Федеральное Государственное Образовательное Учреждение

Высшего Профессионального Образования

«Астраханский Государственный Технический Университет»

Кафедра Прикладной биологии и микробиологии

Курсовая работа

на тему: «Маслянокислые бактерии как продуценты кислот»

Астрахань 2007

**Содержание**

Введение

1. Особенности маслянокислого брожения

1.1. Механизм маслянокислого брожения

1.2. Бактерии, участвующие в маслянокислом брожении

1.3. Распространение маслянокислых бактерий

2. Объекты и методы исследования

3. Результаты исследования

Выводы

Список литературы

**Введение**

Маслянокислое брожение представляет собой процесс анаэробного разложения углеводов, пептонов, белков, жиров с образованием различных кислот, в том числе и масляной. Маслянокислые бактерии, осуществляющие данный процесс, играют главную роль в порче различных пищевых продуктов (сыра, сливочного масла, вина, уксуса). Основная роль масляной кислоты – это ее использование в промышленности с целью получения ацетона и бутанола при ацетонобутиловом брожении. Маслянокислое брожение используют также для получения масляной кислоты из крахмала. Масляную кислоту применяют в парфюмерии, она используется при мочке льна (Алешукина,2003).

Развиваясь в питательном субстрате, микроорганизмы вызывают сложные изменения органических веществ, в первую очередь углеводов. Превращения углеводов и некоторых других органических веществ в новые соединения посредством микроорганизмов называются брожениями (Родина,1963).

Целью настоящей работы явилось выделение из почвы маслянокислых бактерий – продуцентов масляной кислоты.

В задачи данного исследования входило:

1. Выделение маслянокислых бактерий садовой городской почвы г. Астрахани и изучение их морфологических свойств.

2. Выделение маслянокислых бактерий из модельной экосистемы и сравнение микробиологического состава садовой почвы, и почвы, изъятой из модельной системы при моделировании подтопления территорий в связи с поднятием уровня Каспийского моря.

**1. Особенности маслянокислого брожения**

**1.1 Механизм маслянокислого брожения**

Маслянокислое брожение представляет собой вариант решения донор - акцепторной проблемы на базе гликолитически образованного пирувата. Новое в маслянокислом брожении - возникновение реакций конденсации типа С2+С2 → С4, в результате чего образуется С4- акцепторная кислота. Судьба этой кислоты различна и определяется необходимостью акцептирования водорода с НАД-Н2, освобождающегося в процессе брожения, а это в свою очередь тесно связано с оттоком водорода на конструктивные процессы. В качестве конечных С4- продуктов в процессе брожения возникают соединения различной степени восстановления. Характерным С4- продуктом является масляная кислота. Осуществляют такой тип брожения многие бактерии, относящиеся к роду Clostridium. Типичными представителями клостридиев, осуществляющих маслянокислое брожение, являются C. butyricum и C. pasteurianum. Они сбраживают сахара с образованием масляной и уксусной кислот, СО2 и Н2О. Превращение глюкозы до пирувата осуществляется по гликолитическому пути. Следующая реакция- разложение пирувата до ацетил - КоА и СО2. , сопровождающееся образованием восстановленного ферредоксина (ФД). Реакция катализируется ферментом пируват: ферредоксиноксидоредуктазой и является ключевой в маслянокислом брожении. Особенности реакции - участие в ней белков, содержащих негемовое железо и кислотолабильную серу (FeS-белки).

Обнаруженный у C. pasteurianum рубредоксин имеет окислительно- восстановительный потенциал около -57 мВ и участвует в реакциях одноэлектронного переноса, в основе которого лежит переход железа: Fe2+ - Fe3+.

Клостридии содержат ферредоксины с 1-2 центрами Fe4S4 типа и молекулярной массой 6000-7000 Да.

Ферредоксины играют центральную роль в метаболизме клостридий, сопрягая катаболические процессы с биосинтетическими реакциями. Объясняется это тем, что у клостридий (как и других анаэробов) физиологические реакции в клетке всегда протекают при отрицательных окислительно-восстановительных потенциалах. В этих условиях белки, имеющие общий отрицательный окислительно-восстановительный потенциал, особенно пригодны для функционирования в составе ферментов и в качестве переносчиков электронов.

Дальнейшее превращение заключается в отщеплении от молекулы 3- оксибутирил-КоА молекулы воды, что приводит к образованию соединения с двойной углеродной связью. Кротонил-КоА ферментативно восстанавливается в бутирил-КоА. Масляная кислота образуется в реакции переноса кофермента А с молекулы бутирил-КоА на ацетат. Эта реакция более «выгодна» для клетки, так как не приводит к потере энергии (в отличие от реакции простого гидролиза). Образующийся в реакции ацетил - КоА возвращается в метаболический поток и может быть использован для синтеза АТФ или же вновь участвовать в последовательности реакций, ведущих к синтезу масляной кислоты.

Особо важное значение приобретает превращение ацетил - КоА, ведущее к синтезу ацетата, поскольку именно с этим путем связано дополнительное получение клостридиями энергии в процессе маслянокислого брожения. Процесс включает несколько ферментативных реакций. Сначала имеет место окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, катализируемое пируват ферредоксиноксиредуктазой. Далее с помощью гидрогеназы происходит выделение молекулярного водорода с восстановленного ферредоксина.

Гидрогеназы - одна из групп FeS- содержащих ферментов, катализирующих реакции поглощения и выделения молекулярного водорода, обнаружены у разных групп эубактерий облигатных анаэробов и аэробов, факультативных форм, у хемо - и фототрофных организмов. Различаются строением молекулы, природой доноров и акцепторов электронов, с которыми взаимодействуют, локализацией в клетке, выполняемыми функциями. Но все гидрогеназы катализируют реакцию Н2 → 2Н+ +2е-.

Гидрогеназа C. pasteurianum, один из наиболее детально изученных ферментов, - белок с молекулярной массой примерно 60 000 Да, представленный одной субъединицей. В молекуле содержатся три центра типа Fe4S4. Донором (акцептором) электронов клостридиальной гидрогеназы служит ферредоксин.

При разрушении клеток C. pasteurianum гидрогеназная активность проявляется только в растворимой фракции: в периплазматическом пространстве и цитоплазме. Гидрогеназа, локализованная в периплазматическом пространстве, катализирует необратимую реакцию поглощения Н2. Находящаяся в цитоплазме гидрогеназа способна катализировать реакции как поглощения,так и выделения Н2. У клостридий она входит в состав ферментного комплекса, осуществляющего окислительное декарбоксилирование пирувата.

Основная функция гидрогеназ клостридий (и других облигатных аэробов) заключается в избавлении от избытка образующихся в катаболических реакциях восстановительных эквивалентов (электронов), которые в переносятся на Н+ и удаляются из клетки в виде молекулярного водорода.

Гидрогеназы других эубактерий могут иметь более сложное строение: состоять из нескольких неидентичных субъединиц, содержать помимо FeS –центров флавины и в качестве простетических групп. Помимо ферредоксинов гидрогеназы разных организмов могут взаимодействовать с довольно широким набором переносчиков электронов: цитохромами с, НАД (Ф), хинонами и др.

В то время как поглощение Hа происходит только с участием гидрогеназ, выделение молекулярного водорода у эубактерий, способных к фиксации N2, наряду с гидрогеназой может катализироваться и нитрогеназой. Согласно одной из точек зрения, гидрогеназы возникли в результате усложнения структуры ферредоксинов.

Ацетил-КоА превращается в ацетилфосфат, а затем в ацетат, при этом синтезируется молекула АТФ. Две последние реакции аналогичны тем, которые происходят при образовании уксусной кислоты в пропионовокислом брожении.

Основным источником выделяемых при брожении газообразных продуктов (СО2 и Н2) служит реакция окислительного декарбоксилирования пирувата. У клостридиев описаны и другие пути образования молекулярного водорода. В частности, НАД - Н2, возникающий на гликолитическом пути, может восстанавливать ферредоксин в реакции, катализируемой НАД-Н2:ферредоксиноксидоредуктазой, а с восстановленного ферредоксина Н2 выделяется при участии гидрогеназы. Как видно, природа нашла различные пути для избавления от избытка восстановительных эквивалентов и для регенерирования и последующего возвращения в клеточный метаболизм промежуточных переносчиков водорода.

Выделение уравнения маслянокислого брожения и определение его энергетического выхода затруднительно из-за лабильности процесса, состоящего из двух основных ответвлений одного - окислительного, ведущего к образованию ацетата и АТФ, другого - восстановительного, функция которого - акцептирование водорода, образовавшегося в процессе гликолиза. Количественное соотношение между обоими ответвлениями зависит от многих внешних факторов (состав среды, стадия роста и др.).

Некоторые клостридии (C. acetobutyricum, C. bejerinckii, C. cellobioparum и др.) при сбраживании сахаров наряду с кислотами накапливают в среде нейтральные продукты (бутиловый, изопропиловый, этиловый спирты, ацетон). Особенно много нейтральных продуктов образуется культурой C. acetobutyricum, что дало основание в свое время выделить как вариант маслянокислого брожения ацетонобутиловое брожение. У клостридий, осуществляющих ацетонобутиловое брожение, образование масляной кислоты происходит на первом этапе брожения. По мере подкисления среды (до рН ниже 5) и повышения в ней концентрации жирных кислот индуцируется синтез ферментов, приводящих к накоплению нейтральных продуктов, в первую очередь н- бутанола и ацетона.

Физиологический смысл дополнительных ферментативных этапов у C. acetobutyricum, ведущих к накоплению в среде н-бутанола, этанола и ацетона, заключается в образовании конечных продуктов нейтрального характера.

