УДК 666.5:576.1

Л. В. Куис, аспирант; Р. М. Маркевич, доцент

СОСТАВ КИСЛОТ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

The purpose of the given stage of our researches consist in qualitative and quantitative definition of organic acids in cultural liquids Bacillus mucilaginosus and the bacteria allocated by us from clay of the Belarus deposit – Bacillus sp. We study the growth of these bacteria in different environments. We use synthetic and natural nutrient mediums. Representation about qualitative structure of organic acids is received. We carried out conductance-measuring titration of acids in cultural liquids. Ant, acetic and wine acids are found out in cultural liquids Bacillus mucilaginosus and Bacillus sp. Presence oxalic acids is established besides these acids in cultural liquids Bacillus mucilaginosus.

Введение. При микробиологической обработке глинистого сырья происходит изменение его физико-технических показателей, ведущее к получению более качественной продукции. Для глины белорусского месторождения нами это было показано предыдущими исследованиями [1]. Обработка глинистой суспензии осуществлялась культуральной жидкостью *Bacillus mucilaginosus.* Повышение пластичности суспензии может быть связано с диспергированием глинистых частиц.

И действительно, существует ряд работ, свидетельствующих о протекании деструкции минералов под действием разных микроорганизмов. В частности, авторы [2] изучали деструкцию некоторых минералов в присутствии тех же бактерий – *Bacillus mucilaginosus*.

Вместе с тем, до настоящего времени не существует единого мнения о механизме воздействия микроорганизмов и продуктов их метаболизма на минералы.

В 1983 г. Л. К. Яхонтова с соавторами опубликовали работу, в которой рассматривалась деструкция силикатов в присутствии бактерий [3]. Эксперименты проводились в водной среде при нейтральных значениях pH, изучалось влияние ряда почвенных бактерий. Авторы полагали, что эти бактерии могут использовать энергию разрушения минералов в процессах жизнедеятельности.

Другие исследователи в своей работе ставят это предположение под сомнение [4]. Ими изучена роль микроорганизмов и некоторых физико-химических факторов среды в разрушении кварца. В результате был сделан вывод, что факторами, определяющими разрушение кварца, являются метаболиты бактерий, в частности полисахариды и органические кислоты.

А. В. Власов предполагал, что разрушение минералов происходит под действием выделяемых бактериями различных органических кислот: масляной, муравьиной, уксусной, щавелевой и т. д., а также под действием ферментов, которые могут проявлять себя как биологические катализаторы [5].

Есть сведения о том, что бактерии продуцируют активный хелатизатор – 2-кетоглюконовую кислоту и энергично растворяют разнообразные минералы и синтетические продукты [6]. После инкубации этих бактерий в присутствии чистых минералов значительная часть растворившихся элементов находилась в форме комплексных соединений хелатного типа.

Таким образом, для подробного объяснения механизма действия бактерий на минералы, а значит на структурно-механические свойства глинистого сырья, необходимо изучать состав культуральных жидкостей, применяемых для микробиологической обработки образцов.

В имеющихся литературных источниках недостаточно сведений о составе культуральной жидкости *Bacillus mucilaginosus* и других бактерий, участвующих в деструкции минералов. В основном исследования посвящены полисахаридам: условиям их синтеза, составу, свойствам, применению.

Изучению состава кислот в культуральной жидкости бактерий *Bacillus mucilaginosus*, взятых из коллекции Китайской Академии сельскохозяйственных наук, посвящена работа [2]. Для культивирования использовали среды двух типов. Состав среды А, г/л: сахароза – 10; K_2HPO_4 – 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1,0; K_2SO_4 – 1,0; $CaCO_3$ – 1,0; следы $FeCl_3$; дрожжевой экстракт – 0,2 и силикатные минералы – 10. Среда В отличалась отсутствием $CaCO_3$. С использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в культуральных жидкостях были установлены средние концентрации щавелевой, лимонной и молочной кислот. Их значения соответственно составили 76,7188 и 124 мг/л.

Основная часть. Цель данного этапа наших исследований заключалась в качественном и количественном определении органических кислот в культуральной жидкости *Bacillus mucilaginosus* и бактерий, выделенных нами из глин белорусского месторождения – *Bacillus sp.* Изучен рост данных культур на разных средах [7]. Для исследований были отобраны питательные среды, при использовании которых наблюдалось самое большое накопление биомассы (табл. 1). Для выращивания *Bacillus mucilaginosus* применялись все три среды. Для изучения культу-

ральной жидкости *Bacillus sp.* использовали среды № 1 и 3.

Бактерии наращивали в пробирках на агаризованной среде, затем в качалочных колбах при температуре 30°С в течение 2 сут. По окончании культивирования определяли pH культуральной жидкости. При использовании питательной среды № 1 происходило сильное подкисление (значение pH снижалось до 4,2), а при использовании среды № 3 – подщелачивание (до значений pH больше 8).

