

УДК 579.64:631.44

А.С. Гордиенко, З.Т. Бега, Д.И. Дырченко, И.К. Курдиш

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

**АДГЕЗИЯ НА РАЗЛИЧНЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ
AZOTOBACTER VINELANDII ИМВ В-7076
И BACILLUS SUBTILIS ИМВ В-7023**

*Исследована зависимость адгезии *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 и *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 от некоторых параметров дисперсионной среды (рН, наличие ионов Ca^{2+}). Установлено, что снижение отрицательного заряда бактерий обуславливает увеличение степени их прикрепления к абиотической поверхности (стекло), что соответствует физико-химическим закономерностям данного процесса. Адгезия бактерий на биотической поверхности (корни огурцов) не подчиняется общепринятым представлениям, согласно которым одним из факторов, определяющих эффективность адгезии, является электростатическое отталкивание между взаимодействующими объектами.*

Ключевые слова: адгезия бактерий, корни огурцов, стекло, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*.

Бактерии *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 и *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 являются компонентами гранулированных микробных препаратов комплексного действия [5]. Вне-сение данных препаратов в корневую зону ряда культурных растений, в том числе огурцов, повышает их урожайность [6]. Механизм стимулирующего влияния микроорганизмов на растения недостаточно изучен, также как и роль бактерий в зависимости от их пространственного расположения в прикорневой зоне. Предполагается, что основной вклад в реализацию стимулирующего потенциала принадлежит ассоциативным бактериям, которые способны колонизировать ризоплану корней растений и поддерживать численность популяции на экологически значимом уровне [1, 4]. Первым этапом колонизации является процесс адсорбционного (контактного) взаимодействия микроорганизмов с корнями. Для абиотических поверхностей направленность процесса адгезии определяется, главным образом, физико-химическими факторами, такими как заряд и гидрофобность взаимодействующих поверхностей. При адгезии бактерий на биотических поверхностях определяющее значение,

© А.С. Гордиенко, З.Т. Бега, Д.И. Дырченко, И.К. Курдиш, 2009

очевидно, имеет специфическое взаимодействие между определенными сайтами клеток корневых растений и микроорганизмов [3, 4].

Целью данной работы было сравнительное исследование влияния ряда физико-химических параметров дисперсионной среды (рН, наличие ионов Ca^{2+}) на адгезию бактерий на химически инертном носителе (стекло) и биотической поверхности, в качестве модели которой использовали корни проростков огурцов.

Материалы и методы. Бактерии *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 культивировали в среде Эшби с сахарозой, а *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 в среде следующего состава, г/л: пептон – 10,0; NaCl – 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; KCl – 0,3; KH_2PO_4 и $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ по 0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ по 0,001. Бактерии выращивали в условиях периодического культивирования (24 ч для *B. subtilis* и 48 ч для *A. vinelandii*) на качалке (240 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 750 мл со 100 мл среды при температуре 28 °С. Клетки отмывали центрифугированием трижды в 0,01М NaCl, либо в фосфатном буфере (ионная сила 0,05), и в этих же растворах готовили суспензии бактерий в соответствии с целью конкретного опыта.

В качестве модели биотической поверхности использовали корни проростков огурцов сорта Конкурент. Для получения проростков семена стерилизовали смесью этилового спирта и 50 % перекиси водорода в соотношении 1:1 в течение 5 минут, трижды промывали водопроводной водой и проращивали в течение 5 суток при температуре 25 °С на картофельном агаре в чашках Петри. Полученные корни разрезали на сегменты длиной 1 см и по 100 мг корней вносили в пробирки диаметром 20 мм, длиной 10 см, содержащие по 3 мл суспензии бактерий. Количество жизнеспособных бактерий составляло $(1-2) \cdot 10^8$ кл/мл. Пробирки, содержащие корни огурцов в суспензии клеток, помещали на качалку (130 об/мин, амплитуда 2 см) при комнатной температуре. После инкубации с бактериями в течение 1ч корни трижды отмывали стерильным физиологическим раствором, гомогенизировали в ступке и доводили объем физиологическим раствором до 10 мл. Количество адгезированных жизнеспособных клеток определяли по численности выросших колоний на агаризованной среде в чашках Петри после посева из десятикратных разведений.

В качестве модели абиотической поверхности использовали либо стеклянные гранулы (диаметр 1–2 мм), либо стеклянные пластины. Гранулы (15 г) помещали в вертикально расположенные колонки диаметром 16 мм, которые заполняли суспензией бактерий (7 мл) до полного покрытия адсорбента. Содержание клеток в суспензии составляло $5 \cdot 10^8$ кл/мл. После контакта с адсорбентом в течение 2 ч суспензию сливали и по разности в оптической плотности суспензии бактерий до и после взаимодействия с носителем рассчитывали количество клеток, сорбировавшихся на 1 г стеклянных гранул.