Первоначально нейтральный рН среды вследствие накопления масляной и уксусной кислот быстро падает. Некоторые клостридии выработали механизм борьбы с нарастающей кислотностью, который начинает функционировать при низком рН среды и приводит к появлению перечисленных выше нейтральных продуктов. Одновременно происходит понижение общей кислотности среды, что также свидетельствует об активном противодействии этих бактерий неблагоприятным условиям.

Изучение физиологии группы клостридий, осуществляющих ацетонобутиловое брожение, привело к открытию В.Н. Шапошниковым (1884-1968) явления двухфазности этого процесса, которое позднее было обнаружено в большинстве типов брожений, характеризующихся сложным набором конечных продуктов. В основе явления двухфазности лежит тесная связь между конструктивными и энергетическими процессами. Вначале, когда имеет место активный рост культуры, сопровождающийся интенсивными биосинтетическими процессами, происходит значительный отток образующегося при брожении восстановителя для конструктивных целей. Это сопровождается преобладающим синтезом более окисленных конечных продуктов брожения (1 фаза). При затухании роста и переходе культуры в стационарное состояние уменьшается потребность в восстановителе для конструктивных целей. Последнее приводит к большему его использованию в энергетических процессах и, следовательно, к образованию более восстановленных конечных продуктов брожения (2 фаза). Таким образом, масштабы конструктивного метаболизма определяют характер и направление энергетических процессов. Метаболизирование части ацетоацетил-КоА через ацетоуксусную кислоту в ацетон приводит к определенной потере потенциальных акцепторов водорода, которые могли бы на пути к образованию масляной кислоты или н- бутанола присоединить соответствующее количество водорода с НАД-Н2.Однако этот путь является более коротким путем образования нейтральных продуктов, что, вероятно, для бактерий в определенных условиях выгодно. Кроме того, попыткой как- то компенсировать этот недостаток можно объяснить возникновение у некоторых видов клостридиев способности ферментативно восстанавливать ацетон ив изопропанол с использованием водорода с НАД-Н2 (Гусев, Минеева,2001).

**1.2 Бактерии, участвующие в маслянокислом брожении**

К клостридиям относят большое количество видов бактерий, число которых постоянно возрастает. Это один из самых крупных родов среди эубактерий. Принадлежность к роду определяется на основании только трех признаков:1)способности образовывать эндоспоры 2) облигатно анаэробного характера энергетического метаболизма 3) неспособности осуществлять диссимиляционное восстановление сульфата. Отсюда понятно, что эта группа эубактерий чрезвычайно гетерогенна, о чем, в частности, свидетельствует интервал значений ГЦ - оснований ДНК, молярное содержание которых с учетом описанных новых видов занимает область от 21 до 57%.

Из этого также можно сделать вывод, что организмы, объединенные в род Clostridium, нельзя рассматривать как эволюционно однотипные. Последующая характеристика их метаболических особенностей дает достаточно четкое представление об этом. Изучение эубактерий, относимых к клостридиям, наоборот, указывает на раннее расхождение видов рода в процессе эволюции. За исключением C. coccoides, вегетативные клетки бактерий из рода Clostridium имеют форму прямых или слегка изогнутых палочек с закругленными концами. Большинство видов грамположительные, подвижные. Движение осуществляется с помощью перитрихиально расположенных жгутиков. По мере старения в процессе цикла развития клетки теряют подвижность, накапливают гранулезу (запасное вещество типа крахмала) и переходят к спорообразованию. Образующиеся споры овальной или сферической формы. Диаметр их, как правило, превышает диаметр вегетативной клетки, поэтому, если, формирующаяся спора расположена в центре клетки, последние меняют форму, становясь веретеновидными; если же споры образуются у одного из клеточных концов, клетки приобретают форму барабанных палочек.

Клостридии - облигатные анаэробы. Однако спектр их чувствительности к молекулярному кислороду достаточно широк, что связано с обнаружением в клетках большинства клостридиев супероксиддисмутазы и с другими приспособлениями на уровне клеточных популяций, помогающими нейтрализовать токсические эффекты О2 и его производных. Именно при работе с клостридиями Л. Пастер в 1961г. открыл форму жизни без кислорода (Емцев, Мишустин, 2006).

В зависимости от вида сбраживаемого субстрата выделяют несколько физиологических групп клостридиев: сахаролитические клостридии, использующие в качестве субстратов брожения вещества углеводной природы (моносахара, крахмал, клетчатка); протеолитические клостридии, субстратами брожения которых являются белки, пептиды, аминокислоты пуринолитические клостридии, специфически приспособленные к сбраживанию гетероциклических соединений (пурины и пиримидины). Среди них есть виды, обладающие довольно широкими возможностями (субстратами брожения служат как углеводы, так и белки), и узкоспециализированные виды, способные использовать в качестве источника энергии и углерода какое-либо или очень небольшое число соединений.

Субстратом брожения сахаролитических клостридий является такие моносахара, как глюкоза, фруктоза, ксилоза и др. Некоторые виды могут использовать крахмал, целлюлозу, пектин, хитин, предварительно гидролизуемые соответствующими экзоферментами. Типичными представителями сахаролитических клостридий, осуществляющих классическое маслянокислое брожение, являются C. butyricum и C. pasteurianum.

Таблица 1. Основные продукты брожения некоторых сахаролитических клостридий, не образующих масляной кислоты.

|  |  |
| --- | --- |
| Организм | Основные продукты брожения |
| C. sphenoides , C. glycolicum | этанол, уксусная кислота, СО2, Н2 |
| C. cellobioparum |  |
|  | этанол, уксусная, муравьиная, молочная кислоты; СО2, Н2 |
|  | C. clostridioforme |
| этанол, муравьиная, уксусная, молочная кислоты; СО2, Н2 |  |
| C. oroticum | этанол; уксусная, молочная, муравьиная кислоты; СО2 |
|  | C. coccoides |
| янтарная, уксусная кислоты |  |
| C durum | этанол, пропанол; муравьиная, уксусная, молочная кислоты |
|  | C nexile |
| этанол; муравьиная, уксусная, молочная, янтарная кислоты; Н2 |  |
| С. quercicolum | уксусная, пропионовая кислоты, Н2 |
|  | C. ramosum |
| муравьиная, уксусная, молочная, янтарная кислоты |  |
| C. aceticum, C. thermaceticum, C. formicaceticum, C. spiroforme | уксусная кислота |
|  |  |

К протеолитическим относятся клостридии, имеющие активные протеолитические ферменты и поэтому способные использовать в качестве субстратов белки и пептиды, гидролизуя их до аминокислот и подвергая затем последние сбраживанию. В эту группу входят C. putrificum, C. histoliticum, C. sporogenes и другие сапрофитные виды. Близки к этим видам и некоторые патогенные формы: C. botulinum – продуцент ботулина – экзотоксина, являющегося одним из самых сильных биологических ядов; C. tetani – столбнячная палочка, образующая в организме человека столбнячный токсин. К протеолитическим клостридиям примыкают виды, использующие в качестве источника углерода и энергии ограниченное число свободных аминокислот. Например, C. cochlearium растет только на среде с глутаминовой кислотой, глутамином и гистидином; C. sticklandii может сбраживать лизин, аргинин, фенилаланин, серин, а C. propionicum – треонин, аланин, серин, цистеин.

С жизнедеятельностью клостридий связаны различные процессы, протекающие в природе: разложение (гниение) азотсодержащих соединений (белков, нуклеиновых кислот) в анаэробных условиях; анаэробное разложение растительных материалов, таких как клетчатка, хитин. Некоторые сахаролитические клостридии могут использовать в качестве субстрата брожения пектиновые вещества, составляющие покровы растительных клеток. Пектин — полимер метил-D-галактуроновой кислоты. Последняя имеет сложное строение и при воздействии на нее пектиновыми ферментами гидролизуется на ряд сахаров, кислот и метиловый спирт. Клостридии, принадлежащие к виду C felsineum, содержат активную пектиназу и могут, поэтому получать энергию, осуществляя маслянокислое брожение пектиновых веществ. Этот вид играет важную роль в процессе мацерации волокон при мочке льна.

Еще в конце прошлого века было обнаружено, что некоторые клостридии патогенны, т. е. вызывают заболевания человека и животных. В основе патогенности клостридиев лежит их способность синтезировать и выделять из клетки высокоэффективные токсины.

К возбудителям маслянокислого брожения относится в первую очередь вид Clostridium saccharobutyricum (Granulobacter saccharobutyricum). Клетки его цилиндрической формы, длиной от 4-5 до 7-12 мкм и толщиной от 0,5 до 1-1,5мкм, подвижные, спорообразующие. Перед образованием спор в них накапливается гранулеза. Спора появляется чаще в центре клетки, последняя возле споры расширяется (клостридий). Иногда спора располагается на конце клетки, форма которой приобретает вид ракетки (плектридий). Споры довольно устойчивые, они могут выносить непродолжительное кипячение в течение 1-2 мин.

Clostridium saccharobutyricum - облигатный анаэроб, с оптимальной температурой развития 30-40оС, сбраживает многие углеводы и близкие к ним соединения с обильным выделением водорода и углекислоты при одновременном накоплении масляной кислоты. Последняя этими бактериями не потребляется. С.Н. Виноградским описан возбудитель маслянокислого брожения Clostridium pasteurianum, способный усваивать атмосферный азот. По многим признакам он сходен с предыдущим видом, но отличается от него биохимическими особенностям - он не сбраживает крахмал. К маслянокислым бактериям относится также вид Clostridium butyricum и некоторые другие представители. По отношению к источникам азота Маслянокислые бактерии весьма неприхотливы: они усваивают белковый, аминокислотный и аммонийный азот, а некоторые используют азот воздуха.

