

Дослідження газової фази культур *Halobacterium salinarium*

С. В. Микуланинець, Б. М. Шарга, Й. П. Шаркань, Т. І. Панаїт,
І. Й. Цьома, В. В. Ярош, М. Ю. Січка

Ужгородський національний університет, 88000, м. Ужгород, вул Волошина, 32

Halobacterium salinarium - непатогенна бактерія, яка однак проникаючи в деякі продовольчі продукти типу соленої риби знижує їх якість. Були проведені ІЧ-спектрометричні дослідження газової фази над *Halobacterium salinarium*. Показано, що ці склади можна використовувати, як маркерні гени для управління ферментизацією солевих технологій і якості харчових продуктів.

Вступ

Відомою особливістю мікробів роду *Halobacterium*, як і родини *Halobacteriaceae* взагалі, є їх здатність рости в солених від близько 9% вмісту NaCl до насичених цієї сполукою (близько 30%) середовищах [1]. Тому дані бактерії знаходять свою екологічну нішу в умовах, де ріст інших мікроорганізмів є неможливим [2]. Бактерії *Halobacterium salinarium* - це нешкідливі для теплокровних мікроорганізми. Однак, вони можуть завдавати економічних втрат людині, погіршуючи якість солених продовольчих продуктів [3]. Наприклад, іноді вони настільки сильно розвиваються в соленій рибі, що вона набуває червоного кольору [4]. При цьому змінюється і запах продукту.

З аналізу наявної літератури випливає, що повний склад газової фази культур роду *Halobacterium* ще недосліджено. Однак, знаходження газоподібних речовин, характерних для порушень ферментації солених продуктів (надмірного розвитку галобактерій) дало б можливість розробити нові методи контролю технології та якості цих виробів.

Тому ціллю даної роботи було дослідження газової фази культур галобактерій з допомогою мас- та ІЧ-спектрометрії.

Матеріали і методи

В роботі використано одержані з різних колекцій штами *Halobacterium salinarium*: 353, R₁, ET1001. Галофільні мікроорганізми підтримували на напіврідкому поживному агарі, який містив у г/л: NaCl - 200, KCl - 2, MgSO₄ · 7H₂O - 20, три-Na цитрат - 3, екстракт дріжджів (Oxoid) - 5, пептон (Oxoid) - 10, FeCl₂ · 4H₂O - 0,036, MnCl₂ · 4H₂O - 0,00036, агар-агар - 10, дистильовану воду - 1000 мл, при рН 7,2 - 7,4. Газони культур вирощували на протязі тижня 38 °С у 250 мл колбах Ерленмеєра при їх заповненні на 100 мл агаром такого ж складу, але твердим, інокульованим 1 мл суспензій галобактерій 10⁸ кфо/мл. Далі ватні пробки швидко міняли, нахиливши колби на 90°С, на такі ж резинові пробки з краниками для забору проб повітря. Культивували, як вище, ще 6 год. Дослідження змін в газовій фазі, що відбулися у процесі росту газонів культур галобактерій у порівнянні з неінокульованим контролем проводились за допомогою масспектрометра МИ1201, (ВО "Електрон", Україна). Розділення заряджених частинок по масам у даному приладі здійснюється відхиленням у магнітному полі в діапазоні від 2 до 600 а. о. м. Проби повітря над газонами культур та неінокульованим агаром (контроль) в колбах відбирали в напуску систему масспектрометра в режимі в'язкого натікання, щоб зменшити

фрагментацію зразків досліджуваного повітря.

Іонізацію нейтральної складової досліджуваної атмосфери проводили методом електронного удару, що є найбільш розповсюдженим для процесів іоноутворення.

Враховуючи те, що процеси взаємодії органічних молекул з електронами, які мають енергію 50-80 еВ характеризуються достатньо великими перерізами взаємодії [7], а також те, що для багатьох атомарних та молекулярних складових повітря найбільша імовірність іонізації знаходиться в межах 50 -100 еВ, енергію іонізуючих електронів підтримували рівною 80 еВ.