Стеклянные пластины помещали вертикально в суспензию микроорганизмов на 2 ч, а количество бактерий, адгезированных на поверхности носителя, определяли методом прямого счета под микроскопом с фазовым контрастом.

Электрофоретические исследования проводили на установке для микроэлектрофореза [2]. Измеряли скорость электрофореза 50 клеток и рассчитывали их ζ -потенциал.

Результаты и их обсуждение. Данные исследований, представленные в таблицах 1–4, подтверждают тот факт, что закономерности прикрепления бактерий *A. vinelandii* и *B. subtilis* к абиотической поверхности (стекло) отвечают общепринятым представлениям о зависимости процесса адгезии от ряда физико-химических факторов, в частности, электростатического фактора [11]. При обсуждении полученных результатов следует учитывать следующее: известно [10], что увеличение концентрации катионов в среде обуславливает снижение отрицательного потенциала (ζ -потенциала) частиц неорганической природы, а увеличение рН дисперсионной среды, наоборот, возрастание отрицательного заряда их поверхности.

Установлено (табл. 1 и 2), что увеличение содержания в среде ионов Ca^{2+} приводит к снижению отрицательного ζ -потенциала клеток бактерий и, как можно полагать, к такому же эффекту для поверхности стекла. Таким образом, уменьшается энергия электростатического отталкивания между взаимодействующими поверхностями, что должно приводить к возрастанию адгезии клеток на неорганическом носителе [11] и это подтверждается экспериментальными данными (табл. 1 и 2).

Таблица 1

Влияние ионов Ca^{2+} на ζ -потенциал и адгезию клеток *Azotobacter vinelandii*

Концентрация $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, г/л	ζ -потенциал, мВ	Адгезия, %	
		Стекло	Корни
0	-48,8	100,0	100,0
0,05	-43,6	110,4	77,6
0,5	-29,9	129,7	63,7

Примечание: дисперсионная среда – 0,01 М NaCl, pH 7,0; адгезия бактерий в отсутствие $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ принята за 100 %.

Таблица 2

Влияние ионов Ca^{2+} на ζ -потенциал и адгезию клеток *Bacillus subtilis*

Концентрация $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, г/л	ζ -потенциал, мВ	Адгезия, %	
		Стекло	Корни
0	-42,1	100,0	100,0
0,05	-40,5	105,3	100,7
0,5	-25,4	184,2	227,3

Примечание: дисперсионная среда – 0,01 М NaCl, pH 7,0; адгезия бактерий в отсутствие $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ принята за 100 %.

При увеличении pH дисперсионной среды имеет место незначительное возрастание отрицательного ζ -потенциала клеток бактерий (табл. 3 и 4). Неизвестно насколько возрастает отрицательный заряд поверхности стекла, но, в соответствии с известными фундаментальными представлениями о данном процессе [10], такая тенденция должна иметь место. В частности, для диоксида кремния показано [13], что в условиях, при которых проведены измерения электроповерхностных свойств исследуемых бактерий, ζ -потенциал частиц составлял -4,5 мВ при pH 5 и -22,0 мВ при pH 7. Следовательно, при увеличении pH дисперсионной среды возрастает отрицательный заряд как клеток, так и поверхности стекла, что должно обуславливать увеличение энергии отталкивания между поверхностью клеток и адсорбента и, соответственно, снижение эффективности прикрепления бактерий на данном носителе. Теоретические предпосылки полностью подтверждаются экспериментальными данными (табл. 3 и 4).

Клеточная стенка клеток корней представлена целлюлозными микро- и макрофибриллами, погруженными в матрикс [8]. Матрикс состоит из полисахаридов (пектины), гемицеллюлоз и белка (экстенсин). В состав оболочки также входят такие важные в функциональном плане элементы как гликопротеины (лектины). Все перечисленные компоненты являются заряженными макромолекулами, включающими как положительно, так отрицательно заряженные ионогенные группы. Степень диссоциации ионогенных групп определяется pH дисперсионной среды [14]. Поверхность стенки растительных клеток имеет суммарный отрицательный заряд [8], и величина этого заряда в большей или меньшей степени должна возрастать при увеличении pH дисперсионной среды. Эта зависимость имеет место и для клеток микроорганизмов, структурными компонентами поверхности которых являются макромолекулы, содержащие подобные ионогенные группы [14], что и подтверждается данными наших исследований (табл. 3 и 4).

Таблица 3

Влияние pH дисперсионной среды на ζ -потенциал и адгезию клеток *Azotobacter vinelandii*

pH дисперсионной среды	ζ -потенциал, мВ	Адгезия, %	
		Стекло	Корни
5,0	-40,1	100,0	100,0
6,0	-41,0	77,1	107,5
7,0	-41,8	60,1	112,4
8,0	-43,6	43,0	121,5

Примечание: дисперсионная среда – фосфатный буфер, ионная сила – 0,05; адгезия бактерий при pH 5 принята за 100 %.

