

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

## НАКОПЛЕНИЕ КИСЛОТ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

The purpose of the given stage of researches consists in studying of the accumulation of organic acids in cultural liquids of bacteria genus of *Bacillus*: *Bacillus mucilaginosus*, strain G isolated from clay, located from place «Gaidukovka», and *Bacillus mycoides*. For cultivation used a synthetic nutrient medium.

Methods of TLC and GLC were used for analysis. Wine acid was found out in cultural liquids of *Bacillus mucilaginosus* and strain G using TLC method in ascending elution on silicagel plates. For GLC analysis used gas chromatograph Hewlett Packard 4890 D with ardent – ionizing detector. By a method of additional test it is established, that in all researched cultural liquids of bacteria genus of *Bacillus* the following organic acids contain: volatile (formic, acetic); non-volatile: monocarboxylic (lactic, pyruvic), dicarboxylic (oxaloacetic, oxalic, amber, wine), tricarboxylic (citric).

**Введение.** В процессе жизнедеятельности микроорганизмов накапливается большое количество разнообразных метаболитов. В результате культуральной жидкость представляет собой сложную смесь, включающую клетки, остаток неиспользованных компонентов питательной среды и продукты жизнедеятельности. Состав последних обусловлен особенностями микроорганизма, составом питательной среды и условиями культивирования.

Интерес к культуральной жидкости *Bacillus mucilaginosus* обусловлен ее положительным воздействием на глинистое сырье.

В 1980-е гг. это воздействие связывали со способностью бактерий синтезировать в большом количестве полисахариды [1].

В своей работе [2] А. В. Власов высказал предположение, что при микробиологической обработке разрушение минералов происходит при участии синтезируемых бактериями органических кислот: масляной, муравьиной, уксусной, щавелевой и т. д., а также под действием ферментов, которые могут проявлять себя как биологические катализаторы.

В обзоре «Микробная деструкция силикатных минералов» [3] Г. И. Каравайко отмечает, что «микробная деструкция силикатных минералов – это косвенный процесс, основанный на действии экзометаболитов, образуемых микроорганизмами в специфичных условиях среды». При этом обнаруживается специфичность и селективность микробной деструкции силикатных минералов, которая зависит от природы образуемых органических и минеральных кислот, экзополисахаридов и других поверхностно-активных веществ.

Авторы [4] изучали состав кислот в культуральной жидкости бактерий *Bacillus mucilaginosus*, взятых из коллекции Китайской Академии сельскохозяйственных наук. Для культивирования использовали среды двух типов.

Состав первой среды, 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. Вторая среда отличалась отсутствием  $CaCO_3$ . Для определения кислот использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. В обеих культуральных жидкостях установлено присутствие щавелевой, лимонной и молочной кислот в концентрациях 76,7, 188 и 124 мг/л соответственно.

В работе [5] авторы, вероятно, основываясь на литературных данных, сделали предположение о составе синтезируемых органических кислот для того, чтобы изучить влияние этих кислот на деструкцию минералов. Изучены закономерности деструкции кварца и хлорита в растворах органических кислот (щавелевой, янтарной, аскорбиновой и лимонной) в присутствии экзополисахарида *Bacillus mucilaginosus* и без него. Установлено, что эффективность воздействия полисахарида на процесс выщелачивания силикатных минералов в растворе органических кислот зависит от природы кислоты и строения кристаллической решетки деструктируемых минералов.

Ранее нами методом кондуктометрического титрования была определена общая кислотность культуральных жидкостей *Bacillus mucilaginosus* и штамма Г, а также методом качественных реакций установлено присутствие в этих культуральных жидкостях муравьиной, уксусной, винной и щавелевой кислот [6].

**Основная часть.** Цель данного этапа наших исследований заключалась в идентификации органических кислот культуральной жидкости бактерий рода *Bacillus* хроматографическими методами.

Объект исследования – органические кислоты, образующиеся в процессе культивирования бактерий рода *Bacillus*.

Предметом исследования являлись культуральные жидкости трех штаммов бактерий рода *Bacillus*: *Bacillus mucilaginosus*, штамма Г и *Bacillus mycoides*.

Бактерии *Bacillus mucilaginosus* в виде спорового материала получены из лаборатории МолдНИИСтромпроект (г. Кишинев, Молдова).