Для розділення у одержаних маспектрах ліній основних іонів та їх уламкових складових проводили

Результати та обговорення

Маспектри проб повітря над газонами культур відрізнялись один від одного та від маспектру повітря над неінокуюльовагим агаром.

Основними складовими, виявленими в маспектрах проб повітря над газонами культур були такі: H_2O , Ne , N_2 , O_2 , H_2S та CO_2 . Решта зареєстрованих в маспектрах іонів були окремими ізотопами чи уламковими іонами від основних складових, що встановлено із дослідження кривих ефективності іонізації. Як приклад, приводимо залежність інтенсивності молекулярного іону $^{32}O_2^+$ та його уламку $^{16}O^+$ від енергії іонізуючого пучка електронів в повітрі атмосфери (Рис.1). За кривими ефективності іонізації знайдено потенціал іонізації молекулярного кисню рівний 10 еВ, а потенціал появи його уламку – атомарного кисню – близько 30 еВ. В режимі іонізуючого електронного пучка $I_i = 1,6$ мА, $U_i = 80$ еВ інтенсивність піку іону O_2^+ , що відповідає молекулярному кисню, на порядок більше інтенсивності його уламку O^+ (Рис.1).

дослідження кривих ефективності іонізації та порівняння їх з розрахованими характеристичними маспектрами для всіх одержаних нами комплексів [8].

Для підтвердження результатів одержаних із маспектрометрії, дослідження природи повітря над газonom вибраного штаму галобактерій-*Halobacterium salinarium* 353 П - провели інфрачервоною спектрометрією (Zeiss Specord M80, Veb Carl Zeiss, Jena, Німеччина). Колби окремо приєднували до вакуумованих кювет, у які повітря з колби переходило за рахунок різниці тиску. ІЧ-спектри повітря в кюветі знімали в діапазоні частот від 400 до 4000 cm^{-1} .

Інтенсивності ліній маспектрів виявлених нами в досліджуваних пробах повітря були віднесені до лінії інертного газу аргону ($^{40}Ar^+$) (Таблиця 1).

У зразках повітря, взятих над газонами культур галобактерій виявлено дещо більшу кількість іонів вуглецю (12

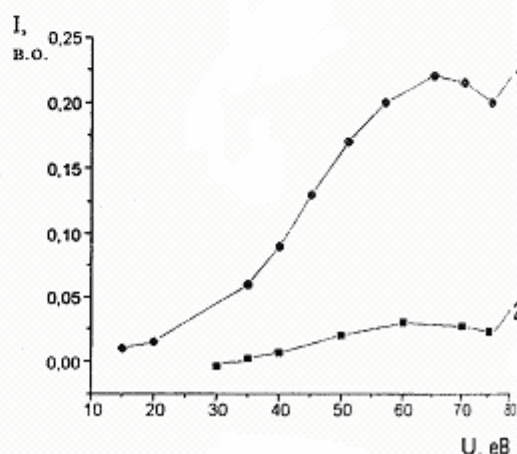


Рис. 1. Криві ефективності іонізації кисню. 1 - молекулярний іон O_2^+ (32 в. о.); 2 - уламковий O^+ 16 (в. о.).

а. о. м.), ніж у зразках повітря над неінокульованим агаром (контроль). Інтенсивність іонів з масою 14 а. о. м. (найімовірніше N^+ та CH_2^+) в масспектрах проб повітря, взятих над газонами культур *Halobacterium salinarium* R₁ та ET 1001 була майже такою, як і в контролі, а над культурою *H. salinarium* 353П – майже у 2 рази меншою. Вклад в інтенсивність ліній 12, 14, 15 та 16 а. о. м. масспектра газової фази культур галобактерій дають іони C^+ , N^+ , O^+ – уламки основних складових газової фази культур, N_2 , O_2 , CO_2 та складніших молекул (метан-іони, CH_4^+ , метил-іони CH_3^+ , та іони CH_2^+), які, найімовірніше, утворюються за рахунок дисоціативної іонізації органічних кислот, що виділяються клітинами галобактерій в процесі культивування газонів, та похідних цих сполук.