Влияние pH дисперсионной среды на ζ -потенциал и адгезию клеток *Bacillus subtilis*

pH дисперсионной среды	ζ -потенциал, мВ	Адгезия, %	
		Стекло	Корни
5,0	– 24,6	100,0	100,0
6,0	– 27,3	73,0	176,3
7,0	– 26,5	75,2	154,5
8,0	– 28,5	59,0	117,5

Примечание: дисперсионная среда – фосфатный буфер, ионная сила – 0,05; адгезия бактерий при pH 5 принята за 100 %.

При обсуждении полученных результатов следует учитывать тот факт, что при увеличении pH дисперсионной среды возрастает и отрицательный заряд клеток корней. Поэтому должна возрастать энергия отталкивания между растительными клетками и бактериями и, как следствие, снижаться эффективность прикрепления микроорганизмов на поверхности корней, аналогично процессу, имеющему место при адгезии бактерий на стекле. Однако, полученные экспериментальные данные (табл. 3 и 4) находятся в противоречии с вышеизложенным предположением. А именно, как для *B. subtilis*, так и *A. vinelandii* наблюдается тенденция к возрастанию степени адгезии клеток на корнях при увеличении pH дисперсионной среды. Для бацилл эта зависимость имеет более сложный характер с максимумом при pH 6, однако даже при pH 8 количество клеток, прикрепившихся на поверхности корня больше, чем при pH 5.

Влияние ионов Ca^{2+} на формирование электроповерхностных свойств абиотических материалов определяется двумя механизмами: либо данный катион участвует в катионообменном процессе и влияет тем самым на заряд поверхности твердых частиц, либо как катион, обеспечивающий снижение отрицательного потенциала (но не заряда) поверхности, что имеет место для химически инертных поверхностей [10]. Относительно растений известно [8], что корневая система обладает катионообменными свойствами и значительная часть катионообменной емкости обеспечивается за счет Ca^{2+} . Следовательно, увеличение концентрации в среде данного катиона должно приводить к снижению отрицательного заряда клеток корней и, соответственно, к возрастанию адгезии бактерий. Для *B. subtilis* такая зависимость имеет место. В то же время, для *A. vinelandii* наблюдается эффект снижения количества прикрепившихся клеток при увеличении содержания в дисперсионной среде ионов Ca^{2+} (табл. 1 и 2).

Таким образом, установлено различие в адгезии бактерий на корнях и стекле. Наиболее заметно это для клеток *A. vinelandii*, так как их адгезия на биотической поверхности не подчиняется общеизвестным закономерностям данного процесса [11]. Объяснение полученных результатов, вероятно, следует искать, основываясь на том факте, что на биотической поверхности физико-химические параметры дисперсионной среды определяют не только суммарный заряд поверхности, но и конформацию структурных компонентов, составляющих наружный слой как клеток корней, так и клеток бактерий. Известно [10], что одним из факторов, влияющим на конформационную структуру заряженной макромолекулы, является pH среды. Ионы Ca^{2+} прочно связываются с разными органическими соединениями, в том числе входящими в состав оболочки клеток корня [8]. Относительно поверхности бактерий, ионы Ca^{2+} в результате взаимодействия с карбоксильными или фосфорноокислыми группами макромолекул, очевидно, могут изменять функцию данных компонентов [9, 12]. Следовательно, полученные данные о различии в адгезии бактерий на корнях и стекле позволяют предположить наличие специфического взаимодействия между соответствующими сайтами поверхности клеток микроорганизмов и растений. Такое предположение обосновано тем, что специфичность взаимодействия определяется не только наличием соответствующих функциональных групп, но и пространственным расположением данных групп в макромолекулах, конформация которых будет определяться физико-химическими

параметрами дисперсионной среды. Наглядным примером этому является зависимость специфического взаимодействия (собственно, молекулярного узнавания) между ферментом и субстратом и, соответственно, скорости ферментативной реакции от содержания в среде H^+ и других катионов [7].

Данные сравнительной адгезии клеток микроорганизмов на химически инертной абиотической и биотической поверхностях, очевидно, можно использовать в качестве первичного теста, указывающего на возможное наличие специфического взаимодействия бактерий с растениями. Учитывая определяющую роль специфического взаимодействия в формировании растительно-бактериальных ассоциаций [3, 4], можно предположить, что изученные нами бактерии (главным образом, *A. vinelandii*) имеют потенциальную возможность для колонизации корней огурцов.

