

органолептические показатели, химический состав с высшим содержанием белка коллагеного характера, обладает рядом ценных функционально-технологических свойств, по микробиологическим показателям не превышает допустимых стандартом норм. В связи с этим можно сделать вывод о том, что использование отходов рыбоперерабатывающих предприятий Вьетнама и Волго-Каспийского бассейна позволит решить проблему утилизации и рационального использования сырья и получить желатин, имеющий широкий спектр использования, а именно применяться как структурообразователь в пищевой промышленности, в медицинских и фотографических целях, использоваться для приготовления микробиологических сред, осветления виноматериалов, напитков и в других целях.

Литература

1. ГОСТ 7636-85. Рыба и продукты переработки рыбы и морских млекопитающих. Методы химического и физического исследования.
2. ГОСТ 11293-89. Желатин. Технические условия.
3. Сколков, С.А. Разработка технологии кожи из шкур рыб Волго-Каспийского бассейна [текст]. Автореф. дис. на соиск. канд. тех. наук: 05.18.04/ Сколков С.А.–М. –2004.
4. Щербаков, В. Г., Иваницкий, С. Б. Производство белковых продуктов из масличных семян [текст]. – М.: Агропромиздат, 1987. – 152 с.

УДК 619:579

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА ПЛОТНЫХ СРЕДАХ

CULTIVATION OF SULFATE-REDUCING BACTERIA ON SOLID MEDIA

Н.Н. Карамышева, А.Г. Шестаков, Д.А. Васильев
N.N. Karamysheva, A.G. Shestakov, D.A. Vasilyev

Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии Ульяновской ГСХА

The research innovation centre of microbiology and biotechnology
Ulyanovsk state academy of Agriculture

Results of working out of the scheme of allocation and identification of bacteria of kind Desulfovibrio desulfuricans are described. The presented scheme of allocation allows to define in current 96 hours bacteria of this kind.

Сульфатредукция – процесс восстановления минеральных солей сульфатов (SO_4^{2-}). Этот микробиологический процесс является одним из важнейших в круговороте серы на земной поверхности. Этот процесс был открыт русским химиком Н. Д. Зелинским в 1890—1893 гг. Сульфатредукция происходит повсеместно в пресных и соленых водоемах, в болотах, вулканических кратерах, в кишечнике теплокровных животных и т.п. Основная масса сероводорода на планете производится сульфатредуцирующими бактериями. Чистая культура сульфатредуцирующих бактерий была выделена Бейеринком в 1895 г.

Сероводород – токсическое вещество и сильный восстановитель, при окислении которого в воде и иловых отложениях поглощается кислород, и образуются анаэробные зоны. Кроме того, смещение электрохимического потенциала в кислую сторону приводит к порче промышленного оборудования и вызывает коррозии металлов.

Несмотря на широкое распространение сульфатредуцирующих бактерий и разработанные методы индикации и идентификации группы этих бактерий в

исследуемых субстратах, остается проблема определения видовой принадлежности бактериологическими методами. Связано это с тем, что бактерии сульфатредуцирующей группы являются, в большинстве своем, анаэробами и, осуществляя сульфатное дыхание, обеспечивающее минимальное количество энергии в сравнении с аэробным окислением субстратов, имеют продолжительный период культивирования. Культивирование некоторых видов бактерий, осуществляющих сульфатное дыхание, в среднем продолжается от 3 до 14 суток (Yumi A. Warren, 2005, Toshifumi Sakaguchi, Atsushi Arakaki and Tadashi Matsunaga, 2002). Идентификация бактерий сульфатредуцирующей группы основана в основном на использовании жидкой среды Постгейта В в различных ее модификациях, а также среды В3(США) (Sergey Stolyar, 2007).

Мы поставили перед собой задачи разработать плотную дифференциально-диагностическую среду для обнаружения и визуализации колоний сульфатредуцирующих бактерий.

Выделение чистых штаммов сульфатредуцирующих бактерий и изучение их биологических свойств.

В работе использовались основные методы работы с анаэробными микроорганизмами по Постгейту и Кембеллу (Campbell, Postgate, 1965; Postgate, Campbell, 1966). Культуры аэробных микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*. Пробы технической воды, закачиваемой в нефтяной пласт, и придонного ила с предполагаемым наличием бактерий сульфатредуцирующей группы.

Первоначально исследуемые пробы засеивали на среду Постгейта В.

