на месте подземного лагеря были обнаружены здесь визуально при исследовании пещеры 16 июля 1990 года

 При первых двух отборах среди изучаемых групп микроорганизмов наиболее представительными были гетеротрофные бактерии и актиномицеты. В числе гетеротрофов доминируют бациллы: Bac.megaterium, Bac.suрtiles, Bac.mesentericus.

Микроскопические грибы практически отсутствовали в грунте пещеры и были немногочисленны в воздухе. Микрофлора, выделявшаяся на среде Тамия, была представлена, в основном, автотрофными микроорганизмами (растущими на минеральном субстрате). Микроводоросли на период 06.04.-16.07.90г. обнаружены не были. Численность микроорганизмов в указанный период была на 1-2 порядка выше в грунтах, чем в воздухе

 Результаты третьего обследования, 20.09.90 г. показали: тенденция к нарастанию микроорганизмов по исследуемым группам микрофлоры сохранилась. Особенно возросла численность грибов и гетеротрофных микроорганизмов, плотность которых отмечалась на площадке у входа. По - видимому, эта закономерность является результатом эксплуатации пещеры в качестве экскурсионного объекта.

Недавние исследования, проведенные в Туркменистане и южных районах США, показали, что неконтролируемое посещение пещер приводит к накоплению в них опасных для человека бактерий, в первую очередь - возбудителей кишечных и легочных инфекций. В пещерах Средней Азии, кроме этого, обнаружены патогенные грибы р.р. Penicillium, Aspergillus, Nannizzia. Несмотря на то, что в Красноярском крае имеются десятки активно посещаемых пещер, микробиологический мониторинг в них полностью отсутствует.

 Для выделения бактерий и грибов, представляющих естественную микрофлору пещеры, использовали среды МПА и модифицированную среду Чапека. Культивирование осуществляли при температуре +3 °С, что соответствует естественным условиям пещеры и предотвращает рост мезофильных микроорганизмов, случайно занесенных с поверхности. Учет численности микроорганизмов и описание колоний проводили через 3-4 недели культивирования (http:⁄⁄ www.ecocave.ru).

Для учета санитарно-показательных микроорганизмов (бактерии группы кишечной палочки) использовали среду Эндо, учет результатов проводили через 2 суток культивирования при температуре +37°С. Учитывали окрашенные в красный цвет колонии, состоящие из грам-отрицательных, оксидазоотрицательных палочек (http:⁄⁄ www.ecocave.ru).

Проведенные нами исследования показали, что в пещере Большая Орешная присутствуют, по крайней мере, три различные группы микроорганизмов(http:⁄⁄ www.ecocave.ru).

Первая группа - это психрофильные бактерии, являющиеся естественными обитателями пещеры. Их численность варьирует в пределах 104 - 106 микробных клеток на 1 г грунта в зависимости от места взятия образца. Среди бактерий данной группы отмечены представители р. Arthrobacter, Pseudomonas и др. Очевидно, данные бактерии безопасны для человека в силу неспособности к росту при температуре человеческого тела, однако представляют несомненный научный интерес (http:⁄⁄ www.ecocave.ru).

Вторая группа - это мезофильные бактерии, особенно многочисленные в активно посещаемых участках пещеры. Численность мезофильных бактерий в некоторых пробах воды составила до 105 микробных клеток на 1 мл. Следует предположить, что бактерии данной группы занесены с поверхности человеком. Особое беспокойство вызывает обнаружение в пробах грунта и воды бактерий группы кишечной палочки в количествах, в десятки и сотни тысяч раз превышающих санитарные показатели. Это свидетельствует об исключительно высоком уровне фекального загрязнения пещеры и как следствие - о непригодности многих источников воды для питья.

Третья группа выявленных в пещерах микроорганизмов представлена плесневыми грибами р. Penicillium, Mucor и др. Данные микроорганизмы в значительном количестве (104 - 105 клеток/гм грунта) присутствуют в гротах с высоким уровнем антропогенного загрязнения. В остальных участках пещеры грибы обнаруживаются в виде единичных колоний размером от нескольких мм до десятков см преимущественно на высокомолекулярных субстратах. Учитывая, что среди представителей выявленных родов встречаются возбудители микозов человека, высокая концентрация плесневых грибов вблизи подземных стоянок спелеотуристов может представлять реальную опасность. Таким образом, по крайней мере, две группы микроорганизмов, обнаруженных в пещере Большая Орешная, могут представлять угрозу для здоровья посетителей пещеры (http:⁄⁄ www.ecocave.ry).

Воронцовская система пещер, расположена на территории Сочинского национального парка, ее официальное экскурсионное освоение начато с 2000 года ООО "Воронцовские пещеры". Этот район всегда активно посещался спелеотуристами, с некоторой неравномерностью в течение года. Пик посещений приходился на новогодние праздники и зимние студенческие каникулы, майские праздники, а также летние месяцы, т. е. периоды традиционных спелеовыездов. После того, как была проложена асфальтовая дорога и оборудованы пещеры, район стал более доступным, что привело к увеличению количества туристов. Особенно велика антропогенная нагрузка в летние месяцы. В течение многих лет исследованием Воронцовского карстового участка занималась секция спелеологии Санкт-Петербургского горного института. Ими проводилась гидрогеологическая и гидрохимическая съемка района (Ю. С. Ляхницкий, 2003 г; "Карст и пещеры Кавказа"), однако микробиологическое загрязнение не учитывалось.

Во время проведения спелеоклубом МГУ спелеошколы была начата работа по оценке антропогенного влияния на Воронцовскую систему пещер. С целью предварительной оценки микробиологического состояния пещеры было проведено определение количественного и качественного состава микрофлоры воды в пещерах и на поверхности. Точки отбора проб выбирали таким образом, чтобы охватить как активно посещаемые, так и труднодоступные участки пещеры, а также с учетом общего водотока района и возможных поверхностных источников загрязнений.

Помимо источников на поверхности были взяты пробы из грота Прометей, Грота Пантеон, Грота Очажный, Хода Жилина, Разгрузочного района, Обвального зала из Главной галереи, пещер Долгой и Кабаний провал.

Были выбраны стандартные критерии оценки: общее количество бактериальных клеток и количество клеток бактерий группы кишечной палочки в единице объема воды; а также состав мезофильной флоры.

Определение общего числа клеток проводили методом прямого подсчета клеток в окрашенных мазках.

Наличие и численность бактерий группы кишечной палочки определяли методом высева на чашки со средой MacConkey s agar при температуре 36 С.

Количественную обработку данных проводили с использованием статистики Пуассона.

Качественный анализ проводили, высаживая, бактерии на селективные среды при температуре 25-36С с целью определения видов, находящихся в состоянии покоя, но представляющих потенциальную опасность для человека. В результате определен следующий состав мезофильных микрорганизмов: Streptomyces; Pseudonocardia; Nocardioides; Acinetobacter; Pseudomonas; Arthrobacter; Bacillus.

Количество бактерий группы кишечной палочки в разных пробах колеблется от 0.1 до 4 клеток на мл, что превышает допустимые нормы для питьевой воды (на 1 литр 3 шт. - 0.003 на 1 мл), но не превышает нормы для технической воды (5000 на 1 литр - 5 на мл). Общее содержание бактерий для питьевой воды в норме 100 на 1 мл, в Воронцовской системе пещере этот показатель превышен в среднем в 3-4 раза. Можно говорить об общем загрязнении водотока района. Для определения источников загрязнения планируется провести учет туристических стоянок и прочих возможных источников загрязнения на поверхности, а также повторные микробиологические исследования. Особое внимание было уделено состоянию оборудованной части пещеры, это участок от грота Прометей до грота Пантеон.

В местах нахождения ламп на известняке образовались сизые пятна грибов, растущих по стенам, размеры пятен достигают полуметра, особенно сильно они развиваются если лампы установлены в нишах, за выступами породы, где плохая вентиляция. Грибы определены как представители рода Penicillium. Также под лампами обнаруживается так называемая "ламповая флора", в состав которой входят сине-зеленые, диатомовые водоросли и даже мхи.

В условиях карстового ландшафта существуют потоки вещества и энергии между наземными элементами ландшафта и глубинным карстом. Несмотря на это, пещерные местообитания характеризуются рядом специфических условий, существование которых должно приводить к изменениям характеристик экологической целесообразности жизнедеятельности организмов.