Інтенсивність лінії масспектру з масою 28 а. о. м. які, відповідають іонам N_2^+ , була вищою у пробах повітря, зібраних над культурами *H. salinarium* 353П та R₁, ніж у пробах, взятих з контролю та над газоном штаму *H. salinarium* ET1001. Додатковий вклад в інтенсивність піку 28 ще дає CO^+ , який є уламком CO_2 , а також іони $CH=NH$, C_2H_4 – похідні органічних сполук.

Інтенсивність лінії 17 а. о. м. була близькою у масспектрах проб повітря, взятих над газонами *H. salinarium* ET1001, R₁, з контролю, та більше, ніж у 2 рази вищою для масспектрів проб повітря *H. salinarium* 353П. Очевидно, що тут, крім води, є аміак (іони NH_3^+). Вміст парів води в пробах повітря над культурою штаму 353П та культурою *H. salinarium* ET1001 був більшим, а над культурою R₁ меншим, ніж у контролі. Інтенсивність лінії 32 а. о. м. була найбільшою у повітрі, взятим над культурою *H. salinarium* R₁ (у 87,5 раз більше ніж у контролі). Очевидно, вклад у інтенсивність цього піку могли дати й іони S^+ , CH_4O^+ , CH_3OH^+ , NOH_2^+ , $N_2H_4^+$ – найімовірніше, з продуктів розпаду сірковмісних амінокислот та інших органічних кислот, що виділяються з

клітин галобактерій в оточуюче середовище в процесі їх життєдіяльності та відмирання. Лінії подібних іонів та іонів H_2S^+ (34 а. о. м.) виявлено і у масспектрі газової фази культури штаму ET1001. У пробі з атмосфери *H. salinarium* ET1001 пік маси 32 а. о. м. був у 2 раз більший, а у зразку повітря з колби з культурою *H. salinarium* 353П – майже такий же, як і у контролі.

Масспектри повітря всіх культур мали велику інтенсивність піку з масою 44 а. о. м. (*H. salinarium* 353П - у 2,2, ET1001 – у 1,86, R₁ - у 2,03 раз більше, ніж у контролі), що вказує на підвищену кількість вуглекислого газу над культурами, у порівнянні з неінокульованим агаром і на можливу присутність іонів CH_2CHOH^+ , $CH_3CHNH_2^+$, NH_2CO^+ , $(CH_3)_2N^+$ – уламків амінокислот та інших органічних кислот, або їх похідних.

Пікам з масою 45 а. о. м. очевидно відповідають не тільки іони вуглекислого газу, а й іони CH_3CHOH^+ , $CH_2CH_2OH^+$, $CH_2OCH_3^+$, $COOH^+$.

Значний вклад в інтенсивність лінії 22 а. о. м., що є ізотопом Ne, ще дає і двократно іонізований вуглекислий газ (CO_2^{++}).

Інфрачервона спектроскопія проб повітря взятих з колб з газонами культури з найбільш багатим спектром - *H. salinarium* 353П - показала наявність піків поглинання, що відповідають валентним коливанням зв'язків C-H групи, C=O груп, або H-O-H зв'язків води, коливанням N-H зв'язків аміаку та вібрації O=C=O груп вуглекислого газу [4,5].

Таким чином, з допомогою масспектрометрії було виявлено підвищену кількість вуглекислого газу, наявність аміаку в повітрі над культурою *H. salinarium* 353П. А над культурами та *H. salinarium* ET1001 та R₁ ще й іон сірководню та метан-іони. У масспектрах газових фаз всіх культур було не також зафіксовано ряд складніших іонів, що відщеплюються від органічних сполук-продуктів життєдіяльності галобактерій.

Які з виявлених іонів можуть бути використаними, як індикатори рівня розвитку галобактерій у процесі

ферментації солених продуктів, або споживчої якості цих продуктів, буде визначено в подальших дослідженнях.