Состав основной среды Постгейта В:

Калий фосфорнокислый однозамещенный KH_2PO_4 – 0,5 г	ГОСТ 4198-75
Аммоний хлористый NH_4Cl – 1,0 г	ГОСТ 3773-72
Кальций сернокислый 2-водный $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,0 г	ГОСТ 3210-77
Магний сернокислый 7-водный $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,0 г	ГОСТ 4523-77
Натрий молочнокислый $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$ – 3,5 г	ТУ 6-09-09-273-86
Натрий хлористый NaCl – 5,0 г	ГОСТ 4233-77
Все реактивы основной среды растворяют в 1 л водопроводной воды. Вносили добавки:	
Дрожжевой экстракт – 1 г	ТУ 6-09-3979-85
Железо (II) сернокислое 7-водное $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г	ГОСТ 4148-78
Натрий углекислый кислый NaHCO_3	ГОСТ 4201-79
Натрий сернистый 9-водный $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	ГОСТ 2053-77

Стерилизацию основной среды, добавок и других материалов проводили насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного в специально предназначенных для этого автоклавах.

Основную среду и добавки разливали в колбы не выше, чем на половину объема колбы и закрывали ватными пробками и бумажными колпачками. Стерилизацию основной среды проводили в автоклаве при избыточном давлении 0,1 МПа (температура 120 ± 2 °С), а добавок – при избыточном давлении 0,05 МПа. Время стерилизации должно составлять 30 мин.

Среда Постгейта В готовилась по прописи, затем разливалась в пробирки, остужалась до 40°С. После внесения проб, а также контрольная (не засеянная) пробирки закрывались резиновыми пробками и резко охлаждались под струей холодной воды. Культивирование проводили при 32°С в течение 4 суток.

После почернения осадка, которое происходит под воздействием образования сульфата железа в среде Постгейта В, изучали тинкториальные свойства образовавшегося осадка.

Далее из пробирок с почерневшей средой Постгейта В, по методу Дригальского, произведен посев на сконструированную нами плотную среду

следующего состава: сульфат железа, лактат, минеральные соли, агар-агар и аскорбиновую кислоту, для уменьшения парциального давления кислорода в среде. В анаэробных условиях посева на плотной среде культивировали, используя модифицированный нами метод Фортнера. На дно чашки Петри заливали мясопептонный агар и давали ему застыть в ламинарном шкафу. В крышку чашки Петри также заливали мясопептонный агар. После застывания дно чашки засеивали исследуемой пробой, а середину мясопептонного агара в крышке чашки культурой бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. После посева дно прикладывали к крышке и прижимали, при этом удаляя остатки агара из крышки. После прижатия пространство в крышке чашки Петри заливали стерильным парафином, с целью создания герметичности. Параллельно ставили контроль: чашки, засеянные пробой без сплошного газона культуры *Pseudomonas aeruginosa*. Чашку, засеянную только газонем *Pseudomonas aeruginosa*, и не засеянную чашку, а также чашку с культурой *Pseudomonas aeruginosa* в аэробных условиях. Суть метода заключается в том, что аэробная бактерия *Pseudomonas aeruginosa* используя кислород, в первые 12 часов роста, создает анаэробные условия, в которых могут развиваться строгие анаэробы, а слой парафина препятствует проникновению кислорода в чашку Петри.

Засеянные таким образом чашки инкубировали в термостате при температуре 30°C, в течение 96 часов (4 дня). Спустя 96 часов чашки были вскрыты. Во всех чашках, наблюдался скудный рост газона бактерий *Pseudomonas aeruginosa* по сравнению с контролем. Из имеющихся проб ила и технической воды на сконструированной нами среде мы получили 4 типа колоний, растущих в анаэробных условиях и меняющих цвет среды с серого на черный, за счет восстановления соли железа. Далее мы отивали колонии на жидкую среду и исследовали возможность роста этих бактерий в аэробных условиях – результат отрицательный.

Таким образом, разработана минеральная дифференциально-диагностическая среда для культивирования сульфатредуцирующих бактерий в анаэробных условиях. Получены культуры сульфатредуцирующих бактерий.

Литература

1. Biochemical Differentiation and Comparison of *Desulfovibrio* Species and Other Phenotypically Similar Genera.
2. Yumi A. Warren, Diane M. Citron, C. Vreni Merriam, and Ellie J. C. Goldstein *Journal of Clinical Microbiology*, August 2005, p. 4041-4045, Vol. 43, No. 8.
3. *Desulfovibrio magneticus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles Toshifumi Sakaguchi, Atsushi Arakaki and Tadashi Matsunaga *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2002), 52, 215–221.
4. Response of *Desulfovibrio vulgaris* to Alkaline Stress. Sergey Stolyar, Qiang He, Marcin P. et al. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Dec. 2007, p. 8944–8952.