Таблица 1

Состав сред для выращивания *Bacillus mucilaginosus*

Среда	Компоненты	Содержание, г/л
№ 1	Сахароза	5
	$(NH_4)_2SO_4$	0,5
	K_2HPO_4	0,2
	$MgSO_4$	0,2
	NaCl	0,1
	K_2SO_4	0,1
№ 2	Сахароза	20
	$NaNO_3$	0,5
	K_2HPO_4	0,2
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
	NaCl	0,2
	K_2SO_4	0,1
Картофельный отвар (№ 3)	200 г картофеля на 1 л воды	

Большинство органических кислот являются слабыми кислотами. Поскольку для определения слабых кислот в водных растворах наиболее пригодно кондуктометрическое титрование, именно этот метод использовали при определении кислотности культуральной жидкости.

Метод кондуктометрического титрования основывается на измерении электропроводности раствора после добавления каждой порции титранта. Зависимость электропроводности раствора от количества добавленного титранта изображается графически. Излом кондуктометрической кривой соответствует точке эквивалентности.

Однако установление точек эквивалентности затруднено в том случае, если кривые титрования имеют плавный изгиб на участке титрования кислоты. Точки эквивалентности в таких случаях могут быть установлены, когда кривые титрования построены на основании большого числа измерений электропроводности (рис. 1), фиксируемой при помощи самопишущего автоматического прибора. Кривая кондуктометрического титрования в этом случае в связи с ее непрерывностью обеспечивает более четкое установление точек излома.

Перед титрованием для осаждения биомассы культуральной жидкости проводили центрифугирование (15 мин при 5000 об/мин).

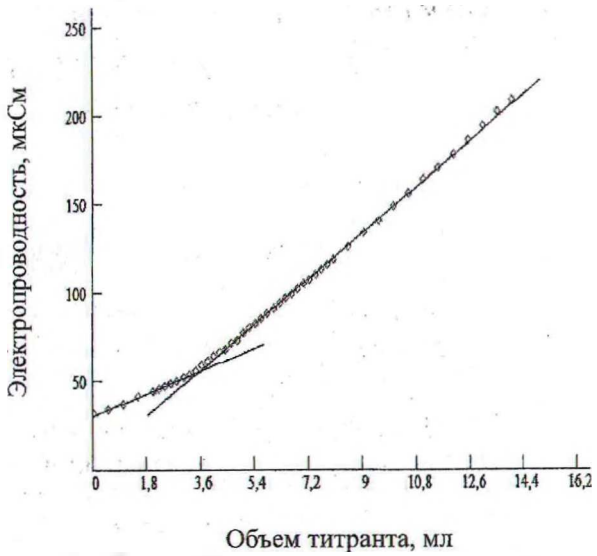

Рис. 1. Результаты титрования культуральной жидкости бактерий *Bacillus mucilaginosus*, полученной на синтетической среде № 2

Титрованию подвергалась аликвота 10 мл, в качестве титранта применялся 0,01 н. раствор NaOH. Для определения электропроводности использовался электрокондуктометр HANNA.

Культуральная жидкость, полученная при культивировании *Bacillus sp.* в среде № 3, имеет слабощелочное значение pH. Вместе с тем вид кривой кондуктометрического титрования (рис. 2) свидетельствует о наличии слабых кислот, которые в сложной многокомпонентной системе на основе натуральной среды, вероятно, находятся в связанном состоянии.

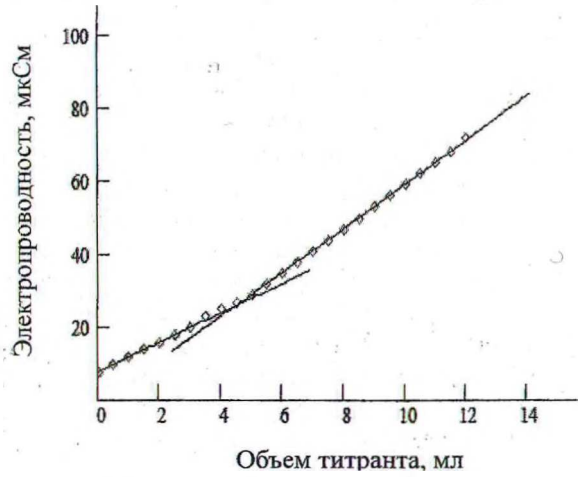

Рис. 2. Результаты титрования культуральной жидкости, полученной при культивировании *Bacillus sp.* в среде № 3

Характер кривой титрования и значение pH культуральной жидкости, полученной при культивировании *Bacillus sp.* в среде № 1 (рис. 3), говорит о том, что в данном случае в свободном

состоянии находится большее количество слабых кислот.

