

УДК 579.083.13

А.Ю. Чоботарьов¹, А.С. Гордієнко¹, А.І. Самчук², І.К. Курдиш¹

¹*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ДСП, Д03680, Україна*

²*Інститут геохімії, мінералогії та рудоутворення НАН України,
пр. Академіка Палладіна, 34, Київ-142, 03680, Україна*

ВПЛИВ ДІОКСИДУ КРЕМНІЮ І САПОНІТУ НА РІСТ *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7023

*Досліджено ріст *Bacillus subtilis* IMB B-7023 за наявності в середовищі культивування діоксиду кремнію і сапоніту. Встановлено, що внесення в середовище даних матеріалів суттєво впливало на ріст активність бактерій. Ефективність і спрямованість даного процесу залежить як від типу дисперсного матеріалу, так і від вмісту фосфату в середовищі. Так, при концентрації 0,6 г/л PO_4^{3-} сапоніт стимулює ріст бактерій, а при більш низькій концентрації (0,1 г/л PO_4^{3-}) відбувається зниження ростової активності мікроорганізмів. В той же час в присутності діоксиду кремнію стимуляція росту бактерій спостерігається при різних концентраціях фосфату в середовищі. Показано, що даний ефект не є наслідком сорбції фосфату на поверхні обох досліджених дисперсних матеріалів. Виявлено наявність контактної взаємодії твердих частинок з клітинами бактерій.*

*Ключові слова: *Bacillus subtilis*, культивування, сапоніт, діоксид кремнію.*

Взаємодія мікроорганізмів з твердими, зокрема високодисперсними, матеріалами дуже поширена в природі. Згідно з даними літератури близько 99 % ґрунтових мікроорганізмів функціонують в контакт з твердими часточками [12]. Взаємодія бактерій з твердими матеріалами різної природи часто супроводжується підвищенням їх фізіологічної активності [6]. Так, наприклад, за наявності в середовищі мінералу палигорськіту та діоксиду титану спостерігається підвищення інтенсивності росту *Bacillus subtilis* та *Azotobacter vinelandii*, відповідно [4, 7].

Механізми стимулюючої дії матеріалів неорганічної природи на фізіологічну активність мікроорганізмів не відомі. Існує ряд моделей, в яких необхідною умовою цього процесу є наявність контактної взаємодії між твердими часточками та бактеріями [13]. Останнім часом певна роль відводиться властивостям поверхні, наприклад, носіїв для імобілізації клітин дріжджів та алканофільних родококів [5]. В той же час, виявлено особливості контактної взаємодії часточок діоксиду кремнію з клітинами *B. subtilis*, вирощених за різного вмісту фос-

© А.Ю. Чоботарьов, А.С. Гордієнко, А.І. Самчук, І.К. Курдиш, 2010

фату в живильному середовищі, що пояснюється відмінністю у властивостях бактеріальної поверхні [3].

Певний інтерес викликає дослідження впливу на функціонування мікроорганізмів дисперсних матеріалів діоксиду кремнію та сапоніту. Вплив сапоніту на ріст мікроорганізмів до цього часу не досліджувався. В той же час, вірогідно, даний мінерал має біологічно активні властивості, що і обумовило можливість його використання у тваринництві як комплексну мінеральну добавку [11]. Раніше було показано, що діоксид кремнію підвищує фізіологічну активність *A. chroococcum* [9].

Метою роботи було дослідити вплив діоксиду кремнію та сапоніту на ріст фосфатомобілізівних бактерій *B. subtilis* IMB B-7023 залежно від концентрації фосфату в середовищі культивування.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був штам фосфатомобілізівних бактерій *B. subtilis* IMB B-7023 [8]. Бактерії вирощували в глюкозо-мінеральному середовищі наступного складу, (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 0,5$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} - 0,3$; $\text{NaCl} - 0,3$; $\text{KCl} - 0,3$; $\text{CaCO}_3 - 5,0$; $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} - 0,001$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} - 0,001$; глюкоза – 10,0; неорганічні фосфати: $(\text{KH}_2\text{PO}_4$ та $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ в співвідношенні 1:1) 0,2 (0,1 PO_4^{3-}) або 1,0 (0,6 PO_4^{3-}); pH 7,0 – 7,4. Діоксид кремнію та сапоніт вносили в живильне середовище перед стерилізацією в наступних концентраціях, (г/л): 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20.

Культивування мікроорганізмів проводили протягом 24 год при 28 °C в колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл, в які вносили по 100 мл середовища. Як інокулом використовували одностовову культуру бактерій. Початковий вміст життєздатних бактерій складав $1 \cdot 10^6$ кл/мл. Їх кількість визначали за чисельністю колоній, що виростили на твердому живильному середовищі після висіву суспензії із серійних десятикратних розведень.