Прежде чем приступить к анализу экологических условий пещерных местообитаний, мы задали себе вопрос о путях возможной эволюции в пещерах. С одной стороны, это может быть "эволюция смерти", когда происходит выживание организмов, обладающих максимальной резистентностью, а структура сообществ при этом деградирует. С другой стороны, это может быть "эволюция жизни", когда происходят последовательные изменения, приводящие к формированию адаптированных видов, не похожих на наземные аналоги.

В первом случае таксономический набор пещерных видов не будет сильно отличаться от характерной зональной флоры и фауны. Второй случай реализуется, если под землей содержатся нетривиальные источники энергии, или экстремальные местообитания, или, если карст прошел длительную эволюцию, на последних стадиях которой связи с дневной поверхностью были ослаблены. Все три варианта имеют место, например, в реликтовых полостях на большой глубине в аридных регионах.

Переходя теперь конкретно к пещерам Пинеги, попробуем сформулировать: какие же именно факторы составляют специфичность пещерных местообитаний.

Во-первых, следует рассмотреть степень олиготрофности. Мы полагаем, что, несмотря на кажущуюся обедненность органическим веществом, пещеры Пинеги нельзя считать экстремально олиготрофными ландшафтами. Неглубокое залегание, сопровождающееся инфильтрацией, и ежегодное промывание паводками, говорит о том, что в пещеру постоянно попадают не только растворенные органические вещества, но целые фрагменты почвенных подстилок, а водотоки и паводки приносят живые организмы. То есть даже намытые паводковые глины содержат растворенную органику достаточную для поддержания микробных сообществ, сходных с сообществами минеральных горизонтов некоторых почв на поверхности. Что касается постоянного приноса высших организмов, то: в сифоне, соединяющем пещеры Китеж (Г-140) и Голубинский провал в зимнее время мы обнаруживали бокоплавов, характерных для большинства озер Беломорско-Кулойского плато, а в ручье пещеры Голубинский провал, опять же в зимнее время, были пойманы две лягушки.

Следующий фактор - гипсовая минерализация растворов. Было бы логично предположить, что она в первую очередь должна влиять на бактерий, так как клеточная мембрана при отсутствии ригидной клеточной стенки должна наиболее чувствительно реагировать на изменение осмотического давления. Однако, специальные эксперименты по выращиванию штаммов бактерий на среде с концентрацией сульфата близкой к предельному насыщению продемонстрировали, что гипс не оказывает существенного влияния на большинство компонентов микробного комплекса. Несколько снижается доля миксобактерий и скользящих бактерий, за счет которых увеличивается доля корне-подобных бактерий и актиномицет. При этом кардинальной перестройки сообщества не наблюдается. Позволим себе сделать предположение, что гипс ингибирует бактерий, образующих внеклеточную слизь, таких как миксобактерии и цитофаги.

Еще один возможный фактор, который, к сожалению, пока не поддается нашей оценке, - цикличность природных событий. Речь идет о многообразии циклов, происходящих на поверхности, таких как суточные, сезонные и годовые изменения. Безусловно, косвенным образом это отражается и на пещерах. Например, ежегодный весенний паводок играет роль "листопада" в пещерах, принося новые порции органического вещества, а зимой температура снижается на несколько градусов из-за того, что теплый воздух поднимается вверх, а холодный заходит через нижние входы. Однако, весьма вероятно, что непременным атрибутом функционирования наземных сообществ является ежегодное зимнее промерзание, во время которого реализуются фазы инициации следующего цикла живых организмов. Кроме того, не совсем ясно влияние проникающей солнечной радиации. Есть мнение, что это именно тот фактор, который влияет на синхронизацию многих далеких друг от друга биологических процессов. Очевидно, что в пещерах влияние солнечной активности сказывается в меньшей степени и преимущественно косвенным путем.

И, наконец, фактор, который мы признаем наиболее важным с точки зрения экологии пещерных местообитаний в районе Пинеги, - это температура. Все, без исключения, полученные нами данные говорят о том, что температура - лимитирующий фактор для биологических процессов в пещерах. Рассмотрим это на нескольких характерных примерах.

Пример первый - сульфатредуцирующие бактерии. Эти бактерии весьма распространены во всех озерах и болотах с гипсовой минерализацией. Доминирующим видом для Пинежского района мы считаем вид - Desulfotomaculum acetooxidans, выделенный из черных илов озера Ераськино и болот в районе пещеры Г-1. С того момента, как мы начали изучение пещерной микрофлоры, нам было не совсем понятно, почему в пещерных водоемах, где есть избыток сульфата и достаточное количество растворенной органики, необходимой для жизнедеятельности этих бактерий, бактериальной сульфатредукции не наблюдается. Однако посещение пещеры Пехоровский Провал в 1996 и 1997 годах позволило разрешить эту загадку. Следует отметить, что микроклимат ряда пещер Пинеги зависит от количества поступающей в них воды. По словам Е.В.Шавриной пещеры Пинеги - с "водяным отоплением". То есть во влажный год, когда под землю поступает большое количество теплой воды с поверхности, температура под землей на несколько градусов выше, чем в сухой год. Именно такую картину мы и наблюдали в пещере Пехоровский провал. Во влажном 1996 году температура воздуха в пещере колебалась между 7 и 10 0С, а температура воды была около 12 0С. Когда в июле мы спустились в пещеру, и прошли вдоль магистрального ручья, то почувствовали явственный запах сероводорода. Раскопав в нескольких местах глину на дне ручья, мы обнаружили характерные черные илы. Когда же мы посетили пещеру в более сухой 1997 год, то ни малейших следов сульфатредукции не обнаружили. При этом температура воздуха в пещере оказалось в районе 5-6 0С, а температура воды 6-7 0С. Впоследствии мы наблюдали за началом процессов сульфатредукции в начале мая в болоте на поверхности, и пришли к выводу о существовании лимитирующей температуры, ниже которой бактерии не развиваются. По "болотным" наблюдениям, она оказалась в районе 70С, но, по-видимому, эти данные несколько занижены.

Следующий пример связан с разрушением растительных остатков сообществами грибов. Мы поставили простейший эксперимент, заключающийся в том, что бумажные фильтры помещались в чашки с образцами почвенной подстилки, из наземной почвы и из пещеры. Чашки инкубировались при разных температурах, имитирующих "теплые - наземные" и "холодные - пещерные" условия. По мере разрушения бумажных фильтров делались посевы на питательные среды для определения доминирующих видов грибов. И что же оказалось: несмотря на то, что почвенные и пещерные образцы содержат примерно одинаковый видовой состав грибов, часть грибов сохраняют жизнеспособность, но не вегетируют в холодных условиях пещер. Если в "теплых" условиях на первых стадиях сукцессии доминируют грибы Aspergilus niger и Pinicillium hirsutum, то в "холодных" условиях предпочтение получают виды Penicillium expansum и Penicillium auranthiogriseum. То есть под влиянием температуры из равных исходных условий формируются сообщества с различными преобладающими организмами. Пожалуй, наиболее "пещерным" видом грибов по данным, имеющимся у нас на настоящий момент, можно считать вид Penicillium viridicatum, который растет при достаточно низких температурах и даже формирует на глине микроколонии, похожие на выцветы гипса. Если в предсифонной части пещеры Голубинский Провал приглядеться к мелким белым пятнышкам на паводковой глине или провести по ним пальцем, а потом понюхать, то станет понятно, что эти пятнышки не что иное как микроколонии грибов. Но опять же мы называет этот вид "пещерным" не потому, что он не встречается на поверхности, а потому, что его доля в пещерных местообитаниях существенно возрастает.

Однако, в качестве специфики пещерных биоценозов нами обраружена холодовая адаптация у некоторых бактерий (акваспириллы и артробактеры). Эксперименты продемонстрировали, что популяции бактерий, набравшие биомассу при более низких относительно контроля температурах, приобретают способность вегетировать в более холодных условиях. То есть нижний предел их температурного интервала сдвигается в область более низких температур. При этом "закаливание" штаммов (то есть помещение культур в холодные условия на некоторое время) не влияет на их температурный интервал.

Пещера Яхалом была обнаружена в мае 2006 года, в зоне, предназначенной под расширение меловых карьеров. По чистой случайности на неё обратил внимание геолог, исследовавший грунтовые воды. Ничем не примечательная дырка в склоне горы, показалась ему не глубже 8 метров. Он рассказал о ней Малхаму, организации занимающейся исследованием пещер на территории Израиля. Пещера оказалась сюрпризом по своим масштабам и фауне. На сегодняшний день в ней картографировано 2.5 километра меловых ходов, найдено подземное озеро и обнаружена редчайшая микрофлора и фауна.