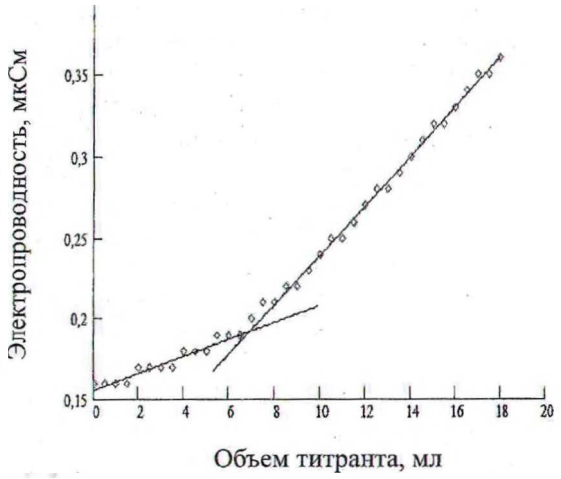

Рис. 3. Результаты титрования культуральной жидкости, полученной при культивировании *Bacillus sp.* в среде № 1

В табл. 2 представлены результаты анализа культуральных жидкостей, полученных при выращивании *Bacillus mucilaginosus* и *Bacillus sp.* на различных средах.

Таблица 2

Содержание кислот в культуральных жидкостях бактерий *Bacillus mucilaginosus* и *Bacillus sp.*

№ среды	pH культуральной жидкости	Содержание кислот, мольэкв./л
Bacillus mucilaginosus		
1	4,2	0,0072
2	7,1	0,0035
3	8,8	0,0035
Bacillus sp.		
1	4,3	0,0079
3	8,6	0,0047

Методы качественного анализа органических кислот основаны на применении определенных реагентов, при добавлении которых образуются продукты, позволяющие визуально установить присутствие этих кислот [8]. Для предварительных исследований можно считать приемлемым проведение качественных реакций с тем, чтобы в дальнейшем при использовании более эффективных методов анализа облегчить задачу идентификации.

Для проведения качественного определения кислот в культуральной жидкости бактерий *Bacillus mucilaginosus*, полученной на среде № 2, предварительно отделяли клетки центрифугированием (15 мин при 5000 об/мин).

Проведение качественных реакций позволило сделать следующие заключения:

а) при нагревании до кипения раствора, содержащего большое количество ацетата, к которому добавлен хлорид железа (III), образуется объемистый красно-коричневый осадок основного ацетата железа. Появление такого осадка свидетельствует о присутствии в культуральной жидкости ацетатов или солей гомологов уксусной кислоты;

б) наличие еле заметного синего кольца в реакции с резорцином показало, что в культуральной жидкости имеется щавелевая кислота. Присутствие муравьиной кислоты доказано тем, что над синим кольцом тотчас появилась медленно расширяющаяся оранжевая полоса и выделялся оксид углерода. При нагревании слоя серной кислоты под синим образовалось яркое красное кольцо, что свидетельствует о присутствии винной кислоты;

в) красно-фиолетовое кольцо в реакции с меньшим количеством резорцина, чем в предыдущем случае, подтвердило наличие винной кислоты в исследуемой жидкости.

Исходя из этого, можно сделать вывод, что исследуемая культуральная жидкость содержала ацетаты (или соли гомологов уксусной кислоты), щавелевую, муравьиную и винную кислоты.

Аналогичные реакции проведены для определения качественного состава культуральной жидкости *Bacillus sp.*, выращенной на синтетической среде № 1. Установили присутствие муравьиной, уксусной и винной кислот.

Для оценки соотношения летучих и нелетучих с паром кислот культуральная жидкость *Bacillus mucilaginosus*, полученная на синтетической среде № 2, после отделения клеток центрифугированием (15 мин при 5000 об/мин) и подкисления 1%-ной H_2SO_4 до pH 4,5, подвергнулась перегонке с паром. Далее по описанной выше методике провели кондуктометрическое титрование остатка и отгона.

Перегонка с паром представляет собой метод, при использовании которого можно разделить соединения, имеющие разную летучесть. Это возможно благодаря тому, что вклад в общее давление паров вносят более летучее соединение и водяной пар. Таким образом, процесс перегонки может протекать при температуре, несколько ниже 100°C (при давлении 0,1 МПа).

В процессе перегонки для перевода в раствор связанных с металлами питательной среды слабых органических кислот необходимо использовать сильную минеральную кислоту (1%-ная H_2SO_4). Так как в первую очередь оттитровывалась она, а затем слабые органические кислоты, то кривые титрования отгона и остатка имеют по две точки эквивалентности (рис. 4, 5).