Маслянокислые бактерии являются также возбудителями ацетонобутилового брожения, анаэробного брожения клетчатки и брожения пектиновых веществ.

Ацетонобутиловое брожение представляет собой превращения углеводов бактериями с образованием ацетона и бутилового спирта. При этом брожении, кроме ацетона и бутилового спирта, вырабатываются также масляная и уксусная кислоты, водород и углекислый газ. Суммарно данное брожение можно выразить следующим уравнением:

12 С6Н12О6 → СН3СН2СН2СН2ОН + 4СН3СОСН3 + СН3СН2ОН + СН3СН2СН2СООН + 18Н2 + 28СО2 + 2Н2О + Х кДж

Механизм ацетонобутилового брожения

Химизм ацетонобутилового брожения еще недостаточно выяснен. В последнее время для изучения его используют метод меченых атомов. В бродящую среду вводят промежуточные продукты брожения (уксусную, ацетоуксусную и масляную кислоты), содержащие углерод С13, а затем определяют наличие этого углерода в конечных продуктах. Этим способом установлено, что при добавлении уксусной кислоты с С13 около 50% всего меченого углерода содержится в бутиловом спирте, около 15%- в ацетоне, до 18% - углекислом газе. При добавлении масляной кислоты, содержащей С13, около 85% меченого углерода переходит в бутиловый спирт. Он найден также в этиловом спирте, в уксусной и масляной кислотах. Исходя из этих данных, считают, что образование бутилового спирта идет главным образом через масляную кислоту. Кроме того, полагают, что ацетон образуется через масляную кислоту.

В химизме ацетонобутилового брожения имеется много общего с маслянокислым, а частности, первые стадии до образования ацетольдоля протекают подобно маслянокислому брожению. Далее между двумя молекулами ацетальдоля протекает окислительно – восстановительная: оксимасляная кислота и оксибутиловый спирт по следующему уравнению: реакция, в результате которой образуются два соединения: β - оксимасляная кислота и β - оксибутиловый спирт по следующему уравнению:

2СН3СНОСН2СНО + Н2О → СН3СНОНСН2СООН + СН3СНОНСН2СН2ОН

β - Оксимасляная кислота далее отщепляет водород и переходит в ацетоуксусную кислоту, которая затем распадается на ацетон и углекислый газ:

СН3СНОНСН2СООН → СН3СОСН2СООН → СН3СОСН3 + СОв –

оксибутиловый спирт подвергается восстановлению до n - бутилового спирта согласно уравнению:

CН3СНОНСН2СН2ОН + Н2 → СН3СН2СН2СН2ОН + Н2О

Часть уксусного альдегида, по-видимому, также вовлекается в окислительно-восстановительную реакцию с образованием уксусной кислоты и этилового спирта:

СН3СНО + СН3СНО + Н2О →СН3СООН + СН3СН2ОН

В ацетонобутиловом брожении наблюдаются две фазы: первая - кислотная, во время которой усиленно размножаются бактерии, а в среде накапливаются масляная и уксусная кислоты, и вторая - ацетонобутиловая, в ней уменьшается кислотность и происходит усиленное накопление ацетона, бутилового и этилового спиртов. В зависимости от условий брожения, т. е. подавляя какую – либо фазу брожения, можно получить усиленное накопление тех или иных продуктов. Следовательно, ацетонобутиловое брожение отличается от маслянокислого: при маслянокислом брожении накапливающиеся кислоты постепенно замедляют процесс кислотообразования и даже останавливают его, а при ацетонобутиловом – образовавшиеся кислоты потребляются бактериями и превращаются в другие вещества.

Первый возбудитель ацетонобутилового брожения выделен в 1911 г. Бейеринком. Он получил название Granulobacter butyricum. Более активным возбудителем этого брожения явился вид Clostridium acetobutyricum. Клетки его по морфологическим признакам сходны с маслянокислыми бактериями. Это подвижные, грамположительные, палочки со спорами, развивающиеся в анаэробных условиях. Спорообразование - клостридиальное. В клетках накапливается гранулеза. По биохимическим свойствам данный вид сильно отличается от маслянокислых бактерий. Начиная с 1923 г. ацетонобутиловые бактерии используются в промышленных масштабах для получения ацетона и бутилового спирта из крахмалистого сырья и мелассы.

Среди возбудителей маслянокислого брожения встречаются такие культуры, которые способны вызывать брожение клетчатки. Способность анаэробных микроорганизмов разрушать клетчатку впервые была установлена в 1875г. Л. Поповым, а сущность этого процесса раскрыта в 1889- 1902 гг. В. Л. Омелянским, который выделил две разновидности целлюлозоразрушающих бактерий. Одна из них вызывает водородное брожение клетчатки Bac. cellulosae hydrogenicus ,а вторая – метановое Bac. cellulosae metanicus. У этих бактерий морфологических различий почти не наблюдается. Молодые формы - необычайно тонкие, прямые, иногда слегка изогнутые палочки, толщиной от 0,3 до 0,5 мкм и длиной от 4 до 8 мкм. По мере развития палочки удлиняются и достигают 10-15 мкм, затем на их конце их образуются споры. При этом клетки приобретают форму барабанной палочки. Со временем спора в виде круглого тельца освобождается от клетки. Одним из существенных морфологических различий между водородными и метановыми бактериями является разная способность к спор к прорастанию. Споры возбудителя метанового брожения прорастают намного быстрее спор водородного брожения.

Химизм этого брожения сложен, так как целлюлозоразлагающие бактерии сначала переводят углеводы в растворимые сахара, которые затем частично сбраживают главным образом до масляной и уксусной кислот. Из других продуктов эти бактерии продуцируют спирт, муравьиную и молочную кислоты, а также выделяют газы - водород или метан (в зависимости от культуры) и углекислый газ.

При водородном брожении газообразные вещества - водород и углекислота - составляют примерно 1/3 массы разложившейся клетчатки. При метановом брожении газообразных веществ (метана, углекислоты) получается больше, они составляют примерно половину массы разложившейся клетчатки.

Возбудители водородного и метанового брожения наряду с клетчаткой способны сбраживать соли масляной, молочной, муравьиной и других кислот, накапливающиеся при брожении клетчатки. В результате такого процесса в анаэробных условиях достигается полная минерализация клетчатки - наиболее сложного и устойчивого полисахарида. В последнее время установлено, что возбудители маслянокислого брожения клетчатки являются активными продуцентами витамина В12. Это свойство их используется для промышленного получения кормового витамина В12.

Пектиновые вещества входят в состав тканей растений. Являясь составной частью клеточной оболочки, они как бы склеивают клетки между собой, образуя межклеточные пластинки. Они находятся в значительном количестве в некоторых органах растений, например, в листьях, в мякоти плодов, ягод, корнеплодов, в кожице цитрусовых и во многих других.

Пектиновые вещества в природе минерализуются микроорганизмами, обладающими ферментами протопектиназой (пектазой) и полигалактуроновой (пектиназой). Фермент протопектиназа расщепляет в пектине связи между метоксилированной полигалактуроновой кислотой и связанным с ней арабаном. Освободившаяся при этом метоксилированная полигалактуроновая кислота (растворимый пектин) под действием пектинэстеразы гидролизуется с образованием метилового спирта и полигалактуроновой кислоты.

Полигалактуроновая кислота подвергается также действию другого фермента - полигалактуроназы микроорганизмов (бактерий и плесневых грибов). Этот фермент гидролизует гликозидные связи между остатками галактуроновой кислоты, не содержащими метоксильных групп. Галактуроновые кислоты наряду с другими соединениями гидролизуются и используются микроорганизмами в качестве источника углерода. В результате гидролиза пектина образуются продукты: галактуроновая кислота, галактоза, арабиноза, ксилоза, уксусная кислота и метиловый спирт. Некоторые из них – моносахариды – используются этими же пектинразлагающими микроорганизмами, так арабиноза сбраживается ими до масляной кислоты и углекислоты, а из галактозы наряду с масляной и угольной кислотами выделяется водород (Емцев, Мишустин, 2006).

Среди пектинразлагающих микроорганизмов известны бактерии вида Clostridium pectinovorum, которые вызывают маслянокислое брожение пектиновых веществ (описаны Бейеринком в 1902 г.). Они представляют собой сравнительно крупные, подвижные, грамположительные палочки длиной 10-15 мкм и шириной 0,8 мкм. В клетках образуются споры, которые располагаются на утолщенных концах. Относятся эти бактерии к облигатным анаэробам. При сбраживании пектиновых веществ они накапливают масляную и уксусную кислоты, водород и углекислый газ. При соответствующих условиях брожения могут вырабатывать, кроме основных продуктов брожения, бутиловый спирт и ацетон.

Возбудителем пектинового брожения является также Clostridium felsineum. Микроорганизм выделен итальянским исследователем Карбонэ в 1916 г. из стеблей конопли. По форме клеток – споровая палочка одиночная или соединенная в короткие цепочки размерами 3/ 5 \* 0,3 мкм. Споры располагаются на конце (барабанная палочка), но иногда бывают и в центре клетки. Культура обладает сравнительно высоким температурным оптимумом. Она сбраживает пектиновые вещества с образованием преимущественно уксусной кислоты и совершенно не продуцирует масляной.

Кроме описанных представителей, известны еще и некоторые другие, которые, разлагая пектиновые вещества, сбраживают продукты гидролиза (арабинозу, галактозу и др.) по типу маслянокислого или ацетонобутилового брожения.

Брожение пектиновых веществ нашло применение в хозяйственно-технической деятельности человека, в частности, для получения прядильных волокон из льна, конопли и других волокнистых растений путем мочки их в естественных водоемах.