Штамм Г выделен из глины белорусского месторождения. Логично было предположить, что среди бактерий, выделенных из глин местных месторождений, могут оказаться штаммы, воздействие которых на свойства глины более существенное по сравнению с бактериями *Bacillus mucilaginosus*.

Бактерии выделяли из образцов глин месторождений «Гайдуковка» и «Лукомль» [7]. Анализ результатов обработки глинистого сырья культуральными жидкостями нескольких выделенных штаммов показал, что наибольший интерес представляет штамм, полученный из образца глины месторождения «Гайдуковка». Основываясь на результатах идентификации, можно утверждать, что эти бактерии (штамм Г) относятся к роду *Bacillus*.

С целью сравнения метаболизма штаммов бактерий, для которых установлен факт положительного воздействия на свойства глинистого сырья, с другими представителями рода *Bacillus* использовали имеющуюся в коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ культуру *Bacillus mycoides*.

Инкубирование всех штаммов бактерий осуществлялось на синтетической среде следующего состава, г/л: сахароза – 5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,2;  $\text{MgSO}_4$  – 0,2;  $\text{NaCl}$  – 0,1;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 0,1. Сначала бактерии наращивали в пробирках на плотной скошенной среде, затем пересеивали в жидкую среду. Бактерии культивировали при температуре 30°C в течение 2 сут. Во всех случаях к концу процесса культивирования наблюдалось сильное подкисление культуральной жидкости (значение pH снижалось до 3,9–4,0) и накапливались экзополисахариды.

Методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) осуществляли идентификацию кислот в культуральных жидкостях *Bacillus mucilaginosus* и штамма Г.

Качественный анализ смесей методом ТСХ позволяет определить число компонентов в анализируемом образце, а также подвижность каждого компонента относительно фронта растворителя (величина  $R_f$ ). Идентификацию компонентов проводили путем сравнения значений  $R_f$  обнаруженных компонентов и стандартных веществ. ТСХ можно использовать для разделения как свободных кислот, так и их производных.

Хроматографию проводили методом восходящего элюирования на пластинках SilikaGel (60) фирмы «MERCK». Использовали систему растворителей этанол – аммиак – вода (объемное соотношение 50 : 15 : 2,5). Проявление пятен осуществляли с помощью анилин-углеводной смеси.

Подобранная система позволяет определить присутствие винной, лимонной, адипиновой, яблочной, янтарной и молочной кислот. Стандарты представляли собой 5%-ные растворы кислот в 50%-ном водном растворе этанола.

Для подготовки пробы сначала отделяли клетки центрифугированием культуральной жидкости в течение 25 мин при 5000 об/мин на центрифуге ОС-6М. Затем осаждали и отделяли полисахариды. Для этого охлаждали этиловый спирт и супернатант до 4°C, смешивали охлажденные компоненты в соотношении 3 : 1 соответственно. Через сутки осадок отделяли центрифугированием при приведенных выше параметрах.

Пробы наносили на пластинки по 5 мкл мелкими порциями. Количество вещества, нанесенного в одну точку, составляло приблизительно 50 мкг.

Для развития окраски пятен после нанесения проявителя пластинку помещали в термостат с температурой 100–110°C на 10–15 мин.

Полученную хроматограмму фотографировали (рис. 1) и определяли значения  $R_f$  (отношение расстояния от линии старта до середины пятна к расстоянию от линии старта до фронта растворителя). Результаты проведения ТСХ приведены в таблице.



Рис. 1. Хроматограмма стандартов и культуральных жидкостей *B. mucilaginosus* и штамма Г: 1 – адипиновая кислота; 2 – винная кислота; 3 – лимонная кислота; 4 – молочная кислота; 5 – яблочная кислота; 6 – янтарная кислота; 7 – культуральная жидкость *B. mucilaginosus*; 8 – культуральная жидкость штамма Г

В исследуемых культуральных жидкостях установлено присутствие винной кислоты ( $R_f = 0,260$ ) и компонента, подвижность которого ( $R_f = 0,603$ ) не совпала с подвижностями использованных стандартов.

Метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) позволяет определять только летучие соединения, поэтому анализ проводят, осуществляя перевод органических кислот в метиловые эфиры.