У Яхалома, есть две скверные особенности:

Первая - стены пещеры как снегом, покрыты белой пудрой. Пудра образуется из-за постоянной повышенной влажности и работы бактерий. В начале, её даже хотели назвать “Снежной”. Эта славная пудра проникает везде, как только ты попадаешь в пещеру.

Вторая особенность - это огромная влажность. В сочетании они образуют на теле грязевую маску. Но об этом всём удаётся забыть, когда попадаешь в главный зал и видишь прозрачную гладь подземного озера. Когда мы вышли в центральный зал, там уже работало несколько биологов. Озеро оказалось обитаемым, и в нём были обнаружены редчайшие разновидности подземных раков. Сейчас их пытаются идентифицировать и понять, являются ли они совершенно новым видом, или, возможно, это одно из трех мест в мире, где была обнаружена подобная разновидность. Раки живут в полной изоляции от внешней среды. Кормом для них служат хемотрофные бактерии. Те, в свою очередь, живут благодаря химическому синтезу диоксида углерода. Бактерии образуют тонкие пластинки на поверхности воды. По этим пластинкам можно судить об уровне подземных вод в последние десятилетия. Чрезмерное использование грунтовых вод сильно понизило уровень воды в пещере. Чётко виден уровень богатого осадками 91 года, когда вода была на 6 метров выше сегодняшнего. Ещё одна интересная особенность озера - это его высокая температура, видимо, озеро подпитывается из горячего источника.

 Обследование состояния Каповой пещеры и ее рисунков. Поверхностный геоморфологический маршрут и осмотр пещеры "Ташкелят": сбор информации о периферической зоне спелеосистемы. Гидрологические исследования: выявление сдвигов в гидрологическом режиме с 1983 г. Определение содержания тяжелых металлов в воде Голубого грота Каповой Микробиологические исследования: рекогносцировочная оценка антропогенного микробиологического загрязнения пещеры.

Материал и методы. Анализ проб воды Голубого грота Каповой пещеры проводился в лаборатории ВСЕГЕИ на содержание кадмия, цинка, свинца, меди. Микробиологические исследования образцов грунта, древесных остатков, минеральных натеков и воды: обсемененность образцов сапрофитными гетеротрофными микроорганизмами, растущими на богатой питательной среде, микрофлорой, выявляемой в обедненной среде Горбенко и среде на основе экстрактов исследуемого субстрата. Определялась обсемененность бактериями, растущими на среде Эндо, применяемой для энтеробактерий. Для выявления плесневых грибов, дрожжей и актиномицетов использовались соответствующие селективные питательные среды.

Результаты. Проведен микробиологический анализ 6 образцов грунта, 2 - древесных остатков, 1 - минеральных натеков и 1 - воды. Выявлена обсемененность грунта сапрофитными гетеротрофами. Микрофлора, не выявляемая на традиционной питательной среде, специфическая, по-видимому, истинно аутохтонная. Энтеробактерии отсутствовали во всех образцах, кроме грунта из "Зала Рисунков", что свидетельствует об отсутствии заметного антропогенного загрязнения. В трех пробах обнаружены микромицеты, плесневые грибы. Дрожжеподобные грибы выделены из образцов древесных остатков из "Зала Хаоса". Микробиологический мониторинг спелеосистемы необходим в силу лабильности ее экологического равновесия, которое может быть нарушено в случае массового проникновения посторонней микрофлоры, биогенных элементов и других экологически активных антропогенных факторов.

**1.3 Факторы уязвимости пещер**

Особенностью пещер является длительное время их образования (от тысяч до миллионов лет); они имеют разное происхождение, неодинаковую морфологию и характеризуются относительно стабильным режимом климатических параметров, устойчивостью происходящих в них процессов. В тоже время многие компоненты пещер отличаются повышенной ранимостью, у них почти полностью отсутствует способность восстанавливаться после интенсивного антропогенного воздействия (нагрузок). К сожалению, пещеры, в силу своей таинственности, необычности и слабой изученности являются местом постоянного паломничества разных слоев населения (чаще молодёжи). Повышает интерес к пещерам и широкая реклама наиболее посещаемых экскурсионных пещер. Неуправляемый поток посетителей и "исследователей", не вооруженных знаниями об особенностях и ценности пещер, не владеющих методами их научного изучения, способен вызвать гораздо большие изменения климата пещер, строения её элементов, изменение состава флоры и фауны, чем значительные природные катаклизмы на поверхности земли (такие, например, как четвертичное оледенение). При нерегулируемом посещении это воздействие особенно усугубляется в связи с ограниченными объемами пещер, как правило, однозначными маршрутами движения групп, постоянными местами отдыха, навески снаряжения, разбивки подземных бивуаков, приготовления пищи, складирования отбросов, отправления естественных надобностей. Результатом таких посещений является неизбежное нарушение эстетического состояния пещер и подземных ландшафтов, скопления отбросов и нечистот, закопчённые стены и потолки, задымление галерей, скопление экологически вредных веществ из оставленных сухих электрических элементов, отработанного карбида кальция (используется для заправки ацетиленовых фонарей), продуктов сгорания топлива и нефтепродуктов, затаптывание и захватывание натечных и кристаллических образований, выламывание их, т.е. совокупное биологическое, вещественное, химическое, эстетическое и климатическое загрязнение полостей. Следует особо подчеркнуть, что микрофлора и бактерии в пещерах развиты незначительно (по сравнению с внешними условиями) и приспособлены к практически стабильному климатическому режиму в мало изменяющихся фоновых гидрологических и гидрохимических условиях. Вследствие этого они не способны быстро видоизменяться и приспосабливаться к резкому изменению условий, не в состоянии перерабатывать большое количество привнесенной извне органики и минеральных веществ (часто для них непривычных), не имеют развитых защитных функций и потому не могут очищать окружающую среду пещер при загрязнении воды и отложений и выживать при конкурирующем размножении на отбросах поверхностных видов микроорганизмов. В результате, они вымирают при энергичном размножении поверхностных микроорганизмов и грибов. Пещеры имеют относительно стабильный режим протекающих в них процессов и кажутся хорошо изолированными от внешних воздействий. Тем не менее они достаточно хорошо связаны с поверхностью посредством множества трещин, пронизывающих карстовый массив, и узких ходов и каналов, функции которых (проводники воды, воздуха, снега и др.) из-за меняющихся условий на поверхности (вырубка леса, распашка территории, выпас скота, откачка воды из скважин, строительство плотин на внешних водотоках, разработка карьеров и др.) могут нарушаться. Это неизбежно приводит к изменению ранее установившихся равновесных условий в пещерах. Изменяются условия протекания различных процессов, режим обводнённости полостей, климат, условия обитания фауны и флоры, роста минеральных агрегатов, заполнения пещер отложениями и т.д. Потому в общем случае охранная зона пещер должна включать не только входное отверстие полости, но также по меньшей мере всю ту территорию над пещерой, которая оконтуривается сглаженной охватывающей линией с учетом всех выступающих частей на плане пещеры (или группы пещер). При оконтуривании пещер с подземными водотоками необходимо в охраняемую часть включать области питания этих водотоков (что, к сожалению, далеко не всегда возможно). Охраняемая зона является индивидуальной для разных видов и типов пещер и разрабатывается специалистами для каждого конкретного случая.

Кроме высокой чувствительности к изменению внешней среды, а также легкой ранимости и уязвимости пещер при вмешательстве человека в их внутреннюю среду отмечается и слабая способность пещер к адаптации к человеческому влиянию. Оно выражается в незначительной емкости (способность объекта переносить воздействия не разрушаясь) по отношению к человеку многих элементов пещерного ландшафта. Это выражается и в слабой способности к восстановлению нарушенных пещерных и карстовых ландшафтов.

Любая деятельность человека, приложенная к пещерам непосредственно или опосредованно, всегда негативно сказывается на состоянии их внутренней среды (человек чуждый элемент в среде и экосистеме пещер). Сама геологическая среда пещер (порода) достаточно устойчива к человеческому присутствию и в большинстве случаев (при некоторых ограничениях) может эксплуатироваться в довольно широких пределах (в данном случае под эксплуатацией понимаются в основном широкомасштабные посещения). По иному обстоит дело с климатом, гидрологией и экосистемами пещер.