Для ускорения и улучшения процесса освобождения волокон мочку сырья производят в бассейнах. При этом способе применяют специально выращенные культуры бактерий. Процесс ведут при температуре 26-28оС в течение 5 суток вместо 1,5-2 недель в естественных водоемах.

Анаэробные бактерии рода Clostridium были открыты Л. Пастером в 1861 г. Ученый обнаружил, что некоторые представители данного рода сбраживают углеводы с образованием масляной кислоты. Сейчас среди представителей Clostridium насчитывается более 80 видов бактерий. Они имеют палочковидные клетки, обычно подвижны, передвигаются при помощи перитрихальных жгутиков. У видов рода образуются споры, имеющие овальную или сферическую форму; они терморезистентны. Как правило, споры раздувают клетку. Грамположительные. Облигатные анаэробы (Богданов и др., 1968).

Род включает психрофильные, мезофильные и термофильные виды. Температурный оптимум для роста большинства мезофильных видов лежит в диапазоне 30-40оС. Для термофильных видов температурный оптимум составляет 60-75оС. Оптимальная реакция среды для клостридий - нейтральная или слабощелочная. Хемоорганогетеротрофы. Клостридии сбраживают сахара, многоатомные спирты, аминокислоты, пурины и пиримидины, другие органические соединения. Ряд видов способен к фиксации молекулярного азота атмосферы. Места обитания клостридий - почва, водоемы, а также пищеварительный тракт человека и животных.

Все виды рода объединены в группы в зависимости от способности сбраживать те или иные органические соединения.

Первая группа - сахаролитические виды Clostridium, сбраживающие главным образом растворимые углеводы, крахмал или пектин с образованием бутирата, ацетата, СО2 и Н2. Брожение при участии некоторых микроорганизмов группы приводит к образованию из сахаров дополнительных нейтральных соединений (бутанола, пропанола, ацетона, небольших количеств этанола). В группу входят бактерии, вызывающие маслянокислое и ацетонобутиловое брожения: C.butyricum, C. pasteurianum, C. tyrobutyricum, C. butylicum, C acetobutyricum и др. Возможно, к ней можно отнести и ряд видов – высокоспециализированных агентов анаэробного разрушения целлюлозы, причем главные конечные продукты брожения - этанол, ацетат и сукцинат, СО2 и Н2.

Вторая группа - протеолитические виды, сбраживающие аминокислоты. Обладают сильными протеолитическими свойствами и способны к интенсивному гидролизу белков с последующим сбраживанием аминокислот. Рост микроорганизмов в средах с белком сопровождается образованием аммиака, СО2, Н2, жирных кислот, и большого количества летучих соединений с неприятным запахом. К группе относятся виды: C. sporogenes, C. perfringens, C. histoliticum, C. botulinum и др. Многие представители рода Clostridium, сбраживающие аминокислоты, способны также к сбраживанию углеводов.

Третья группа - виды сбраживающие азотсодержащие циклические соединения - пурины и пиримидины. Пурины (гуанин, гипоксантин, ксантин и др.) под влиянием C. acidi- urici, C. cylindrosporum превращаются в аммиак, ацетат и СО2. C. uracilicum, C. oroticum сбраживают пиримидины, при этом урацил распадается до в- аланина, СО2 и NН3, а оротовая кислота- до уксусной кислоты, СО2 и NН3.

Четвертая группа включает всего один вид - C. kluyveri, сбраживающий смесь этанола с ацетатом до бутирата и капроновой кислоты, а также небольшого количества водорода.

**Получение витамина В12 с помощью пропионовокислых бактерий**

В настоящее время для получения витамина В12 используют следующие микроорганизмы Prop. freudenreichii ATCC 6207, Prop. shermanii ATCC 13673, Prop. shermanii BKM-103 и их варианты и мутанты. Наибольший интерес представляют разложение клетчатки.

**1.3 Распространение маслянокислых бактерий**

Наиболее распространенным углеродным соединением в природе является целлюлоза. Целлюлоза составляет от 15 до 60% массы растений, в хлопке и льне ее содержание достигает 80-95%.

Разложение целлюлозы микроорганизмами является самым большим по масштабам естественным деструкционным процессом, звеном круговорота углерода, обеспечивающего возврат фиксированного в процессе фотосинтеза углерода в атмосферу в виде СО2.

Глобальная роль микроорганизмов в этом процессе определяется тем, что ни животные, ни растения, как правило, не способны разлагать целлюлозу. Трансформация целлюлозоразрушающих соединений в природе происходит в разных условиях аэрации, температуры, рН среды.

В природе разложение целлюлозы - это сложный, комплексный процесс, происходящий при участии сообщества микроорганизмов, в состав которого входят микроорганизмы, разлагающие целлюлозу, и микроорганизмы-спутники, использующие продукты распада.

В анаэробных условиях разложение целлюлозы осуществляется анаэробными бактериями рода Clostridium. При этом образуется много органических кислот (уксусная, янтарная, молочная, муравьиная) этиловый спирт, углекислый газ и водород.

В отличие от анаэробного разложения целлюлозы, который осуществляется только бактериями, в аэробных условиях клетчатку разлагают многие микроорганизмы разных систематических групп: бактерии, миксобактерии, актиномицеты, грибы.

В кислых лесных почвах главная роль в превращении целлюлозы принадлежит грибам (р. Trichoderma, р. Aspergillus, р. Penicillium и др., базидиальные грибы).

В почвах под травянистой растительностью, в степных и луговых ландшафтах в разложении целлюлозы помимо грибов участвуют миксобактерии, актиномицеты, вибрионы р.Cellvibrio.

Разложение целлюлозы до глюкозы микробными ферментами протекает в несколько стадий и требует участие сложного ферментного комплекса, включающего не менее четырех ферментов.

В анаэробных условиях глюкоза сбраживается в основном по типу маслянокислого брожения. В аэробных условиях глюкоза окисляется микроорганизмами до оксикислот, а затее до конечных продуктов - углекислого газа и воды.

Этот фермент гидролизует гликозидные связи между остатками галактуроновой кислоты, не содержащими метоксильных групп. Галактуроновые кислоты наряду с другими соединениями гидролизуются и используются микроорганизмами в качестве источника углерода. В результате гидролиза пектина образуются продукты: галактуроновая кислота, галактоза, арабиноза, ксилоза, уксусная кислота и метиловый спирт. Некоторые из них – моносахариды – используются этими же пектинразлагающими микроорганизмами, так арабиноза сбраживается ими до масляной кислоты и углекислоты, а из галактозы наряду с масляной и угольной кислотами выделяется водород (Емцев, Мишустин, 2006).

**Получение витамина В12 с помощью пропионовокислых бактерий**

В настоящее время для получения витамина В12 используют следующие микроорганизмы Prop. freudenreichii ATCC 6207, Prop. shermanii ATCC 13673, Prop. shermanii BKM-103 и их варианты и мутанты. Наибольший интерес представляют штаммы, способные к самостоятельному синтезу 5,6 ДМБ. Поскольку синтез 5,6 ДМБ лучше происходит при доступе воздуха, осуществляют двустадийный процесс, в котором получают наиболее высокий выход продукта. На 1-й стадии культуру выращивают в анаэробных условиях до полной утилизации сахара. На 2-й стадии включают аэрацию, тем самым создавая условия для синтеза 5,6 ДМБ и превращения этиокобаламина в дезоксикобаламин. Обе стадии осуществляют в двух разных ферментерах или в одном. Анаэробно выросшие клетки можно собрать путем центрифугирования и инкубировать густую суспензию на воздухе и, если нужно, в присутствии 5,6 ДМБ и цианида. Добавление ДМБ производят только во 2-й стадии ферментации (если бактерии не синтезируют его самостоятельно), поскольку в его присутствии образуются полные формы витамина, ингибирующие его синтез. Среда для ферментации обычно содержит глюкозу или инвертированную мелассу (10-100 г/л), небольшие количества солей Fe, Mn и Mg, а также Со (10-100 мг/л), источники азота [(Nl-UhSCU]. В среду добавляют кукурузный экстракт (30-70 г/л), содержащий молочную и пантотеновую кислоты, усиливающие рост бактерий. Пантотеновую кислоту, стимулирующую также синтез витамина, рекомендуют вносить в среду дополнительно. Бактерии культивируют при 30о, поддерживая рН на уровне 6,5-7,0 путем введения (NH4)OH. Ферментацию производят в ферментерах на 500 л, содержащих 340 л среды, инокулированных 7 л посевного материала. В первые 80 ч культура растет под небольшим давлением N2 и слабым перемешиванием (без аэрации), в следующие 88 ч включают аэрацию (2 м3/ч) и перемешивание. Возможны некоторые вариации в культивировании. Витамин В12 сохраняется в клетках бактерий, поэтому проводят его экстракцию:

1) выделение витамина из клеток и превращение его в цианокобаламин;

2) выделение неочищенного продукта (80% чистоты), который можно использовать в животноводстве;

3) дальнейшую очистку до уровня 91-98% (для медицинских целей).

Для экстракции витамина из клеток последние нагревают при 80о-120оС в течение 10-30 мин при рН 6,1-8,5. Превращение в CN-кобаламин достигают, обрабатывая горячий раствор или клеточную суспензию цианидом или тиоционатом, часто в присутствии NaNO2 или хлорамина В. Корриноиды сорбируют на различных носителях: амберлите IRC-50, А12О3, активированном угле и элюируют водными спиртами или водно-фенольными смесями. Из водных растворов корриноиды экстрагируют фенолом или крезолом или смесью этих спиртов с бензином, бутанолом, углеродистым тетрахлоридом или хлороформом.