Таблица  
Результаты проведения ТСХ-анализа

№ пробы	Вещество	Значение $R_f$	Результаты идентификации
Кислоты			
1	Адипиновая	0,836	—
2	Винная	0,260	—
3	Лимонная	0,178	—
4	Молочная	0,932	—
5	Яблочная	0,479	—
6	Янтарная	0,658	—
Обнаруженные компоненты			
7	Компонент 1	0,260	Винная кислота Не идентифицирован
	Компонент 2	0,603	
8	Компонент 1	0,260	Винная кислота Не идентифицирован
	Компонент 2	0,603	

ГЖХ-анализу подвергали культуральные жидкости *Bacillus mucilaginosus*, штамма Г и *Bacillus mycoides*, полученные на синтетической среде.

Результаты предварительных экспериментов показали необходимость использовать для пробоподготовки следующие операции:

- 1) отделение клеток;
- 2) выделение полисахаридов;
- 3) концентрирование;
- 4) метилирование органических кислот;
- 5) экстракция.

Пробоподготовку осуществляли в следующем порядке. Отделение клеток и полисахаридов проводили так же, как и перед ТСХ-анализом. Поскольку предварительные исследования показали наличие в культуральных жидкостях летучих кислот, предусматривали перевод кислот в соли. Для этого супернатант подщелачивали 0,1 н. NaOH до pH 9,2. Затем

пробу упаривали досуха под вакуумом на роторном испарителе при температуре 55–60°C. Осадок растворяли 2 мл бидистиллированной воды, добавляли 4 мл метанола и 0,8 мл 50%-ной серной кислоты, для протекания метанолиза смесь выдерживали в течении 30 мин при 60°C. Метилловые эфиры экстрагировали 1 мл хлороформа.

Для газожидкостной хроматографии использовали газовый хроматограф Hewlett Packard 4890 D с пламенно-ионизационным детектором. Применяли кварцевую колонку HP/NNOWAX длиной 30 м и внутренним диаметром 0,32 мм, в качестве неподвижной фазы использовали модифицированный полиэтиленгликоль (толщина слоя 0,5 мкм); в качестве газа-носителя – гелий, скорость потока которого равна 21 см<sup>3</sup>/с. Температура испарителя – 250°C, температура детектора – 250°C. Анализ проводился в режиме температурного градиента от 50 до 200°C.

На рис. 2 представлена хроматограмма пробы, полученной из культуральной жидкости *Bacillus mucilaginosus*.

Качественный анализ кислот осуществляли методом добавочной пробы по времени удерживания. Основываясь на предварительных исследованиях и имеющихся литературных данных, проверяли наличие следующих кислот: винной, лимонной, адипиновой, яблочной, янтарной, молочной, щавелевой, пировиноградной, фумаровой, малоновой, салициловой, щавелево-уксусной, α-кетоглutarовой, уксусной и муравьиной. Готовили 5%-ный водный раствор каждой кислоты, к 2 мл этого раствора добавляли 4 мл метанола и 0,4 мл 50%-ной серной кислоты, метанолиз проводили в течение 30 мин при 60°C. Экстракцию метилового эфира кислоты проводили 1 мл хлороформа.

К сожалению, все обнаруженные в культуральных жидкостях вещества на данном этапе исследований идентифицировать не удалось.