Экосистемы формировались в течение весьма продолжительного времени, причем все изменения в пещерах происходили постепенно и в очень смягченной форме, чему способствовала существенная изолированность внутренних частей пещер от внешнего мира. Это позволяло организмам, населяющим пещеры, приспосабливаться к внешним изменениям среды, либо менять среду обитания. Изменения, происходящие в настоящее время, с геологической точки зрения, происходят мгновенно и никакие организмы не в состоянии приспособиться к ним, тем более такие консервативные как пещерные.

Посещение пещер изменяет многие их климатические параметры. Это особенно заметно при низких фоновых температурах в полостях. Факел тепла, выделяемый каждым человеком, изменяет температуру и влажность воздуха в непосредственной близости от него. Чем больше группа, тем больше влияние она оказывает на климат полости. Во многих случаях это не страшно. Но в пещерах с ажурными ледяными кристаллами и рисунками древнего человека влияние группы людей может оказаться существенным, а иногда и чрезвычайно сильным.

Пагубное влияние больших групп сказывается и на натечном и минеральном убранстве полостей. Чем больше группа, тем труднее ей управлять и тем большая вероятность того, что кто-нибудь сойдет с маркированной тропы и по незнанию растопчет что-нибудь на полу, потрогает или отломит сталактит или другой натек.

Водные объекты чувствительны к разного рода загрязнениям: бытовыми отходами и продуктами жизнедеятельности (особенно озера), отработанными батарейками и карбидом кальция. Это ведет не только ухудшению качества воды, но и губит жизнь населяющих их организмов.

Пещеры являются сложными природными системами с исторически сложившимися внутренними связями, которые служат не только цепями передачи внешних воздействий внутрь пещер, но и в обратном направлении. Системная взаимосвязь компонентов внутренней среды пещер в ответ на появление отдельных воздействий вызывает взаимосогласованные реакции всех элементов системы, различающиеся по своим масштабам. Это приводят к сдвигу ранее установившегося равновесия, которое может быть обратимым или нет. В последнем случае передача воздействия по цепи внутренних связей может сопровождаться различными явлениями: 1) цепной реакцией эффектов различного характера и интенсивности (например, обрушенный в ручей камень может запрудить поток; это может вызвать изменение направления его течения, промыву нового хода, что может нарушить сложившийся характер циркуляции воздуха); 2) аккумуляцией эффекта последовательных воздействий кратковременного характера (каждая группа оставляет немного отходов в каком-то месте пещеры, в результате через несколько лет зловонная свалка разрастается до неимоверных размеров); 3) кумулятивным эффектом (прокопанный ход в глыбовом завале приводит к возникновению новой системы циркуляции воздуха в пещере, что приводит к необратимым изменениям, например таянию всего многолетнего льда).

Мерой специфической уязвимости пещеры по отношению к определенному воздействию может служить её емкость, определяемая интенсивностью реакции системы (изменением компонента внутренней среды) в расчете на единицу (массы, энергии, силы и т.д.) приложенного воздействия. Допустимыми воздействиями на внутреннюю среду пещер являются такие, которые не выходят за пределы размаха естественных колебаний компонентов природной среды, так как вызываемый ими эффект обратим. Критическими по отношению к внутренней среде являются воздействия, превышающие допустимые и приводящие к необратимому сдвигу сложившегося равновесия и, в пределе, к разрушению цепей внутренних взаимосвязей системы (например, вытеснение и гибель фауны при внедрении в пещеру инородных химических веществ или биологических агентов).

Часто идет обсуждение вопроса об охране пещер без ясного представления о том, что и в каком случае подлежит охране. Полезным критерием для разных типов пещер является их энергетический уровень. Высокоэнергетические пещеры затапливаются по меньшей мере ежегодно и часто имеют значительный меженный сток. В таких пещерах русловые отложения хорошо сортированы, часто меняют форму и размеры; натеки редки, так как быстро повреждаются потоками. Ущерб в таких пещерах не накапливается. Среднеэнергетические пещеры проводят меньше воды и часто содержат материал поверхностного происхождения, привнесенный животными, ветром, гравитационными процессами. Вторичные образования - массивные натеки, отражающие избыточное насыщение водами, но условия еще слишком активны для роста тонких кристаллических образований. Эти пещеры накапливают ущерб, но он может маскироваться случайными паводками и переотложением осадков. Низкоэнергетические пещеры - чрезвычайно спокойные. Падение капли воды - важное событие. Вторичные образования очень деликатны, растут целиком за счет кристаллизационных сил. Эти пещеры высокочувствительны к ущербу и не обладают способностью к самовосстановлению. Все три типа энергетичности могут быть встречены в одной пещере.

Уязвимость и ранимость пещер заставляют по особому относиться к их охране. Причём индивидуальность пещер, т.е. специфические черты их строения, особенности процессов, происходящих в них, а также возможности необычных находок в них в будущем требуют индивидуального подхода к охране каждой конкретной полости. Это, в свою очередь, заставляет говорить о необходимости их всестороннего изучения.

**1.4 Микрофлора почвы**

Почва является главным резервуаром и естественной средой обитания микроорганизмов в природе, которые принимают активное участие в процессах формирования и самоочищения почвы, а также в круговороте веществ в природе (азота, углерода, серы, железа и других соединений). Почва формируется из горных пород, разрушающихся под действием ветра, воды, живых организмов, и из органических соединений, образующихся в результате гибели растений и животных. Разнообразные микроорганизмы почвы обитают в водных и коллоидных пленках, которые как бы обволакивают почвенные частицы. Широко осуществляется передвижение и расселение почвенных подвижных бактерий по гифам грибов, вокруг которых так же обнаруживаются микроскопические тонкие пленки.

Качественный состав микрофлоры почвы очень разнообразен: множество видов бактерий (преимущественно спорообразующих), актиномицет, спирохет, архебактерий, простейших, сине – зеленых водорослей, микоплазм, грибов, вирусов. Состав и соотношение между различными группами микроорганизмов изменяются в зависимости от вида почвы, способ ее обработки, содержание органического вещества, влаги, от климатических условий и многих других причин. Так, в песчаных почвах, хорошо аэрирующихся, преобладают аэробные микроорганизмы, а в глинистых, влагоемких, в которых проникновение кислорода затруднено, живут в основном анаэробы.

Микроорганизмы находятся в сложном биоценозе, характеризующимся антагонистическими и симбиотическими взаимоотношениями, как между собой, так и с растениями. В самой почве идет непрерывная борьба за существование, конкуренция за питание, кислород и т. Д. Нередко жизнедеятельность одних групп бактерий подавляется действием антибиотических веществ и бактериоцинов, выделяемых другими группами.

Живая масса микроорганизмов в почве на 1 га в среднем составляет около 1000 кг. Численность микроорганизмов подвержена сезонным колебаниям: весной число особей увеличивается, достигая максимума к лету, в разгар лета уменьшается, по-видимому, в результате наиболее активного воздействия солнечных лучей, осенью опять увеличивается и снижается зимой.

Распределение микробов в почве неравномерно. На поверхности и в слое толщиной 1–2 мм относительно мало микробов, несмотря на постоянное обсеменение почвы, что объясняется губительным действием ультрафиолетовых лучей солнца и высушиванием. Наиболее обильна микрофлора на глубине 10–20 см. В этом слое протекают основные биохимические процессы превращения органического вещества, обусловленные жизнедеятельность разнообразных микроорганизмов, последовательно сменяющих друг друга. В более глубоких почвенных слоях флора становится скудной и на глубине 4–5 м микроорганизмы обнаруживаются очень в малых числах. В составе микрофлоры почвы принято выделять так называемые физиологические группы микроорганизмов, которые участвуют в различных процессах и на разных этапах постепенного разложения органических веществ(Кочемасов, Ефремова, 1987).

1. Бактерии – аммонификаторы, являющиеся гнилостными микроорганизмами, вызывают гниение остатков растений. Трупов животных, разложение мочевины – B.suptilis, B. Mezentericus, Serratia marcescens бактерии рода Proteus; грибы рода Aspergillus, Мucor, Рenicillium; анаэробы - C. Sporogenes, C. putrificum ; уробактерии - Urobacillus pasteuri Sarcina urea, расщепляющие мочевину.

2. Нитрифицирующие бактерии: Nitrosomonas и Nitrobacter. Nitrosomonas обладают способность окислять аммиак (образующий как результат жизнедеятельности аммонифицирующих бактерий) до азотистой кислоты, образуя нитраты. При деятельности Nitrobacter азотистая кислота окисляется до азотной и превращается в нитраты.

3. Азотфиксирующие бактерии. Клубеньковые и свободноживущие азотфиксирующие бактерии обладают исключительной способностью усваивать из воздуха атмосферный азот и в процессе жизнедеятельности образуют из молекулярного азота белки и другие органические соединения азота, которые используются растениями.