При упаривании различных растворителей получают осадок или кристаллы витамина, которые растворяют в соответствующем растворителе до нужной концентрации. Выход витамина B12 при использовании пропионовокислых бактерий - 25-40 мг/л. Но есть патентное сообщение (Франция) о достижении невероятно высокого выхода - 216 (Емцев, Мишустин, 2006).

**Глава 2**

**2.1 Объекты и методы исследований**

Объектом настоящего исследования является почва, отобранная в парковой зоне в районе АГТУ. Почва рассыпчатая, коричневого цвета, сильно гумусированная, не подвергающаяся антропогенному воздействию.

Для взятия проб почвы использовали стерильную посуду и лопату. Почву отбирали с поверхностного слоя, глубиной не более 2 см. и помещали в полиэтиленовые пакеты. Отбор проб производился в марте 2007 г.

**Методы стерилизации.** При любой микробиологической работе: при посевах, выделении, пересевах, сохранении чистых культур - используются стерильные среды, стерильная посуда, стерильные инструменты, чтобы предотвратить возможность попадания посторонней микрофлоры.

Стерилизация - один из важных и необходимых приемов в микробиологической технике. Слово «стерилизация» в переводе с латинского (sterilis) означает обеспложивание. В микробиологии под стерилизацией понимают гибель всех живых микроорганизмов. В микробиологической практике стерилизуют питательные среды, посуду, инструменты и другие необходимые материалы, чтобы не допустить развития посторонней микрофлоры.

Посуду перед стерилизацией тщательно моют, сушат и завертывают в бумагу для сохранения стерильности после прогревания.

Каждую пипетку заворачивают отдельно в длинные полоски бумаги, шириной 4-5 см. В концы пипеток, которые предварительно вставляют ватные тампоны. Обмотку начинают с противоположного конца постепенным движением бумаги по спирали и оканчивают у конца с тампоном. Завернутые пипетки для предохранения бумаги от загрязнения и разрывов заворачивают по несколько штук вместе или помещают в специальные металлические или картонные пеналы. Шпатели обертывают по отдельности аналогично пипеткам, используя для обмотки полоски бумаги большей ширины. Чашки Петри заворачивают вместе по 2-4 штуки. Колбы, пробирки и другие сосуды закрывают ватными пробками, а сверху бумажными салфетками.

**Стерилизация посуды.** Для получения стерильной посуды используется стерилизация сухим жаром. Она производится нагреванием в течение 2 часов при температуре 170оС в печи Пастера или в электросушильных шкафах (с нагревом до 200о С).

При отсутствии сушильных шкафов, стерилизация посуды может быть произведена на автоклаве или в духовом шкафу плиты (побурение бумаги показывает достаточность нагрева).

Вся посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта, высушена и завернута в бумагу. Баллоны, склянки, трубки, пипетки заворачивают в бумагу поодиночке, и в этой бумаге они сохраняются до момента использования. Чашки Петри могут быть завернуты по 2—3 вместе. Пипетки перед стерилизацией затыкают с широкого конца ватой и заворачивают (закатывают) в узкие, длинные ленты бумаги, начиная с оттянутого кончика.

Пробирки должны быть закрыты ватными пробками. Для заворачивания посуды при стерилизации и сушильном шкафу лучше пользоваться тонкой бумагой (лимонной или папиросной), при стерилизации в автоклаве — газетной (которая не размокает). Нельзя стерилизовать посуду, закрытую притертыми пробками.

Для получения стерильных игл, петель при производстве посевов, взятии материала из культур для приготовления мазков пользуются стерилизацией прокаливанием на пламени. При этом па пламени (спиртовки, газовой горелки) подвергают кратковременному обжиганию горлышки пробирок, колб, пробки и т. д.

Стерилизация автоклавированием применяется, главным образом, для стерилизации питательных сред. Этот способ основан на прогревании насыщенным паром при давлении выше атмосферного, т. е., при температуре выше 100оС и осуществляется в специальных аппаратах- автоклавах.

Совместное действие высоких температур и пара обеспечивает надежность стерилизации - гибель вегетативных клеток и спор микроорганизмов. Автоклавирование проводят при различных режимах, при дополнительном давлении 50,100,200 кПа (Градова и др., 2001).

**Приготовление питательных сред.** При составлении питательных сред необходимо учитывать потребность микроорганизмов в элементах питания. По составу среды подразделяют на две группы: естественные и синтетические.

С.Н. Виноградским в практику микробиологии введены элективные (избирательные среды для определенных групп микроорганизмов, обеспечивающие преимущественное развитие одного вида или группы родственных микроорганизмов и менее пригодные или совсем не пригодные для развития других.

Зная физиологические особенности соответствующей группы микробов, можно подобрать такие условия культивирования, при которых будут развиваться лишь представители этой группы. Применяют питательные среды различной консистенции: плотные, жидкие, полужидкие (Теппер и др., 1987).

**Для выделения маслянокислых бактерий** используется среда Виноградского (г/л):KH2PO4- 1,0 г.; MgSO4 \* 7H2O –0,5 г.; NaCl – 0,5 г.; MnSO4- 0,01 г.; Fe2 (SO4)3\*9H2O- 0,01 г.; CaCO3- 20г.; KNO3- 4г.; дистиллированная вода - 1л.

При посеве исследуемой почвы 1 г. растертой стерильным пестиком в ступке почву помещали в пробирку с 10 г. стерильной воды. Затем производили ряд последовательных разведений; 10-1 - 10-7 разведения разливали по 1 мл в большие стерильные пробирки методом глубинного посева. В полученную культуральную жидкость заливали жидкую среду Виноградского до ¾ объема. Пробирки со средами помещают в водяную баню при 80оС на 10-15 мин., так как при кипячении в культуральной жидкости создаются анаэробные условия. Посевы помещают в термостат при температуре 30-35 ос. Инкубация производится в течение 2-3 дней.

При исследовании культуральных признаков обращают внимание на следующие признаки:

1. Изменение цвета среды (изначально среда прозрачная). Цвет меняется от желтого до коричневого.
2. Образование осадка
3. Появление мути.
4. Образование пленки.

Культуру отбирают из середины столбика жидкости и эту каплю помещают на середину предметного стекла, накрывают покровным стеклом и к краю предметного стекла подносят пипетку с раствором Люголя. К другому краю - фильтровальную бумагу, которая засасывает раствор под покровное стекло.

При микроскопировании препарата хорошо видны клетки клостридий с потемневшим содержанием, так как перед спорообразованием в клетках накапливается много гранулезы, которая при взаимодействии с Люголем дает темное окрашивание (Теппер и др., 1987).

**Микроскопирование маслянокислых бактерий.** Питательную среду из колбы Вюрца или пробирки берут пипеткой, закрыв указательным пальцем верхний конец и погрузив ее в средний слой сброженной жидкости. Слегка приподняв палец, набирают в пипетку жидкость, снова зажимают пальцем верхний конец пипетки и, вынув ее из колбы, наносят каплю на предметное стекло. К накопительной культуре добавляют каплю раствора Люголя и накрывают покровным стеклом, на которое помещают каплю кедрового масла. При микроскопировании препарата обнаруживаются клетки, в которых можно заметить овальные тельца, сильнопреломляющие свет (споры). В тех местах клетки, где содержится гранулеза, возникает сине- фиолетовое окрашивание. Зарисовывают только окрашенные клетки, явно относящиеся к группе маслянокислых бактерий.

**При постановке накопительной культуры целлюлозоразлагающих аэробных бактерий** используют среду Гетченсона. Слой среды Гетченсона-1 см. Вносят 0,5 -1 г. почвы и на кончике шпателя – мел. Колбу закрывают ватной пробкой, помещают в термостат на 10-14 суток. Бумага становится ослизненной и распадается, конус оседает на дно.

**Для получения целлюлозоразрушающих аэробных бактерий** используют среду (г/л): КН2РО4-0,1; NaCl -0,1; CaCl2-0,1; TeCL3-0,1; MgSO4 \*7Н2О- 0,3; NaNO3-2,5; агар-агар -2%.

Среду разливают в чашки Петри и на поверхность накладывают фильтровальную бумагу, нарезанную по размеру чашки Петри и предварительно тоже простерилизованную.

Стеклянной палочкой с оттянутым концом на поверхность фильтра раскладывают параллельными рядами комочки почвы на расстоянии 1см. (по трафарету). Засеяны чашки Петри помещают в эксикатор над водой и ставят в термостат при 25-30оС.

Через 10-14 суток вокруг комочков почвы развиваются комочки целлюлозоразлагающих микроорганизмов в виде желтых, зеленых, оранжевых и коричневых пятен. В местах образования колоний фильтровальная бумага разлагается, ослизняется, становится прозрачной. По морфологии можно дифференцировать колонии плесневых грибов, актиномицетов и бактерий. Принимая общее число высеянных комочков почвы за 100%, можно подсчитать в процентах число комочков почвы, давших колонии целлюлозоразлагающих микроорганизмов. Из зон разрушения клетчатки готовят препарат « раздавленная капля» и описывают выделенные различные целлюлозоразрушающие микроорганизмы.

**Микроскопирование целлюлозоразлагающих бактерий.** Извлекают пинцетом со дна колбы кусочек разлагающейся бумаги и размазывают на предметном стекле без добавления воды. Мазок сушат обычным способом, фиксируют на пламени горелки и окрашивают фуксином.

**Для накопительной культуры анаэробных целлюлозоразрушающих бактерий** используют среду, предложенную Имшенецким: мясопептонный бульон - 500 мл, СаСО3 – 2 г, фильтровальная бумага-15 г, водопроводная вода- 0,5 л.