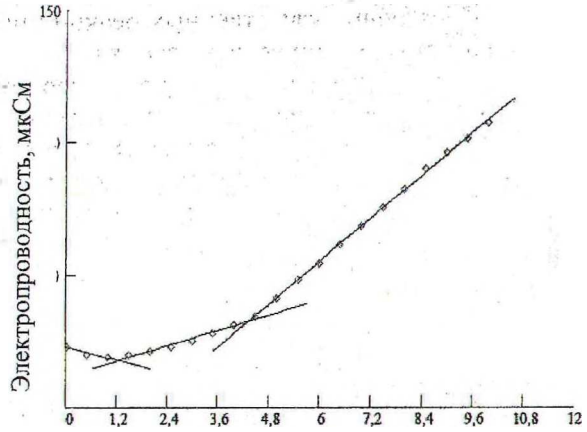

Рис. 4. Результаты титрования отгона культуральной жидкости бактерий *Bacillus mucilaginosus*, полученной на среде № 2

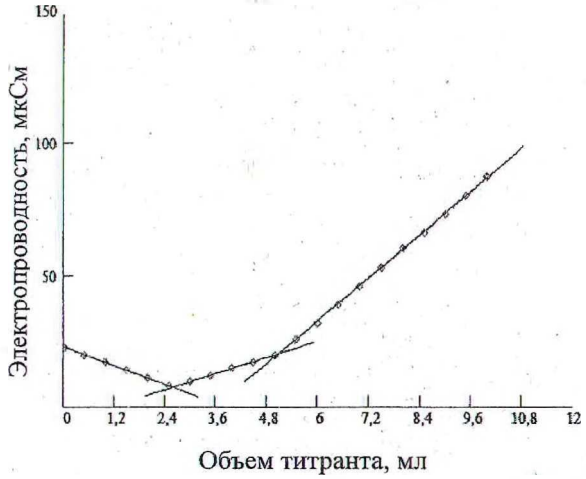

Рис. 5. Результаты титрования остатка культуральной жидкости бактерий *Bacillus mucilaginosus*, полученной на среде № 2

Для расчета содержания кислот в отгоне и остатке культуральной жидкости бактерий *Bacillus mucilaginosus*, полученной на среде № 2, использовали вторую точку эквивалентности.

В результате определили, что в отгоне содержание летучих с паром кислот составляет 0,0014 моль-экв./л, а в остатке содержание нелетучих с паром кислот – 0,0021 моль-экв./л.

Заключение. Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод, что не зависимо от значения pH исследуемых культуральных жидкостей, в них содержатся органические кислоты. Результаты титрования свидетельствуют о том, что некоторая часть кислот в такой сложной смеси, которую представляет собой культуральная жидкость, находится в связанном состоянии.

Получено представление о качественном составе органических кислот. В культуральных жидкостях *Bacillus mucilaginosus* и *Bacillus sp.* обнаружены муравьиная, уксусная и винная кислоты. Помимо этих кислот в культуральной жидкости *Bacillus mucilaginosus* установлено присутствие щавелевой кислоты.

Литература

1. Влияние условий микробиологической обработки глинистого сырья Беларуси на его качественные характеристики / Р. М. Маркевич [и др.] // Материалы. Технологии. Инструменты. – 2005. – Т. 10, № 4. – С. 86–89.

2. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture / Liu Wuxing [et al.] // Enviromental Geochemictry end Health. – 2006. – № 28. – P. 133–140.

3. Разрушение силикатов с помощью бактерий / Л. К. Яхонтова [и др.] // Минералогический журнал. – 1983. – № 1. – С. 28–38.

4. Роль микроорганизмов и некоторых физико-химических факторов среды в разрушении кварца / Г. И. Каравайко[и др.] // Микробиология. – 1984. – Т. 53, № 6. – С. 976–981.

5. Власов, А. С. Биологические методы обогащения минерального сырья и технологических смесей при производстве керамики / А. С. Власов // Химия и технология силикатных и тугоплавких неметаллических материалов. – 1989. – № 3. – С.155–165.

6. Цюрупа, И. Г. Роль микроорганизмов в выветривании алюмосиликатов и образовании подвижных, лекгомигрирующих соединений / И. Г. Цюрупа // Кора выветривания. – 1973. – № 13. – С. 3–38.

7. Куис, Л. В. Влияние состава питательной среды на рост бактерий *Bacillus mucilaginosus* / Л. В. Куис, Р. М. Маркевич // Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология орган. в-в. – 2006. – Вып. XIV. – С. 147–149.

8. Полюдек-Фабини, Р. Органический анализ / Р. Полюдек-Фабини, Т. Бейрих. – Л.: Химия, 1981. – 624 с.