4. Бактерии, расщепляющие клетчатку, вызывающие различные виды брожения, наблюдаемые при разложении микробами органических соединений углерода (молочнокислое, спиртовое, маслянокислое, уксусное, пропионовокислое, ацетонобутиловое и др.).

5. Бактерии, учавстывующие в круговороте серы, железа, фосфора и других элементов – серобактерии, железобактерии и т. д., разнообразные виды которых осуществляют окисление и восстановление этих соединений в природе.

Следует помнить, что микроорганизмы могут выполнять различные физиологические функции, поэтому такое выделение групп условно, к тому же процессы, протекающие в почве, всегда взаимосвязаны, последовательность, направление, темпы их развития зависит от условий окружающей среды (Кочемасов, Ефремова, 1987).

**1.5 Санитарно-микробиологический анализ пещер**

Санитарная микробиология изучает микрофлору окружающей среды (воды, воздуха, почвы, продуктов и предметов обихода) и ее влияние на здоровье человека.

Эта наука представляет собой смежную с эпидемиологией и гигиеной области медицинской микробиологии. Основные санитарно – микробиологические методы включают в себя как оригинальные методики, так и методы общей и медицинской микробиологии, направлены на определение общей микробной обсемененности (общее микробное число); обнаружение и титрование санитарно – показательных микробов (СПМ); выявление патогенных микроорганизмов и их метаболитов; определение степени недоброкачественности изучаемых объектов, обусловленной наличием микроорганизмов(Кочемасов, Ефремова, 1987).

***1.5.1 Санитарно – микробиологическое исследование почвы (грунта)***

Попавшие в почву представители нормальной микрофлоры человека и животных, а также патогенные микроорганизмы обычно длительно не выживают. Однако многие представители нормальной микрофлоры человека способны включать способны включаться в состав биоценоза почвы, а отдельные виды остаются постоянными обитателями. На сроки выживания патогенных бактерий в почве влияют состав и тип почвы, температура, влажность, атмосферные осадки, степень загрязненности, а также ее характер (органическое, микробное или химическое загрязнение). Патогенные микроорганизмы, обнаруженные в почве, разделяют на три группы:

1. Патогенные микроорганизмы постоянно обитающие в почве (например Clostridium botulinum, возбудители подкожных микозов, виды Acinomyces, некоторые возбудители микотоксикозов).

2. Спорообразующие патогенные микроорганизмы. Бактерии попадают в почву с выделениями человека и животных, а также с трупами погибших животных. При благоприятных условиях они могут размножаться и сохранятся в виде спор длительное время.

3. Патогенные микроорганизмы, попадающие в почву с выделением человека и животных и сохраняющиеся сравнительно недолго (в течение нескольких недель или месяцев). Это различные неспоровые бактерии (Salmonella, Shigella, Vibrio, Brucella, Fracisella, Mycobacterium, Leptospira, Pseudomonas, энтеровирусы, вирус ящура).

Оценку санитарного состояния почв проводят с учетом комплекса показателей: подсчитывают общее количество сапрофитных микроорганизмов и определяют наличие санитарно – показательных микроорганизмов. Высокая численность сапрофитной микрофлоры свидетельствует об органическом загрязнении, при микробной контаминации преобладают санитарно – показательные микроорганизмы. При необходимости также исследуют состав нитрифицирующих и аммонифицирующих бактерий, актиномицетов, грибов, целлюлозолитических микроорганизмов и др. (Нетрусов , 2005).

***1.5.2 Сапрофиты как показатели органического загрязнения грунта пещеры***

Сапрофиты гетеротрофные организмы, которые непосредственно от других организмов не зависят, но нуждаются в готовых органических соединениях. Они используют продукты жизнедеятельности других организмов или разлагающиеся растительные или животные ткани. К сапрофитам относится большая часть бактерий. Степень требовательности к субстрату у сапрофитов весьма различна. В эту группу входят организмы, которые могут расти только на достаточно сложных субстратах (молоко, трупы животных, гниющие растительные остатки), т.е. им нужны в качестве обязательных элементов питания углеводы, органические формы азота в виде набора аминокислот, пептидов, белков, все или часть витаминов, нуклеотидов или готовые компоненты, необходимые для синтеза последних (азотистые основания, пятиуглеродные сахара.) Чтобы удовлетворить потребности этих гетеротрофов в элементах питания, их обычно культивируют на средах, содержащих мясные гидролизаты, автолизаты дрожжей, растительные экстракты, молочную сыворотку.

Существуют гетеротрофы, нуждающиеся только в одном источнике углерода. Им может быть какой либо сахар, спирт кислота или другое углеродсодержащее соединение. Описаны бактерии из рода pseudomonas, способные использовать в качестве единственного источника углерода и энергии любое из 200 различных органических соединений, и бактерии, для которых источником углерода и энергии может служить узкий круг довольно экзотических органических веществ. Например bacillus fastidiosus может использовать только мочевую кислоту и продукты ее деградации, а некоторые представители рода Clostridium растут только в среде, содержащей пурины. Использовать другие органические субстраты для роста они не могут. Биосинтетические способности этих организмов развиты в такой степени, что они сами могут синтезировать все необходимые им углеродные соединения.

Особую группу гетеротрофов, обитающих в водоемах, составляют олиготрофные бактерии, способные расти при низких концентрациях в среде органических соединений. Организмы, предпочитающие высокие концентрации питательных веществ, относят к копиотрофам. Если у типичных копиотрофов оптимальные условия для роста создаются при содержание в среде питательных веществ в количестве примерно 10 г/л, тот для олиготрофных организмов – в пределах 1 – 15 мг углерода/л. В средах с более высоким содержанием органических веществ такие бактерии, как правило, расти не могут и погибают.

Различия между гетеротрофами с высокими потребностями в готовых органических и теми, потребности которых минимальны и сводятся, как правило, одному какому – нибудь органическому источнику углерода, заключаются таким образом, в степени развития их биосинтетических способностей (Кочемасов, Ефремова, 1987).

**Глава 2 Объекты и методы исследования**

**2.1 Объекты исследования**

Объектом исследования являлась пещера Баскунчакская.

Пещера представляет собой горизонтальный двух-, трехъярусный лабиринт по характеру морфологии условно делимый на три части: Основную Галерею - северо-восточную, самую крупную от входа №1,Вертикальный Шкуродер – узкий меандр от входа № 3 и Лабиринт, соединяющий первые две части. Обвальные залы и галереи шириной в несколько метров с четко выраженной на стенах ярусностью местами имеют высоту до 10 м. В целом сухая, пещера имеет два сифона: один – в лабиринтовой части, вбирающий временный водоток из тальвега, второй – в виде озера диаметром около 4 м, из которого периодически появляется водоток в Основную Галерею. Это озеро-сифон единственным доступным источником питьевой воды (проведен химический анализ) как в пещере, так и на несколько километров в окрестности. Пещера Баскунчакская является наиболее крупной подземной карстовой формой Прикаспийской низменности. Начало формирования пещеры относится к концу позднехвалынского времени, то есть примерно 6 тысяч лет назад. На протяжении этого времени в полости четыре раза существовал достаточно мощный водный поток, что на фоне вертикальных движений, обусловленных солянокупольной тектоникой, привело к формированию нескольких уровней и отразилось в морфологии поперечных профилей ходов в некоторых частях пещеры. В Баскунчакской пещере можно наблюдать разнообразные карстовые формы: желобковые и лунковые кары, закарстованные трещины, гипсовые ножи. Турбулентные потоки, некогда имевшие здесь место, создали на некоторых участках пещеры своеобразные останцовые формы, морфологически сходные со сталагнатами. В зимнее время в определенных местах пещеры образуются ледяные сталагмиты (Белононич, Цой , 1998).

Первая проба была отобрана возле горизонтального шкуродера на глубине 20-25 см.

Вторая проба была отобрана в галерее входа №2 на глубине 10-15 см.

Третья проба в галерее входа №3 на глубине 10-15 см.

Четвертая проба была отобрана в главной Галереи на глубине 10 – 15 см.

Пятая проба была отобрана в начале вертикального шкуродера.

Шестая проба была отобрана в лабиринтовой части пещеры.

Седьмая проба отобрана в галерее входа №2.

Восьмая проба отобрана в грязевом сифоне.

Девятая проба отобрана в районе горизонтального шкуродера.