Среду разливают высоким слоем в высокую пробирку. На дно опускают нарезанную полосками фильтровальную бумагу. Пробирки закрывают ватными пробками, затем пробирки стерилизуют и засевают комочком почвы или навоза. Инкубируют в течение суток в термостате при 30-35оС для обнаружения мезофильных бактерий и при 60оС – для поиска термофильных бактерий.

Через 3-4 суток при 60оС в пробирках начинается процесс разрушения клетчатки, жидкость пенится, выделяется газ. Полоски фильтровальной бумаги желтеют, ослизняются, постепенно превращаясь в аморфную массу и оседают на дно. При 30-35оС разрушение клетчатки происходит медленнее. Разрушенные массы клетчатки подвергаются микроскопическому анализу. Готовят фиксированный препарат – окрашивание фуксином (Родина, 1968).

Маслянокислое брожение крахмала исследуют на среде с картофелем. Сырой неочищенный картофель нарезают мелкими кубиками, заполняют ими 1/3 высокой пробирки, добавляют немного мела, заливают водопроводной водой на 2/3 и помещают в водяную баню при 80о на 19 мин для пастеризации. В среду не вносят ни почвы, ни маслянокислых бактерий, так как на кожуре картофеля всегда есть их споры. Элективные условия создают: крахмалом- источником углерода, используемым только микроорганизмами, содержащими фермент амилазу; пастеризацией; анаэробиозом (высокий столбик жидкости в пробирке и выделение в процессе брожения СО2 и Н2, вытесняющих воздух). Через 2-3 дня картофель всплывает вследствие бурно идущего газообразования. По окончании брожения культуральную жидкость используют для исследования морфологии маслянокислых бактерий и качественного определения продуктов брожения.

**Качественная реакция на масляную кислоту.** Получение маслянокислого железа (реакция с FeCl3). Нейтральные растворы маслянокислых солей при нагревании с FeCl3 приобретают коричневое окрашивание вследствие образования маслянокислого железа. В пробирку наливают 3-5 мл сброженной жидкости, добавляют 1-2 мл 5%- ного хлорида железа и нагревают на пламени. Реакция идет по уравнению:

3Ca (CH3CH2CH2COO) 2 + 2Fe2Cl3 → 2Fe (CH3CH2CH2COO) 3 + 3CaCl2

Раствор маслянокислого железа в отраженном свете приобретает буровато-коричневое окрашивание, а в проходящем свете - кроваво-красное.

**Техника посева культур микроорганизмов.** В лабораторных условиях микроорганизмы выращивают на твердых и жидких средах в пробирках, колбах или в чашках Петри.

Посевом в микробиологии называется внесение клеток микроорганизмов (посевного материала – инокулята) в стерильные среды.

Пересев- это перенос выращенной культуры микроорганизмов на питательной среде на другую свежую питательную среду.

Посев (и пересев) микроорганизмов проводят при соблюдении определенных правил стерильности, которые необходимо выполнять, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами и не загрязнять окружающую среду исследуемыми культурами микроорганизмов.

Посев (или пересев) всегда проводят вблизи горелки. Пробирки при взятии мазка необходимо удерживать в наклонном положении, чтобы гарантировать стерильность культуры. Если их держать вертикально, то возможно попадание посторонних клеток микроорганизмов.

В пламени горелки тщательно обжигают бактериологическую петлю, держа ее в правой руке в отвесном положении. Мизинцем правой руки вынимают из второй пробирки ватную пробку и зажимают ее между мизинцем и ладонью, пробку первой пробирки зажимают между безымянным и средним пальцами правой руки. Снова слегка обжигают иглу и вводят ее в пробирку с культурой. Платиновая игла остывает очень быстро. Легким прикосновением ее к колонии микроорганизмов берут небольшое количество микробной массы и переносят во вторую пробирку.

**Окраска клеток микроорганизмов по Граму.** Метод дифференциации микробных клеток, основанный на различии в химическом составе клеточных оболочек. Сущность его в том, что в клетках одних видов микроорганизмов образуется нерастворимое в спирте соединение йода с основным красителем, у других видов это соединение временно появляется временно и после обработки спиртом растворяется. Микробы первой группы называются грамположительными, второй - грамотрицательными.

**Техника окраски по Граму**. На хорошо обезжиренное стекло наносят три тонких мазка разных культур микроорганизмов (два из них- контрольные с заведомо известным отношением к окраске по Граму). Мазки высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают в течение 1мин феноловым раствором генциана фиолетового (или кристаллического фиолетового), держа стекло в несколько наклоненном положении. Препарат, не промывая водой, обрабатывают, непрерывно покачивая ,96% -ным спиртом в течение 15-20 с. Время обесцвечивания очень существенно, при превышении указанного срока обесцвечиваются и грамположительные клетки, при недостаточном сроке обработки препарат окажется перекрашенным.

Промыв препарат водой, его окрашивают фуксином Пфейфера в течение 1мин. После этой обработки грамположительные микроорганизмы окрашиваются в темно - фиолетовый цвет, грамотрицательные имеют только цвет дополнительной окраски (фуксина) (Теппер и др., 1987).

**2.2 Модельные микроэкосистемы**

Небольшие автономные «миры» или микрокосмы, в бутылях или других сосудах могут имитировать в миниатюре природу различных экосистем. Эти небольшие «миры» можно рассматривать как Микроэкосистемы. Создание небольших, полностью закрытых систем, нуждающихся в лишь одной световой энергии (своеобразные миниатюрные биосферы), - очень сложная задача. Экспериментальные микрокосмы обычно варьируют от частично закрытых систем, в которых происходит газообмен с атмосферой, но не происходит обмена биогенными элементами и организмами, до полностью закрытых систем, включающих сообщества организмов, содержащихся в различных хемостатах и турбидостатах с регулируемым притоком и оттоком биогенных элементов и организмов. В хорошо смоделированных микрокосмах можно наблюдать многие или даже почти все основные функции и трофические структуры природной экосистемы, однако в силу необходимости разнообразие и размеры компонентов таких микрокосмов крайне невелики. Преимущества микроэкосистем для исследователя заключаются в том, что они имеют четкие границы, легко воспроизводимы и удобны для экспериментов. Не следует, однако, думать, что микрокосмы представляют собой копии той или иной конкурентной экосистемы, это всего лишь живые работающие модели (упрощения) природы.

Можно выделить два типа биологических микрокосмов:1) микроэкосистемы, взятые непосредственно из природы путем множественного засева культуральной среды пробами из различных природных местообитаний, и 2) системы, созданные путем сочетания видов, выращенных в «чистых» или аксенических, культурах (свободных от других организмов), пока не получится желаемая комбинация. Системы первого типа – это, в сущности, «демонтированная» или «упрощенная» природа, сведенная к тем микроорганизмам, которые могут длительное время поддерживаться и функционировать в условиях выбранного экспериментатором сосуда, культуральной среды, освещенности и температуры. Такие системы, следовательно, обычно имитируют какие – то определенные природные ситуации. Одна из проблем, возникающая при работе с такими производными экосистемами, состоит в том, что трудно определить их точный видовой состав, особенно состав бактерий (den et al, 1969). Начало использованию в экологии производных или «множественных» систем положили работы Г. Одума и его учеников (H. Odum, Hoskins, 1957; Beyers, 1963).

При втором подходе путем подбора первоначально изолированных и тщательно изученных компонентов создается система с известным составом. Получаемые при этом культуры часто называют *гнотобиотическими* (этот термин обсуждается в работе Догерти (Dougherty, 1959)), поскольку здесь точно известен состав и даже то, присутствуют или отсутствуют бактерии. Гнотобиотические культуры прежде использовали главным образом для изучения питания, биохимии и других аспектов жизни отдельных видов и штаммов или для изучения взаимодействия двух видов. Однако в последнее время экологи начали экспериментировать с более сложными полиаксеническими культурами в поисках путей построения автономных экосистем (Nixon, 1969; Taub, 1969, 1974).

Эти два противоположных подхода к созданию лабораторных микроэкосистем параллельны двум давно существующим подходам (холистическому и мерологическому) экологов к изучению озер и других больших систем, существующих в природе.

Существует широко распространенное заблуждение относительно «равновесия» в аквариуме с рыбами. Вполне возможно достигнуть некоторого приблизительного равновесия газового и пищевого режима при условии, что в нем мало рыб, а воды и растений много. Еще в 1851 г. Дж. Уорингтон «установил это удивительное и восхитительное равновесие между животным и растительным царствами» в аквариуме объемом 12 галлонов (54,6 л), поселив в нем несколько золотых рыбок, улиток и большое количество валлиснерии (водное растение), а с ними и множество разнообразных микроорганизмов. Уорингтон правильно оценил не только взаимодействие рыб и растений, но и отметил значение детритоядных улиток «в разложении остатков растений и водорослевой слизи», в результате чего «то, что иначе могло бы действовать как ядовитое начало, превращается в плодородную среду для роста растений». Большинство попыток любителей добиваться равновесия в аквариуме терпит неудачу из-за того, что для наличного количества ресурсов в аквариум помещают слишком много рыб (диагноз: элементарный случай перенаселения). Для полного самообеспечения одной рыбе среднего размера требуется много кубических метров воды и организмов, служащих пищей. Поскольку аквариум обычно держат дома, на работе или в школе ради «наблюдения за рыбами», помещая большое число рыб в малом пространстве, необходимо дополнительное питание, аэрация и периодическая очистка аквариума (Одум, 1986).