A.C. Gordienko, Z.T. Bega, D.I. Dyrenko, I.K. Kurdish

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

АДГЕЗИЯ НА РІЗНИХ ПОВЕРХНЯХ *AZOTOBACTER VINELANDII* IMB B-7076 І *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7023

Резюме

Досліджено залежність адгезії *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 і *Bacillus subtilis* IMB B-7023 від деяких параметрів дисперсійного середовища (рН, наявність іонів Ca^{2+}). Показано, що зменшення негативного заряду бактерій обумовлює збільшення ступеня їх прикріплення до абиотичної поверхні (скло), що відповідає фізико-хімічним закономірностям даного процесу. Адгезія бактерій на біотичній поверхні (корінці огірків) не підпорядковується загальноприйнятим уявленням, згідно з якими одним із факторів, що визначають ефективність адгезії, є електростатичне відштовхування між об'єктами, що взаємодіють.

Ключові слова: адгезія бактерій, корінці огірків, скло, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*.

A.S.Gordienko, Z.T.Bega, D.I.Dyrenko, I.K.Kurdish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

ADHESION OF *AZOTOBACTER VINELANDII* IMV V-7076 AND *BACILLUS SUBTILIS* IMV V-7023 ON DIFFERENT SURFACES

S u m m a r y

The dependence of *Azotobacter vinelandii* IMV V-7076 and *Bacillus subtilis* IMV V-7023 adhesion on some parameters of dispersion media (pH, Ca^{2+} ions presence) has been investigated. It has been determined that a decrease of bacteria negative charge determines an increase of the degree of their attachment to abiotic surface (glass) that corresponds to physicochemical regularities of the given process. The adhesion of bacteria on the biotic surface (cucumber roots) is not subordinated to generally accepted ideas, according to which the electrostatic repulsion between the interacting objects is one of factors that determines the adhesion effectiveness.

The paper is presented in Russian.

Key words: bacterial adhesion, cucumber roots, glass, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*.

The authors' address: *A.S.Gordienko*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Волкогон В.В. Ассоциативные азотфиксирующие микроорганизмы // Микробиол. ж.—2000. — 62, №2. —С. 51 — 68.
2. Глоба Л.И., Гордиенко А.С. Установка для микроэлектрофореза // Мед.техника. — 1980. — №2. — С. 50—51.
3. Карпунина Л.В. Роль агглютинирующих белков ризобий и азотфиксирующих бацилл при взаимодействии с растениями // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями.— Москва : Наука, 2005. — С. 98 — 117.
4. Коннова С.А., Федоненко Ю.П., Игнатов В.В. Структура и функции гликополимеров поверхности азоспирил // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями.—Москва : Наука, 2005. — С. 46—69.

5. Курдиш І., Рой А., Титова Л. Гранульовані препарати комплексної дії на основі азотфіксуючих та фосфатомобілізуєчих бактерій // Аграрна освіта і наука на початку третього тисячоліття. — Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції. — Том.1. Львів, 18 – 21 вересня 2001. — Львів, 2001.— С.189–194.
6. Курдиш И.К., Рой А.А., Бега З.Т., Чернова Л.С. Научные основы создания гранулированных микробных препаратов комплексного действия на растения //Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем. — Выпуск 3. /Материалы докладов международной научно-практической конференции. — Краснодар, 29 сентября – 1 октября 2004. —Краснодар, 2004. — С. 81–83.
7. Мецлер Д. Биохимия. — Москва: Мир, 1980. Т.1 — 407 с; Т.2 — 606 с.
8. Мусієнко М.М. Фізіологія рослин.— Київ: Фітосоціоцентр, 2001. — 392 с.
9. Степная О.А., Бегунова Е.А., Цфасман И.М., Тульская И.С., Стрешинская Г.М., Наумова И.Б., Кулаев И.С. Роль анионных полимеров клеточных стенок грамположительных бактерий-мишеней в механизме действия на них внеклеточных бактериолитических ферментов // Микробиология..— 2004. — 73, № 4. — С. 479–485.
10. Фридрихсберг Д.А. Курс коллоидной химии. — Москва: Химия, 1984. — 368 С.
11. Bos R., van der Mei H.S., Busscher H.J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions — its mechanism and methods for study //FEMS Microbiol. Rev. — 1999. — 23, N2. — P. 179–230.
12. Dittrich M., Sibling S. Influence of H⁺ and calcium ions on surface functional groups of *Synechococcus* PCC 7942 cells // Langmuir. — 2006. — 22, N 12. — P. 5435–5442.
13. Gordienko A.S., Zhanatskaya I.V., Kurdish I.K. Change in electrosurface properties in *Methylomonas rubra* cells at contact interaction with the particles of silicon dioxide //Can. J. Microbiol. — 1993. — 39, — N 9. — P. 902 – 905.
14. James A.M. The electrical properties and topochemistry of bacterial cells // Adv. Colloid. and Interface Sci. — 1982. — 15, № 3–4. — P. 429–438.

Отримано 7. 10. 2008