Табл.1.

Масспектри повітря над газонами культур галобактерій та над стерильним агаром.

Маси іонів а. о. М.	Реєстровані іони	Потенціал появи, U_i , eV	Вміст іонів у масспектрах проб повітря, взятих[
			над стерильним агаром (контроль)	над газонами <i>Halobacterium salinarium</i>		
				353П	ET1001	R ₁
2	H ₂ ⁺	14,1	0,02	-	0,02	-
12	C ⁺	27	0,14	0,19	0,15	0,19
14	N ⁺ ; CH ₂ ⁺	25,3; 17,1	2,2	1,14	1,91	2,13
15	CH ₃ ⁺	18,5	-	0,07	0,05	0,01
16	O ⁺ ; CH ₄ ⁺	30; 12,2	0,5	0,54	0,43	0,68
17	OH ⁺ ; NH ₃ ⁺	17,8; 10,4	0,12	0,25	0,13	0,09
18	H ₂ O ⁺ NH ₄ ⁺	12,9	0,45	0,51	0,54	0,38
20	Ne ⁺	20	0,088	0,082	0,081	0,083
22	Ne ⁺	20	0,093	0,082	0,073	0,088
28	N ₂ ⁺	14,3	56	58,1	56,5	61,08
29	N ₂ ⁺	0,38	0,38	0,4	0,36	0,38
32	O ₂ ⁺ ; S ⁺ ;	10; 11,7	0,04	0,05	0,09	3,5
34	H ₂ S ⁺	10,46	-	-	0,013	0,01
40	Ar ⁺	15,1	1	1	1	1
44	CO ₂ ⁺	14,5	4,9	10,8	9,13	9,95
45	CO ₂ ⁺	14,5	0,12	0,1	0,1	0,12
46	CO ₂ ⁺	14,5	0,04	0,04	0,03	0,04

Примітка. Кількості іонів приведено як середні арифметичні значення відносно аргону, n = 3.

- Larsen H. The *Halobacteriaceae*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (N. R. Krieg, ed.), 9th edn. Baltimore-London, Williams and Wilkins. 1984.
- Tindall B. J., Trüper H.G. Ecophysiology of the aerobic halophilic archaeobacteria. In Archaeobacteria '85 (O. Kandler and W. Zilling, eds.), Stuttgart, New York, Gustav Fisher Verlag. 1986.
- Sung-Ho Hur Critical review on the microbiological standardization of salt-fermented fish product. // Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition.- 1996. – 25 (5) P. 885-891.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. Microbiology. 2nd edn. Wm. C. Brown Communications, Inc., Dubuque, IA, USA, 1993, 1006 P.
- Наканиши К. ИК-спектры и строение органических соединений. – М.: Мир, 1965. – 150 с.
- Казицына Л. А., Куплетская Н. В. Применение УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии в органической химии. – М.: Высшая школа, 1971. - 230 с.
- Полякова А. А. Молекулярный масс-спектральный анализ органических соединений. – М.: Химия, 1983.- 248 С.
- Семёнов Г. А., Николаев Е. Н., Францева К. Е. Применение масс-спектрометрии в неорганической химии. – Л.: Химия, 1976. – 151 С.

Examination of a gas phase of cultures *Halobacterium salinarium*

**S.V. Mikulaninec, B.M. Sharga, J.P. Sharkany, T.I. Panait,
I.J. Cjoma, V.V. Jarosh, M.Yu. Sichka**

Uzhgorod National University, 88000 Uzhgorod, Voloshina St. 32

Halobacterium salinarium is a non-pathogenic bacterium. However, it can grow in food products such as salted fish and spoil them. The headspace of the lawns of *Halobacterium salinarium* were analyzed by mass-and IR-spectrometry to find the gaseous products most abounded in atmosphere of the cultures. Possibly, these compounds could be used as markers for control of the fermentation of salted products and quality of the food supplied for market.

Key words: *Halobacterium salinarium*, gaseous products, mass- and IR-spectrometry.