В данной работе была проведена постановка двух модельных микроэкосистем. В одной системе исследовалось влияние микрофлоры реки Кривая Болда на микробиологический состав садовой почвы. Во второй микроэкосистеме наблюдалось влияние микрофлоры озера Баскунчак на микробиологический состав садовой почвы.

Для постановки модельных микроэкосистем на дно двух высоких цилиндров V = 500 см3 помещалось 100 г. исследуемой почвы и заливалось 1000мл. воды в первом случае взятой из реки Кривая Болда, а во втором – из озера Баскунчак. В том виде экосистемы оставляли на открытом воздухе на 3 недели. По прошествии этого времени со дна цилиндра забирают небольшое количество почвы, просушивают ее на воздухе, затем взвешивают в количестве 1г, которую помещали в пробирку с 10 г. стерильной воды. Производили ряд последовательных разведений:10-1 -10-7. Из каждого разведения брали по 1 мл и помещали в высокие стерильные пробирки методом глубинного посева. В полученную культуральную жидкость заливают жидкую среду Виноградского до 3/4 объема.

Данные экосистемы исследовались также на среде Имшенецкого, при этом среда в высокой пробирке, предварительно простерилизованная засевается комочком почвы и помещается в термостат.

Необходимость изучения маслянокислых бактерий в водоемах была очевидной. Обследование разнотипных водоемов с широким спектром гидролого-гидрохимических и продукционных характеристик позволило впервые выявить экологические особенности распределения отдельных видов маслянокислых бактерий. Главными факторами, обуславливающими преимущественное развитие тех или иных бактерий в отложениях, являются концентрация, состав и доступность Сорг - соединений, отражающие трофический статус водоемов.C pasteurianum, сбраживающий простые сахара, доминирует вилах евтрофных озер донных отложений полисапробных зон с максимальным содержанием легкогидролизуемых соединений. C. butyricum и C. felsineum, ферментирующие различные полисахариды, преобладают в мезотрофных озерах и водохранилищах

, грунты которых формируются под влиянием аллохтонного стока и прибрежной растительности. C. acetobutyricum, обладающий способностью усваивать не только углеводы и аминокислоты, но также лигнино – гумусовые соединения, достигает максимума донных отложениях ацидных хтониоевтрофных озер. Таким образом, полученные на обширном материале новые для водной микробиологии сведения неоспоримо свидетельствуют о геохимической значимости маслянокислых бактерий, которые являются важнейшим звеном бактериальных сообществ донных отложений внутренних водоемов разного типа (Дзюбан, 2005).

**Глава 3. Результаты исследований**

При постановке накопительной культуры, выделении и микроскопировании маслянокислых бактерий получили следующие данные.

Таблица 1

**Культуральные признаки маслянокислых бактерий на среде Виноградского**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Степень разведения | Культуральные признаки | Морфологические признаки |
| Обнаруженные микроорганизмы |  | 10-1 | Образовался серый осадок, имеется муть и пленка. |
| Г+ удлиненные и утолщенные палочки, наблюдаются клостридиальные споры | Clostridium |  | 10-2 |
| Образовался серый осадок, появилась муть. | Г + удлиненные палочки с закругленными концами, образующие плектридиально расположенные споры | Clostridium |  |
| 10-3 | Образовался осадок, имеется муть | Г + удлиненные палочки с закругленными концами, образующие плектридиально расположенные споры | Clostridium |
|  | 10-4 | Имеется осадок, имеется муть и газ | Г+ цилиндрические палочки с клостридиальными спорами |
| Clostridium |  | 10-5 | Образование осадка, мути и газа |
| Г+ палочки с закругленными концами со спорой на конце | Clostridium |  | 10-6 |
| Образование осадка, мути и газа | Г+ длинные и толстые палочки с клостридиальными спорами | Clostridium |  |
| 10-7 | Имеется осадок, имеется муть | Г + удлиненные палочки с круглыми концами с плектридиальными спорами | Clostridium |
|  |  | 10-1 | Имеется осадок, образовалась муть |
| Г + удлиненные палочки с закругленными концами, образующие плектридиально расположенные споры | Clostridium |  | 10-2 |
| Образовался газ, осадок серый, имеется муть | Г+ цилиндрические палочки с клостридиально расположенными спорами | Clostridium |  |
| 10-3 | Образовался серый осадок, среда мутная, имеется газ | Г+ палочки с закругленными концами и со спорой на конце | Clostridium |
|  | 10-4 | Образовался серый осадок, образовался газ, имеется муть | Г+ удлиненные и утолщенные палочки, наблюдаются споры |
| Clostridium |  | 10-5 | Образовался осадок, имеется запах газа, муть |
| Г+ палочки с клостридиально расположенными спорами | Clostridium |  | 10-6 |
| Образовался серый осадок, имеется муть, образовался газ | Г+ длинные и утолщенные палочки, наблюдаются споры | Clostridium |  |
| 10-7 | Образовался серый осадок и газ, имеется муть |  | Clostridium |

При анализе данной таблицы можно наблюдать, что здесь весьма интенсивно происходили процессы брожения: происходило помутнение среды, образовывался газ, чувствовался сильный запах масляной кислоты, выделился осадок, присутствовала пленка. При культивировании в среде создались анаэробные бактерии, поэтому обнаруженные здесь бактерии относятся к анаэробам и образуют споры.

Таблица 2

**Культуральные признаки бактерий на среде Имшенецкого**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № пробы | Культуральные признаки | Морфологические признаки | Обнаруженные микроорганизмы |
|  | 10-1 | Среда зеленого цвета, фильтровальная бумага ослизнилась | Г+ длинные тонкие палочки, наблюдаются круглые споры на конце |
| Clostridium |  | 2 | Среда зеленого цвета, бумага ослизнилась |
| Г+ палочки со спорой на конце | Clostridium |  | 3 |
| Среда зеленого цвета, бумага ослизнилась | Г + тонкие прямые палочки, образуют споры (в виде барабанной палочки) | Bacillus |  |
| 4 | Среда желтого цвета, бумага ослизнилась | Г + тонкие палочки с круглой спорой на конце | Clostridium |
|  | 5 | Среда желтого цвета, бумага ослизнилась | Г+ тонкие палочки со спорами на одном конце |
| Bacillus |  | 6 | Среда болотного цвета, бумага ослизнилась |
| Г + палочки, имеющие споры в виде барабанной палочки | Clostridium |  | 7 |
| Среда желтого цвета, бумага ослизнилась | Г+ тонкие палочки, наблюдаются круглые споры на конце | Clostridium |  |
|  | 1 | Среда зеленого цвета, бумага ослизнилась | Г+ тонкие прямые палочки, образующие споры в виде барабанной палочки |
| Bacillus |  | 2 | Среда болотного цвета, бумага ослизнилась |
| Г+ палочки с закругленным концом и со спорой | Clostridium |  | 3 |
| Среда болотного цвета, бумага ослизнилась | Г+ палочки с закругленным концом и со спорой | Clostridium |  |
| 4 | Среда желтого цвета, бумага ослизнилась | Г- палочка с круглой спорой на конце | Сlostridium |
|  | 5 | Среда желтого цвета, бумага ослизнилась | Г- палочки с грушевидной спорой на конце |
| Clostridium |  | 6 | Среда желтого цвета, бумага ослизнилась |
| Г- палочка с округлой спорой на конце | Clostridium |  | 7 |
| Среда желтого цвета, бумага ослизнилась | Г+ палочки со спорами на одном конце | Bacillus |  |

При анализе данной пробы наблюдалось присутствие на среде анаэробных спорообразующих палочек. Заметен интенсивный процесс разрушения клетчатки. Бумага ослизняется в результате образования оксикислот.

Таблица 3.

**Культуральные признаки бактерий на картофельной среде**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Кол – во повторностей | Культуральные признаки | Морфологические признаки | Обнаруженные микроорганизмы |
|  | 1 | Цвет среды – светло- зеленый, образовались пузырьки газа, среда мутная | Г - длинные палочки, образующие клостридиально расположенные споры |
| Clostridium |  | 2 | Среда желтая, образовался газ, среда мутная |
| Г + удлиненные палочки с закругленными концами, имеются плектридиально расположенные споры | Clostridium |  | 3 |
| Среда мутно – желтого цвета, образовался газ | Г+ палочки с круглыми концами, споры плектридиальные | Clostridium |  |
| 4 | Среда желтого цвета, имеется газ, среда мутная | Г+ палочка со спорой на конце | Clostridium |
|  | 5 | Среда мутная, желтого цвета, образовался газ | Г - палочки с округлыми концами |
| Clostridium |  | 6 | Среда желтого цвета, мутная, образовался газ |
| Г+ палочки, имеющие споры в виде барабанной палочки | Clostridium |  | 7 |
| Среда желтого цвета, мутная, образовался газ | Г+ палочки с закругленными концами и плектридиально расположенными спорами | Clostridium |  |

При анализе данной пробы можно заметить, что здесь присутствуют анаэробные образующие клостридиальные споры палочки. Интенсивно происходят процессы маслянокислого брожения: помутнение и пожелтение среды, образование пузырьков газа, запах масляной кислоты, образование осадка.