***2.2 Методы исследования***

***2.2.1 Методы отбора проб***

Почвенный образец берут стерильным буром, стерильной лопаткой и стерильным ножом в заранее приготовленную стеклянную широкогорлую стерильную банку, закручивающуюся пробкой, обернутой стерильной ватой, либо в стерильные полиэтиленовые или пергаментные мешки. На пакеты, банки наклеивают этикетки с указанием места взятия проб, горизонта и других сведений. Бур, лопату и нож перед взятием образца тщательно очищают, затем обжигают горящим спиртом (Теппер ,1987).

Почвенные образцы анализируют в первые сутки. В случае необходимости допускается хранение их в холодном помещении (в холодильнике) в течение двух дней. Для большей однородности среднего образца, соблюдая все правила асептики, его тщательно перемешивают, вынимают корни растений, различные включения (Теппер ,1987).

Для дальнейшего исследования отобранных проб, предварительно необходимо произвести стерилизацию микробиологической посуды и сред, используемых в последующей работе.

***2.2.2 Методы стерилизации***

Стерилизация или обеспложивание (от лат. sterilis - бесплодный), это полное уничтожение клеток микроорганизмов в питательных средах, посуде и пр.

Известно несколько методов стерилизации. Чаще всего применяют стерилизацию нагреванием.

1. Фламбирование, или прокаливание.

Прокаливать можно непосредственно перед употреблением платиновые петли, иглы, шпатели, мелкие металлические предметы (ножницы, ланцеты, пинцеты), а также стеклянные палочки, предметные, покровные стекла и т.д.

 2. Стерилизация сухим жаром

Ее применяют для обработки посуды и сухих материалов. При этом стерилизуемый объем выдерживают при170◦C в течение 2 часов в печи Пастера или в электросушильных шкафах. Перед стерилизацией стеклянную посуду закрывают ватными пробками и обертывают бумагой. Чашки, пробирки, пипетки, заворачивают в бумагу или помещают в особые футляры и пеналы, в которых посуда может хранится после стерилизации (Теппер,1987).

3. Стерилизация текучим паром.

Текучим паром (100◦C) обрабатывают предметы, портящиеся от сухого жара, и некоторые питательные среды, не выдерживающие более высокой температуры (среды с углеводами, МПЖ, молоко), Проводят стерилизацию в кипятильнике Коха по 30 мин. в течение 3 суток ежедневно. Такая стерилизация называется дробной.

4.Стерилизация насыщенным паром под давлением.

Это наиболее быстрый и надежный способ стерилизации, при котором гибнут самые устойчивые ссоры. С его помощью стерилизуют большинство питательных сред, посуду.

Обработку насыщенным паром проводят в герметически закрывающимся толстостенном котле – автоклаве. (Теппер,1987).

***2.2.3 Приготовление почвенной суспензии и посев. Приготовление разведений***

Численность популяций микроорганизмов обычно велика, поэтому для получения изолированных колоний необходимо приготовить ряд последовательных разведений. Разведения готовят в стерильной водопроводной воде или физрастворе. В ходе опыта целесообразно использовать один и тот же коэффициент разведения, например 10, что уменьшает вероятность ошибки.

Для приготовления разведений стерильную воду разливают по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исследуемой суспензии стерильной пипеткой переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды - это 1-е разведение, 10ˉ¹. Полученное разведение тщательно перемешивают новой стерильной пипеткой, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Эту процедуру выполняют 3-5 раз, затем той же пипеткой отбирают 1мл полученной суспензии и переносят во 2-ю пробирку - получают 2–е разведение. Таким же образом готовят и последующие разведения. Степень разведений зависит от плотности исследуемой популяции микроорганизмов; соответственно она тем больше, чем больше плотность популяции.

Для приготовления каждого разведения следует обязательно использовать новую пипетку. Пренебрежение этим правилом приводит к получению ошибочного результата (Методические указания по количественному учету микроорганизмов, 2004).

 Техника посева. В чашки Петри посевы могут быть произведены двумя способами: глубинным посевом или рассевом по поверхности питательной среды. При первом методе в стерильную чашку Петри вносят или исследуемую воду, или разведение грунта, или разведения культуры и заливают расплавленным и охлажденным до 40-45◦C агаром. Как при внесении посевного материала, так и при заливании его агаром крышка чашки Петри приподнимается как можно меньше (Родина ,1965).

***2.2.4 Учет микроорганизмов на плотных средах***

После инкубации засеянные среды вынимают из термостата и в них подсчитывают число колоний.

При подсчете колоний на богатых плотных питательных средах (МПА, МПА+сусло-агар, КАА, сусло-агар, среда Чапека, Среда Эшби и т.д.) закрытые чашки Петри просматривают в проходящем свете и с внешней стороны их колонии отмечают маркером. Если на чашке больше 200 колоний, то их можно подсчитывать с помощью камеры Вольфюгеля. Учет микроорганизмов на МПА делают визуально на четвертый день после посева, проводя микроскопирования и подсчитывая ОМЧ (Теппер,1987).

***2.2.5 Приготовление окрашенных препаратов***

Обработка предметного стекла. Прежде чем приступить к приготовлению микроскопических препаратов необходимо предметные и покровные стекла, Они должны быть чистыми и обезжиренными. Доказательства хорошего обезжиривания является равномерное распределение капли воды на их поверхности (Асонов 1989).

Приготовление мазка. Мазок готовят на предметном стекле при помощи микробиологической петли или пастеровской пипетки. Мазки готовят из культур микробов, выращенных на плотных или жидких питательных средах. Петлю нагревают до покраснения. Над пламенем горелки открывают пробирку, внутрь ее вводят петлю. Охлаждают, после чего петлей соприкасаются с культурой, которую затем тонким слоем наносят на поверхность предметного стекла. При изготовлении мазков из плотных субстратов или агаровых культур на поверхность стекла вначале наносят каплю стерильной воды. Мазок фиксируют над пламенем горелки (Асонов 1989).

***2.2.6 Техника окраски по Граму***

На хорошо обезжиренное стекло наносят три тонких мазка разных культур микроорганизмов. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают в течение 1 мин метилвиолетом. Сливают краситель и, не промывая препарат водой, наносят на него раствор Люголя на 1 мин (до полного почернения мазка). Препарат, на промывая водой, обрабатывают,96%-ным спиртом в течение 15-20 с. Время обесцвечивания очень существенно, при превышении указанного срока обесцвечивается и грамположительные клетки, при недостаточным сроке обработки препарат окажется перекрашенным. Промыв препарат водой, его окрашивают фуксином в течение 1 мин (Теппер 1987).

После этой обработки грамположительные микроорганизмы окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные имеют только цвет дополнительной окраски (фуксина).

Результаты окраски по Граму зависят от возраста культуры: в старых культурах клетки всегда окрашиваются грамотрицательно. Поэтому лучше использовать молодые односуточные культуры (Теппер 1987).

Определение бактерий группы кишечных палочек

При исследовании почв на присутствие БГКП рекомендуется применение титрационного метода при предполагаемой невысокой степени фекального загрязнения, метод мембранных фильтров используется при анализе малозагрязненных почв. При высокой степени фекального загрязнения рекомендуется делать прямой посев почвенной суспензии (1: 10) на среду Эндо.

Титрационный метод. Из приготовленных разведений почвенной суспензии делают посевы во флаконы и пробирки с жидкой питательной средой Кесслера – 10 мл (из разведения 1:10) – в 50 мл среды, по 1 мл из последующих разведений – в 9 мл среды. Посевы инкубируются в течение 48 ч при температуре 370С. При отсутствии во флаконах и пробирках роста, характеризующегося газообразованием и помутнением, дается отрицательный ответ об отсутствии БГКП.

Если в засеянных сосудах обнаруживается рост в виде помутнения среды или помутнения и газообразования, следует сделать высев в чашки Петри со средой Эндо или в пробирки с розолововым агаром, инкубировать 24 ч при температуре 37 0С . Дальнейшей идентификацией (аналогично определению БГКП в воде) подвергаются типичные для эшерихий красные или розовые с металлическим блеском колонии на среде Эндо, а также желтые или оранжевые колонии на розоловой среде. Результат выражается в коли – индексе, т. Е. количество БГКП, обнаруженных в 1 г почвы.

