

1. Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В., Шерстобоева О.В., Мельничук Т.М., Калініченко А.В., Гришик І.В. Біологічний вчот. – Київ: Світ, 2003. – 424 с.
2. Толкачев Н.З. Потенциальные возможности симбиотической азотфиксации при выращивании сои на юго Украины // Микробиол. журн. – 1997. – Т. 59, № 4. – С. 34–41.
3. Крутило Д.В., Ковалевська Т.М. Особливості поширення бульбочкових бактерій сої в різних регіонах України // Агро-екологічний журнал. – 2003. – № 3. – С. 59–63.
4. Крутило Д.В., Ковалевська Т.М. Бульбочкові бактерії сої як складова мікробіоти ґрунтів України // Життєння рослин: теорія і практика: Зб. наук. пр. – К.: Логос, 2005. – С. 346–355.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БАКТЕРИЙ *BACILLUS MUCILAGINOSUS* МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Куйс Л.В., Лайковская И.В., Маркевич Р.М.

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь,
e-mail: ludmila.kuis@tut.by

Данное исследование является продолжением работы по изучению метаболизма бактерий *Bacillus mucilaginosus*. Имеется достаточно большое количество работ, посвященных определению условий синтеза и количества экзополисахаридов в культуральной жидкости. С воздействием полисахаридов некоторые исследователи связывают изменение свойств глинистого сырья и технологических смесей при обработке их культуральной жидкостью *Bacillus mucilaginosus* [1, 2]. Данные относительно накопления органических кислот в культуральной жидкости этих бактерий достаточно разноречивы, имеются предположения о наличии щавелевой, янтарной, аскорбиновой, лимонной, масляной, муравьиной, уксусной, глюконовой и 2-кетоглюконовой кислот. И только авторы [3] методом высокоэффективной жидкостной хроматографии экспериментально установили присутствие в культуральной жидкости бактерий *Bacillus mucilaginosus*, взятых из коллекции Китайской Академии сельскохозяйственных наук, щавелевой, лимонной и молочной кислот.

Ранее нами подобраны питательные среды, при использовании которых для выращивания бактерий *Bacillus mucilaginosus* были установлены особенности. На синтетической среде №1 (г/л, сахара – 5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; K_2HPO_4 – 0,2; MgSO_4 – 0,2; NaCl – 0,1; K_2SO_4 – 0,1) накапливалось наибольшее количество кислот; на синтетической среде №2 (г/л, сахара – 20; NaNO_3 – 0,5; K_2HPO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,1) в большом количестве синтезировались экзополисахариды; на натуральной среде (картофельный отвар) наблюдался интенсивный рост клеток также с образованием значительного количества полисахаридов.

Анализ кислот методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) проводили в культуральных жидкостях, полученных на всех трех средах. Биомассу бактерий накапливали на агаризованной среде, затем пересеивали в жидкую среду. Культивировали бактерии при температуре 30°C в течение 2 сут.

Для всех трех культуральных жидкостей на первом этапе работы определено значение общей кислотности методом кондуктометрического титрования. Большее значение общей кислотности (7,2 ммоль-экв/л) соответствует культуральной жидкости с самым низким значением pH 4,0, полученной при использовании среды № 1 [4]. Для предварительного анализа состава кислот в данной культуральной жидкости применялся метод качественных реакций, который позволил определить присутствие муравьиной, уксусной, винной и щавелевой кислот.

С целью более детального изучения и сравнения состава кислот в культуральных жидкостях *Bacillus mucilaginosus*, полученных при использовании разных сред, использовали метод газожидкостной хроматографии.

Поскольку культуральная жидкость имеет сложный состав, обычные методики подготовки пробы для ГЖХ анализа не дали ожидаемых результатов [5]. Разработана методика подготовки пробы, позволяющая определить летучие и нелетучие органические кислоты в культуральной жидкости *Bacillus mucilaginosus*.

На первом этапе производили отделение биомассы центрифугированием (25 мин при 5000 об/мин на центрифуге ОС – 6М). Поскольку бактерии *Bacillus mucilaginosus* обладают способностью в большом количестве синтезировать экзополисахариды, проводили их осаждение и отделение. Для этого этиловый спирт и супернатант охлаждали до 4°C, затем смешивали охлажденные компоненты в соотношении 3:1 соответственно. Через 1 сутки выпавший осадок отделяли центрифугированием при тех же параметрах.

Качественный анализ показал, что культуральные жидкости содержат летучие органические кислоты (муравьиную и уксусную). Так как пробоподготовка включает стадию концентрирования, то кислоты необходимо перевести в соли (супернатант подщелачивали 0,1 н NaOH до pH 9,2). Затем пробу упаривали досуха под вакуумом на роторном испарителе при температуре 40–45°C. Осадок растворяли 2 мл бидистиллированной воды, добавляли 4 мл метанола и 0,8 мл 50% серной кислоты, смесь выдерживали 30 мин при 60°C. Полученные метиловые эфиры экстрагировали хлороформом в объеме 1 мл.

Для газожидкостной хроматографии использовали газовый хроматограф Hewlett Packard 4890 D с пламенно-ионизационным детектором. Применяли кварцевую колонку HP/INNOWAX 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 см³/с. Температура испарителя – 250°C, температура детектора – 250°C. Анализ проводился в режиме температурного градиента от 50 до 200°C.

Качественный анализ кислот осуществляли по времени удерживания методом добавочной пробы. Исходя из предварительных исследований и имеющихся литературных данных, проверяли наличие следующих кислот: винной, лимонной, адипиновой, яблочной, янтарной, молочной, щавелевой, пировиноградной, фумаровой, малоновой, салициловой, щавелево-уксусной, α -кетоглутаровой, уксусной, муравьиной.

Стандарты готовили из 5% водных растворов кислот. К 2 мл раствора кислоты добавляли 4 мл метанола и 0,4 мл 50% серной кислоты, смесь выдерживали 30 мин при 60°C. Экстракцию метилового эфира кислоты проводили хлороформом в объеме 1 мл.

Все обнаруженные в культуральных жидкостях вещества на данном этапе работы идентифицировать не удалось.

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

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

Кроме того, в культуральных жидкостях, полученных на синтетической среде, обнаружена винная кислота. При выращивании бактерий на картофельном отваре эта кислота в культуральной жидкости отсутствует.

Следует отметить, что в культуральной жидкости, полученной на синтетической среде № 1, в общем количестве кислот преобладает уксусная кислота. В остальных исследованных культуральных жидкостях ее содержание по сравнению с другими кислотами незначительно.

Список литературы

1. Малиновская И.М., Подгорский В.С. Влияние экзополисахарида *Bacillus mucilaginosus* на деструкцию хлорита и кварца в растворе органических кислот // Микробиологический журнал. – 1988. – Т. 50, № 5. – С. 21–25.
2. Белканова Н.П., Каравайко Г.И., Авакян З.А. Разрушение силоксанной связи кварца *Bacillus mucilaginosus* // Микробиология. – 1985. – Т. 54, № 1. – С. 27–30.
3. Wuxing L. [and etc.] Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture // Environmental Geochemistry and Health. – 2006. – № 28. – P. 133–140.
4. Куис Л. В. Маркевич Р.М. Состав органических кислот в культуральной жидкости бактерий рода *Bacillus* // Труды БГТУ. Сер. IV химия и технология орган. в-в. Вып. XV.: сб. науч. тр. / Бел. гос. технол. ун-т. Минск, 2007. – С. 201–204.
5. Методы общей бактериологии / Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М.: Мир, 1984. – 264 с.