**Результаты выделения бактерий из почвы, используемой в микроэкосистеме**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Clostridium |  | 10-4 |
| Образовался газ, осадок серого цвета, муть | Г - длинные тонкие палочки cо спорами | Clostridium |  |
| 10-5 | Образовался газ, осадок серого цвета, среда мутная | Г - короткие изогнутые палочки в цепочках | Clostridium |
|  | 10-6 | Осадок серого цвета, муть | Г +крупные палочки со спорами на конце |
| Clostridium |  | 10-7 | Осадок серого цвета, муть |
| Г+ короткие, похожие на кокки палочки со спорами | Clostridium |  |  |

Таблица 4

**Система с водой из реки Кривая Болда**

**Культуральные признаки бактерий на среде Виноградского**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Степень разведения | Культуральные признаки | Морфологические признаки | Обнаруженные микроорганизмы |
|  | 10-1 | Образовался газ, осадок серого цвета, среда мутная | Г - короткие палочки с округлыми концами |
| Clostridium |  | 10-2 | Образовался газ, осадок серого цвета, среда мутная |
| Г - палочки, образующие клостридиально расположенные споры | Clostridium |  | 10-3 |
| Имеется газ, осадок серого цвета, муть | Г+ длинные тонкие палочки, наблюдаются округлые споры на конце |  |  |

При анализе данной пробы можно сделать вывод, что на среде присутствуют анаэробные палочки с клостридиально расположенными спорами. Наблюдается помутнение среды, образование осадка, проявление запаха масляной кислоты, пленка не образовалась.

**Культуральные признаки бактерий на среде Имшенецкого**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Таблица 5. | Степень разведения | Культуральные признаки | Морфологические признаки |
| Обнаруженные микроорганизмы |  | 1 | Среда зеленого цвета, бумага ослизняется и разрушается |
| Г+ палочки цилиндрической формы, образуют клостридиальные споры | Clostridium |  | 2 |
| Среда болотного цвета, бумага ослизнилась | Г - длинные палочки, образующие клостридиально расположенные споры | Clostridium pasteurianum |  |
| 3 | Среда желтого цвета, осадок серого цвета, муть | Г+ палочки с закругленными концами с плектридиальными спорами | Clostridium |
|  | 4 | Среда зеленого цвета, бумага ослизнилась | Г – длинные тонкие палочки с округлыми спорами |
| Clostridium |  | 5 | Среда зеленого цвета, бумага ослизнилась |
| Г+ палочка со спорой на конце | Clostridium |  | 6 |
| Среда зеленого цвета, бумага ослизнилась | Г - длинные тонкие палочки с округлыми спорами | Clostridium |  |
| 7 | Среда болотного цвета, бумага ослизнилась | Г - длинные тонкие палочки с округлыми спорами | Clostridium |

Анализируя данную пробу, можно заметить, что здесь встречаются анаэробные споровые и бесспоровые палочки. Среда болотного или зеленого цвета. Происходит ослизнение и разрушение бумаги в результате образования оксикислот

**Система с водой из озера Баскунчак**

**Культуральные признаки бактерий на среде Виноградского**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Таблица 6. | № пробы | Культуральные признаки | Морфологические признаки |
| Обнаруженные микроорганизмы |  | 10-1 | Образовался газ, пленка, осадок дымчатого цвета |
| Г+ тонкие прямые палочки, образуют споры (барабанная палочка) | Bacillus |  | 10-2 |
| Образовался газ, осадок серого цвета, присутствует муть | Г – палочки с клостридиальными спорами | Clostridium |  |
| 10-3 | Образовался газ, осадок серого цвета, муть | Г - короткие палочки с округлыми концами | Clostridium |
|  | 10-4 | Образовался серый осадок, газ, имеется муть | Г-палочки, образующие клостридиально расположенные споры |
| Clostridium pasteurianum |  | 10-5 | Образовался осадок, газ имеется муть |
| Г+ палочки со спорами (в виде барабанной палочки) | Clostridium |  | 10-6 |
| Имеется осадок, газ, присутствует муть | Г+ палочка с закругленными концами и со спорой на одном полюсе клетки | Clostridium |  |
| 10-7 | Имеется осадок, присутствует муть, образовался газ | Г – короткие палочки с округлыми концами | Clostridium |

При анализе данной пробы можно сделать вывод, что на среде присутствуют анаэробные палочки с клостридиально расположенными спорами. Наблюдается помутнение среды, образование осадка, проявление запаха масляной кислоты, пленка не образовалась.

Таблица 7

**Культуральные признаки бактерий на среде Имшенецкого**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № пробы | Культуральные признаки | Морфологические признаки | Обнаруженные микроорганизмы |
|  |  | 1 | Среда желтого цвета, бумага ослизнилась и разрушается |
| Г+ тонкие палочки со спорой на одном конце | Bacillus |  | 2 |
| Среда желтого цвета, бумага ослизнилась и разрушается | Г - длинные палочки со спорой на конце | Clostridium |  |
| 3 | Среда болотного цвета, бумага ослизнилась | Г- палочки со спорой на конце | Clostridium |
|  | 4 | Среда болотного цвета, бумага ослизнилась | Г+ тонкие палочки со спорой на одном конце |
| Bacillus |  | 5 | Среда болотного цвета, бумага ослизнилась |
| Г+ палочки, имеющие споры (в виде барабанной палочки) | Clostridium |  | 6 |
| Среда болотного цвета, бумага ослизнилась | Г + тонкие палочки со спорами | Clostridium |  |
| 7 | Среда болотного цвета, бумага ослизнилась | Г + палочки, имеющие споры на одном конце | Clostridium |
|  |  |  |  |

При анализе данной пробы отмечается, что здесь присутствуют анаэробные споровые и бесспоровые палочки. Среда приобретает желтый или зеленый цвет, бумага ослизняется и разрушается в результате образования оксикислот.

Приведенные здесь результаты исследований были получены после определенного времени инкубирования: при выделении на среде Виноградского - в течение 2-3 дней; на среде Имшенецкого - в течение 3 - 4 дней.

**Проведение качественной реакции на масляную кислоту.**

В пробирку помещали 3-5 мл сброженной культуральной жидкости, добавляли 2 мл 5 % - ного хлорида железа и нагревали на пламени горелки. В результате раствор приобрел буровато – коричневое окрашивание, в проходящем свете становящееся кроваво - красным. Данный опыт подтверждает наличие в культуральной жидкости маслянокислых солей, которые дали такую реакцию:

3Ca (CH3CH2CH2COO) 2 + 2Fe2Cl3 → 2Fe (CH3CH2CH2COO) 3 + 3CaCl2

Качественная реакция на Fe2Cl3

|  |  |
| --- | --- |
| Среды | Реакция с Fe2Cl3 |
| Виноградского | + |
| Имшенецкого + | + |
| Картофельная среда | + |
| Виноградского (р. Кривая Болда) | + |
| Имшенецкого (р. Кривая Болда) | + |
| Виноградского (оз. Баскунчак) | + |
| Имшенецкого (оз. Баскунчак) | + |

**Выводы**

1. Из садовой городской почвы, отобранной в парковой зоне АГТУ г. Астрахани, были выделены различные бактерии, осуществляющие маслянокислое брожение. Изучены культуральные и морфологические свойства маслянокислых бактерий, причем на среде Виноградского, среде Имшенецкого и на картофельной среде были выделены различные рода бактерий, являющиеся анаэробными и принадлежащие к разным систематическим группам.
2. При выделении маслянокислых бактерий из данной почвы обнаружили, что качественный состав бактерий в садовой городской почве и в почве, задействованной в экосистеме, различен. Так, для почвы характерны бактерии родов Clostridium и Bacillus. Для почвы, задействованной в экосистеме реки Кривая Болда характерны бактерии рода Clostridium. Для почвы экосистемы озера Баскунчак кроме бактерий рода Clostridium встречаются бактерии рода Bacillus.

Анализируя бактериологический состав почвы экосистем можно сделать вывод, что в данных экосистемах анаэробные условия, созданные при помощи воды, способствовали более интенсивному развитию маслянокислых бактерий, чем в почве. Это можно объяснить частично аэробными условиями открытой почвы, в то время как под слоем воды создаются полностью анаэробные условия. Таким образом, подтопление территории дало более интенсивное развитие маслянокислых бактерий.

Исходя из того, что в системе озера Баскунчак был отмечено большее видовое разнообразие, можно заключить, что повышенная соленость данного водоема положительно действует на активность процессов маслянокислого брожения.

Полученные результаты позволяют получить картину тех изменений, которые произошли бы в почве в результате подтопления из- за повышения уровня Каспийского моря.

**Список используемой литературы**

1. Алешукина А.В. Медицинская микробиология. Ростов - на – Дону, «Феникс», 2003.-472 с.
2. Беркли Р., Э. Бок, Д. Бун и др.; Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли и С. Уильямса. Пер. с англ. Г.А. Заварзина. Определитель бактерий Берджи -9- е изд.- Москва, Мир, 1997.-432 с.
3. Богданов В.М., Баширова Р. С., Кирова К. А., Корнеев И.П., Кострова Е.И., Петржиковская Л.М., Панкратов А.Я., Свитыч К.А. Техническая микробиология пищевых продуктов. Издательство пищевая промышленность. Москва, 1968.- 743 с.
4. Градова Н.Б., Бабусенко Е.С., Горнова И.Б., Гусарова Н.А. Лабораторный практикум по общей микробиологии. Москва, Дели принт, 2001.-144 с.
5. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н.. Микробиология 6-е издание, исправленное. Дрофа, Москва, 2006. - 444 с.
6. Журнал «Микробиология» том 74 №1, А.Н. Дзюбан, 2005, 119 -125 с.
7. Одум Ю. Экология: В 2 – х. томах, том 2 / Пер. С англ. Ю.М. Фролова; Под ред. Акад. Соколова - М.: Мир, 1986. – 376 с.
8. Родина А.Г. Методы водной микробиологии/Практическое руководство. Москва; Наука, 1965. – 363 с.
9. Руководство к практическим занятиям по микробиологии/Учебное пособие. Под ред. Н.С. Егорова – Москва, МГУ, 1995.-224 с.
10. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. Москва, агропромиздат, 1987.-238 с.