**Глава 3 Результаты исследования**

В ходе работы было проведено микробиологическое исследование образцов грунта пещеры Баскунчакская. Для выделения бактерий, дрожжей и грибов, представляющих естественную микрофлору пещеры, использовались среда МПА, Чапека и Сабуро. Учет численности проводился через 48 часов на МПА и через неделю на Чапеке и Сабуро. Для учета санитарно – показательных микроорганизмов (бактерий группы кишечная палочка) использовался бродильный метод. Посев осуществлялся со среды Кесслера на среду Эндо, учет результатов проводился через 2 суток культивирования при температуре + 37 0С. Учитывались окрашенные в красный цвет колонии, состоящие из грамотрицательных, оксидазоотрицательных палочек.

Таблица №1

Численность сапротрофной микрофлоры в пещере Баскунчакская.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Проба | численность | Культуральные признакиколонии | Морфологические признаки | Предполагаемое название рода |
| Горизонтальный шкуродер | 7,5∙107 | Форма колонии амебовидная, профиль колонии: бугристый, край волнистый, поверхность: шероховатая. Размер колонии средний, оптические свойства: не прозрачная. Цвет: белый, структура колонии: однородная, консистенция: сухая | СпоровыепалочкиГ «+» | Bacillus |
| Форма колонии амебовидная, профиль колонии: бугристый, край волнистый, поверхность: шероховатая. Размер колонии средний, оптические свойства: не прозрачная. Цвет: белый, структура колонии: однородная, консистенция: сухая | СпоровыепалочкиГ «+» | Bacillus |
|  |  | Форма колонии амебовидная, профиль колонии: бугристый, край волнистый, поверхность: шероховатая. Размер колонии средний, оптические свойства: не прозрачная. Цвет: белый, структура колонии: однородная, консистенция: сухая | СпоровыепалочкиГ «+» | Bacillus |
|  |  | Форма колонии амебовидная, профиль колонии бугристый, край колонии волнистый, поверхность гладкая. Размер крупный, оптические свойства блестящая. Цвет бежевый, структура колонии однороднаяКонсистенция слизистая. | СпоровыепалочкиГ «+» | Bacillus |
|  |  | Форма колонии амебовидная, профиль колонии бугристый, край колонии волнистый, поверхность гладкая. Размер крупный, оптические свойства блестящая. Цвет бежевый, структура колонии однороднаяКонсистенция слизистая. | Споровые Палочки Г «+», | Bacillus |
| Галерея входа № 2 | 9,1∙106 | Форма колонии круглая с валиком, профиль колонии изогнутый, край колонии волнистый, поверхность шероховатая. Размер средний, оптические свойства не прозрачная. Цвет белый, структура колонии однородная, консистенция сухая. | Споровые палочки,Г «+» | Bacillus |
|  |  | Форма колонии амебовидная, профиль колонии изогнутый, край колонии волнистый, поверхность шероховатая, размер средний, оптические свойства не прозрачная.Цвет серый, структура колонии однородная, консистенция сухая | СпоровыеПалочки Г «+»,  | Bacillus |
|  |  | Форма колонии амебовидная, профиль колонии: бугристый, край волнистый, поверхность: шероховатая. Размер колонии средний, оптические свойства: не прозрачная. Цвет: белый, структура колонии: однородная, консистенция: сухая | Споровые палочки Г «+» | Bacillus |
| Проба | численность | Культуральные признакиколонии | Морфологические признаки | Предполагаемое название рода |
|  |  | Форма колонии амебовидная, профиль колонии изогнутый, край колонии волнистый, поверхность шероховатая, размер крупная, оптические свойства не прозрачная. Цвет грязно белый, структура колонии однородная, консистенция сухая | СпоровыепалочкиГ «+» | Bacillus |
|  |  | Форма колонии не правильная, профиль колонии изогнутый, край колонии волнистый, поверхность гладкая, размер средний, оптические свойства блестящая. Цвет бежевый, структура колонии однородная, консистенция слизистая. | Палочки со спорами Г «+»  | Bacillus |
| Галерея входа № 3 | 7,05 ∙106 | Форма колонии амебовидная, профиль колонии изогнутый, край колонии волнистый, поверхность шероховатая, размер средний, оптические свойства не прозрачная. Цвет серый, структура колонии однородная, консистенция сухая | Споровые палочки Г «+»,споры | Bacillus |
|  |  | Форма колонии сложная, профиль колонии бугристый, край колонии волнистый, поверхность шероховатая. Размер средний, оптические свойства не прозрачная.Цвет оранжевый, структура колонии однородная, консистенция сухая. | Споровые палочки Г «+» | Bacillus |
|  |  | Форма колонии амебовидная, профиль колонии бугристый, край колонии волнистый, поверхность гладкая. Размер крупный, оптические свойства блестящая. Цвет бежевый, структура колонии однородная, консистенция слизистая. | Споровыепалочки Г «+» | Bacillus |
|  |  | Форма колонии амебовидная, профиль колонии изогнутый, край колонии волнистый, поверхность шероховатая, размер крупная, оптические свойства не прозрачная. Цвет грязно белый, структура колонии однородная, консистенция сухая | Споровыепалочки Г «+» | Bacillus |
| Главная Галерея | 5,2 ∙106 | Форма колонии амебовидная, профиль колонии изогнутый, край колонии волнистый, поверхность шероховатая, размер крупная, оптические свойства матовая. Цвет бежевый, структура колонии однородная, консистенция сухая | Споровыепалочки Г «+» | Bacillus |
| Вертикальный шкуро-дер | 1,7 ∙106 | Форма колонии амебовидная, профиль колонии изогнутый, край колонии волнистый, поверхность шероховатая, размер крупная, оптические свойства не прозрачная. Цвет грязно белый, структура колонии однородная, консистенция слизистая. | Споровыепалочки Г «+» | Bacillus |
|  |  | Форма колонии амебовидная, профиль колонии изогнутый, край колонии волнистый, поверхность: гладкая, размер крупная, оптические свойства не прозрачная. Цвет белая, структура колонии однородная, консистенция сухая. | Споровыепалочки Г «+» | Bacillus |
| Лабиринт | 1,05 ∙106 | Форма колонии амебовидная, профиль колонии изогнутый, край колонии волнистый, поверхность гладкая, размер крупная, оптические свойства блестящая. Цвет бежевый, структура колонии однородная, консистенция слизистая. | Споровыепалочки Г «+» | Bacillus |
|  |  | Форма колонии круглая, профиль колонии выпуклый, край колонии: гладкий, поверхность гладкая. Размер средний, оптические свойства блестящая. Цвет бежевый, структура колонии однородная, консистенция слизистая. | Споровыепалочки Г «+» | Bacillus |
|  |  | Форма колонии амебовидная, профиль колонии изогнутый, край колонии волнистый, поверхность гладкая. Размер крупная, оптические свойства не прозрачная. Цвет бежевый, структура колонии однородная, консистенция сухая. | Споровыепалочки Г «+» | Bacillus |

В шести исследуемых пробах грунта, в числе гетеротрофов, доминируют бациллы. Предположительно, основываясь на культуральных и морфологических признаках, обнаруженные микроорганизмы можно отнести к следующим родам: Bac.megaterium, Bac.subtiles, Bac.mesentericus.

Общее микробное число, варьирует от 7,5∙ 107 до 1,05 ∙ 106 кое/г.

При определении численности плесневых грибов был произведен начальный визуальный осмотр пещеры, на местах стоянок туристов, на грунте, были обнаружены колонии грибов. Микроскопирование показало, что данные колонии предположительно относятся к роду Penicillium.

На среде Чапека и Сабуро был осуществлен посев 6 проб грунта пещеры отобранных с учетом отдаленности от главных выходов и в трудно доступных местах.

Таблица № 2.