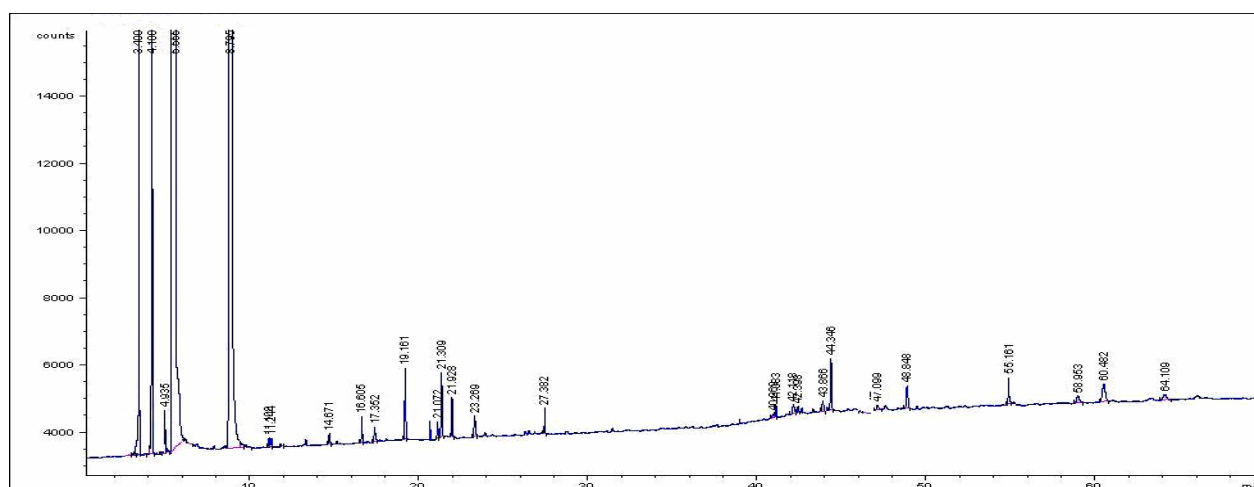


Рис. 2. Хроматограмма пробы, полученной из культуральной жидкости *Bacillus mucilaginosus*

Установлено, что во всех трех исследуемых культуральных жидкостях содержатся следующие органические кислоты:

– летучие (муравьиная, уксусная);  
– нелетучие: монокарбоновые (молочная, пировиноградная), дикарбоновые (щавелево-уксусная, щавелевая, янтарная, винная), трикарбоновые (лимонная).

Метилловые эфиры обнаруженных летучих и нелетучих органических кислот элюировались в следующем порядке: муравьиной, уксусной, пировиноградной, молочной, щавелево-уксусной, щавелевой, янтарной, винной и лимонной кислот. В первую очередь элюируются эфиры монокарбоновых кислот, затем – дикарбоновых, в последнюю очередь – трикарбоновых.

Следует отметить, что в каждой культуральной жидкости содержание летучих органических кислот выше, чем содержание нелетучих. Соотношения индивидуальных как летучих, так и нелетучих кислот различны во всех исследуемых культуральных жидкостях.

**Заключение.** Основываясь на результатах данного этапа работы, можно говорить о том, что метод ТСХ позволил подтвердить наличие в культуральной жидкости *Bacillus mucilaginosus* и штамма Г винной кислоты.

Разработана методика определения методом ГЖХ летучих и нелетучих органических кислот. Этот метод позволил установить, что во всех исследуемых культуральных жидкостях присутствуют следующие органические кислоты: летучие (муравьиная, уксусная); нелетучие: монокарбоновые (молочная, пировиноградная), дикарбоновые (щавелево-уксусная, щавелевая, янтарная, винная), трикарбоновые (лимонная).

## Литература

1. Белканова, Н. П. Разрушение силоксанной связи кварца *Bacillus mucilaginosus* / Н. П. Белканова, Г. И. Каравайко, З. А. Авакян // Микробиология. – 1985. – № 1. – С. 27–30.

2. 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.

3. Каравайко, Г. И. Микробная деструкция силикатных минералов / Г. И. Каравайко // Труды ин-та микробиологии им. Виноградского. – М., 2004. – Вып. 12: Юбилейный сборник к 30-летию института. – С. 172–196.

4. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture / Liu Wuxing [et al.] // Environmental Geochemistry and Health. – 2006. – № 28. – P. 133–140.

5. Малиновская, И. М. Влияние экзополисахарида *Bacillus mucilaginosus* на деструкцию хлорита и кварца в растворе органических кислот / И. М. Малиновская, В. С. Подгорский // Микробиологический журнал. – 1988. – Т. 50, № 5. – С. 21–25.

6. Куис, Л. В. Состав органических кислот в культуральной жидкости бактерий рода *Bacillus* / Л. В. Куис, Р. М. Маркевич // Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология орган. в-в. – 2007. – Вып. XV. – С. 201–204.

7. Новый штамм бактерий рода *Bacillus* и его воздействие на качественные характеристики глины / Л. В. Куис [и др.] // Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология орган. в-в. – 2007. – Вып. XV. – С. 205–207.