Численность грибов обнаруженных в пещере Баскунчакская.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Проба | Численностькое/гм | Культуральные признакиколонии | Предполагаемое название рода |
| Главная Галлерея | 1,9 ∙ 105 | Консистенция шероховатая, край колонии желто-зеленый, обратная сторона: коричнева. Размер: 10-15мм, конидиальная зона: св. зеленая, экссудат: отсутствует.  | *Aspergillus* |
|  |  | Консистенция шероховатая, край колонии желто-зеленый, обратная сторона коричнева, размер 10-15мм, конидиальная зона св. зеленая, экссудат отсутствует | *Aspergillus* |
| Вертикальный шкуродер | 1,5∙ 105 | Консистенция: хлопьевидная, край колонии: темно розовый, обратная сторона: пурпурная. Размер: 15-20мм, конидиальная зона: розовая, экссудат: отсутствует. | *Fusarium* |
| Лабиринт | 7,8∙ 105  | Консистенция: хлопьевидная, край колонии: бело - розовый, обратная сторона: пурпурная. Размер: 15-20мм, конидиальная зона: розовая, экссудат отсутствует. | *Fusarium oxysporum* |
|  |  | Консистенция: шероховатая, край колонии: св. коричневый, обратная сторона: св. коричневая. Размер: 40 мм, конидиальная зона: темно-зеленная, экссудат: отсутствует.  | *Penicillium* |
|  |  | Консистенция: шероховатая, край колонии: св. коричневый, обратная сторона: св. коричневая. Размер: 40мм, конидиальная зона: темно-зеленная, экссудат: отсутствует.  | *Penicillium*  |
| Галерея входа № 2 | 1,7 ∙ 105 | Консистенция: шерховатая, край колонии: св. коричневый, обратная сторона: св. коричневая. Размер: 40мм, конидиальная зона: темно-зеленная, экссудат: отсутствует.  | *Penicillium*  |
| Грязевой Сифон | 3,6∙ 105  | Консистенция ватная (хлопьевидная), край колонии: белый, обратная сторона: белая. Размер: 5 – 6 мм, конидиальная зона: белая, экссудат: прозрачный*.* | *Acremonium.* |
|  |  | Консистенция: шероховатая, край колонии: оранжевый, обратная сторона: оранжевая. Размер: 15 – 20 мм, конидиальная зона: черная, экссудат: отсутствует | *Aspergillus* |
| Консистенция: ватная (хлопьевидная), край колонии: белый, обратная: св. коричневая. Размер: 15 – 20 мм, конидиальная зона: белая, экссудат: отсутствует. |  *Penicillium* |
| Консистенция: зернистая, край колонии: серый, обратная: св. коричневая. Размер: 30 мм, конидиальная зона: белая, экссудат: отсутствует.  | *Penicillium* |
| Консистенция: хлопьевидная, край колонии: бело - розовый, обратная сторона: пурпурная. Размер: 10 – 15 мм, конидиальная зона: желтая, экссудат: отсутствует.  | *Fusarium.* |
| В районе горизонтальногошкуродера | 2,7∙ 105  | Консистенция: хлопьевидная, край колонии: белый, обратная сторона: св. коричневая. Размер: 15-20мм, конидиальная зона: белая, экссудат: отсутствует*.* | *Penicillium*  |
| Консистенция: ватная, край колонии: белый, обратная: темно коричневая. Размер: 5 – 8 мм, конидиальная зона: белая, экссудат: отсутствует.  | *Penicillium* |
| Консистенция: войлочная, край колонии: темно серый, обратная: темно серая. Размер: 20 мм, конидиальная зона: св. серая, экссудат: белый | *Penicillium* |
|  |  | Консистенция: зернистая, край колонии: белый, обратная: св. коричневая, размер: 15 - 30 мм, конидиальная зона: зеленая, экссудат: отсутствует | *Aspergillus* |
| Консистенция: хлопьевидная, край колонии: белый, обратная сторона: пурпурная. Размер: 15 - 20 мм, конидиальная зона: желтая, экссудат: отсутствует.  | *Fusarium* |
| Консистенция: зернистая, край колонии: серый, обратная сторона: белая. Размер: 10 – 15 мм, конидиальная зона: желто - зеленая, экссудат: отсутствует.  | *Penicillium* |
| Консистенция: зернистая, край колонии: серый, обратная сторона: св. коричневая. Размер: 50 мм, конидиальная зона: серая, экссудат: отсутствует | *Penicillium.* |
| Консистенция: войлочная, край колонии: коричневый, обратная сторона: коричневая. Размер: 8 мм, конидиальная зона: св. коричневая, экссудат: отсутствует. | *Aspergillus* |

В числе исследуемых проб грунта, среди грибов, доминирующее положение занимают *р.* *Aspergillus, р. Penicillium.*Численность грибов варьирует от 1,5 – 3,6∙ 105 кое/г грунта. В удаленных и труднодоступных местах количество грибов значительно меньше, чем в местах активно посещаемых туристами. В исследуемых пробах, дрожжи обнаружены не были.

Количество БГКП варьирует в допустимых пределах, от менее 9 до 10 клеток /г. Но наличие даже такого незначительного количества БГКП, может свидетельствовать об антропогенном загрязнение пещеры.

Сводная таблица определения численности микроорганизмов в пробах грунта пещеры Баскунчакская.

|  |  |
| --- | --- |
| Место отбора проб |  Численность микроорганизмов кое/г |
| Сапротрофы | Микромицеты | БГКП |
| Коли-индекс | Коли- титр |
| Горизонтальный шкуродер | 7,5 |  | 10 | 91 |
| Галерея входа №2 | 9,1 |  | 9 | 111 |
| Галерея входа № 3 | 7,05 |  | <3 | >333 |
| Главная Галерея | 5,2 | 18,75 | - | - |
| Вертикальный шкуродер | 1,7 | 10,78 | - | - |
| Лабиринт | 1,05 | 7,75 | 7 | 143 |
| Галерея входа № 2 |  | 16,55 | 9 | 111 |
| Грязевой сифон |  | 35,8 | - | - |
| В районе горизонтального шкуродера |  | 26,2 | 9 | 111 |

Основываясь на полученных результатах можно сделать следующее заключение:

1) в пробах отобранных в грунте пещеры Баскунчакская были обнаружены преимущественно Г «+» споровые палочки. Предположительно обнаруженные микроорганизмы можно отнести к следующим родам: Bac.megaterium, Bac.suрtiles, Bac. mesentericus.

2) Помимо сапротрофной микрофлоры были обнаружены плесневые грибы, доминирующее положение занимают *р.* *Aspergillum, р. Penicillium.* Численность грибов варьирует от 1,5 – 3,6∙ 105 кое/г грунта. В удаленных и труднодоступных местах количество грибов значительно меньше чем в местах активно посещаемых туристами. Также среди грибов был обнаружен *р. Fusarium,* многие виды которого являются патогенными для человека. При визуальном осмотре пещеры, на местах стоянок туристов, на грунте, были обнаружены колонии грибов, предположительно относящихся к роду Penicillium.

Гетеротрофные микроорганизмы и грибы, обнаруженные в пещере, могут являться индикаторами рекреационного влияния, оказываемого на нее, как на объект туристического значения в результате эксплуатации пещеры в качестве экскурсионного объекта.

3)БГКП были обнаружены в пределах нормы. В труднодоступных местах отмечается их полное отсутствие. Незначительное наличие БГКП также свидетельствует об антропогенном загрязнении пещеры.

**Вывод**

Основываясь на полученных результатах можно сделать следующие выводы:

1.В пробах, отобранных в грунте пещеры Баскунчакская, среди сапротрофов, доминирующее положение занимают микроорганизмы, предположительно относящиеся к следующим родам: Bac.megaterium, Bac.suрtiles, Bac. mesentericus. Общее микробное число, варьирует от 7,5 ∙ 107 до 1,05 ∙ 106 кое/г. Среди микромицетов доминируют *р.* *Aspergillus р. Penicillium.*Численность грибов варьирует от 1,5 – 3,6∙ 105 кое/г грунта.

2. Количество БГКП варьирует в допустимых пределах, от менее 9 до 10 клеток /г. Но наличие даже такого незначительного количества БГКП, может свидетельствовать об антропогенном загрязнение пещеры.

**Список литературы**

1. Асонов Н.Р. Микробиология.-2-е изд., перераб. и доп.- М.:

АгропромиздатЮ1989.-350с.

2.Вербина Н.М. Гидромикробиология с основами общей микробиологии. - М.: «Пищевая промышленность», 1980. – 288с.

3.Государственный природный заповедник. «Богдинско - Баскунчакский»

Астрахань. 1998.

4. Методические указания по количественному учету микроорганизмов для студентов специальности 012400 «Микробиология», Куликова И.Ю., 2004-35с.

5.Кочемасов З.Н. Ефремова С.А. Санитарная микробиология и вирусология. – М.: Медецина, 1987. – 352с.

6.Мищустин Е.Н. Микробиология. - М.: Агропромиздат, 1987-338с.

7.Нетрусов А.П

8. Определитель бактерий Берджи. В 2 – х т.: перевод с англ./ Под ред.

Дж. Хоулта, Н.Грига, П.Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса – М.: Мир,

1997. – 364с.

9. Расанов Н.Р. Микробиология. М.: Колос, 1989.

10. Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии Учеб. пособие для вузов. М.: Агропромиздат, 1987. – 237с.

11. http:⁄⁄ www.ecocave.ru.