Високодисперсний діоксид кремнію наданий Інститутом хімії поверхні НАН України. В нативному стані даний матеріал складається із агрегатів часточок, які у водній фазі дезінтегруються до окремих часточок розміром 5–20 нм. Сапоніт є природнім мінералом, різновидом бентонітових глин [15]. В ростових експериментах використовували сапоніт Ташківсько-го родовища, Хмельницької області в нативній формі.

Для електрофоретичних досліджень отримували дві фракції даного дисперсного мінералу. Перша фракція – часточки, що утворювали осад при центрифугуванні при 1000 g, 5 хв (для визначення заряду часточок), а друга – часточки, що залишилися в надосадовій рідині при центрифугуванні при 2000 g, 5 хв (для досліджень взаємодії з бактеріальними клітинами).

Вирощені клітини послідовно відмивали двічі в фізіологічному розчині NaCl та один раз у відповідному живильному середовищі, що не містило CaCO_3 . Електрофоретичні дослідження проводили відомим методом [1]. При вивченні контактної взаємодії клітин бактерій з твердими часточками готували наступні типи зразків: суспензію клітин; суспензію сапоніту; суспензію клітин бактерій, в яку вносили високодисперсну фракцію глинистого мінералу. Зразки, що містили бактеріальну суспензію з дисперсним матеріалом перемішували на мішалці WU-4 при 100 об/хв протягом 20 хв. Вимірювали швидкість електрофорезу 50 клітин і часточок та розраховували їх ζ - потенціал.

Концентрацію фосфату в дослідних зразках визначали за методом Фіске – Суббароу фотокolorиметрично при довжині хвилі 590 нм та довжині оптичного шляху 1 см з наступним перерахунком за калібрувальною кривою, побудованою на основі фотометрії стандартних розчинів фосфату [10].

Вміст катіонів у розчині визначали за допомогою мас-спектрометра з індукційною зв'язаною плазмою (ICP-MS) аналізатора Elements – 2 (Німеччина). Як стандарт використовували індій (^{115}In).

Одержані експериментальні дані обробляли за допомогою пакету програм «Statistica».

Результати та їх обговорення. Встановлено, що додавання сапоніту в середовище культивування, яке містило 0,6 г/л PO_4^{3-} , спричиняло значну стимулюючу дію на ріст фосфатомобілізівних бактерій *B. subtilis* (рис. 1). Ступінь цього впливу збільшувався з підвищенням концентрації дисперсного матеріалу. Максимальний приріст клітин спостерігався при вмісті сапоніту 5,0 та 10,0 г/л. В цьому випадку кількість клітин в дослідних варіантах була відповідно в 2,3 та 2,4 рази вищою, ніж у контролі.

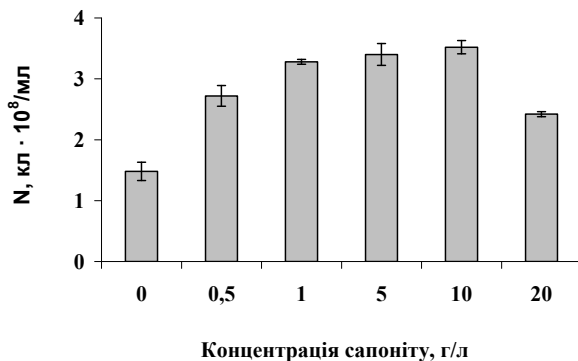


Рис. 1. Чисельність життєздатних клітин (N) *Bacillus subtilis* IMB B-7023 при їх культивуванні в середовищі з сапоном, що містило 0,6 г/л PO_4^{3-}

Подібні результати були отримані нами при культивуванні *A. vinelandii* в середовищі з діоксидом титану, що супроводжувалося підвищенням ростової активності культури в 5 разів порівняно з контролем [4]. Було зроблено припущення, що причиною збільшення ростової активності бактерій може бути інтенсифікація процесів надходження субстрату до мікробної клітини.

При концентрації в середовищі сапону 20,0 г/л спостерігалось зниження стимуляції росту культури (чисельність бактерій в дослідному варіанті була вищою від контролю, але нижчою, ніж у інших дослідних варіантах) (рис. 1). Подібний ефект при високих концентраціях, наприклад, дисперсного діоксиду титану спостерігався також для *A. vinelandii* [4]. Відомо [2], що при деяких концентраціях дисперсні матеріали можуть утворювати на поверхні клітин бактерій шар з сорбованих часточок дисперсного матеріалу. Можливо, наявність такого шару на поверхні бактерій створює бар'єр для переносу субстрату до поверхні клітин, що, в свою чергу, призводить до зниження ростової активності мікроорганізмів.

Іншу закономірність спостерігали при низькому вмісті PO_4^{3-} (0,1 г/л) в живильному середовищі. За таких умов при внесенні в середовище сапону в усіх досліджених концентраціях має місце зниження ростової активності *B. subtilis* (рис. 2). Можна було б припустити, що даний ефект пов'язаний із лімітуванням росту бацил фосфатом у зв'язку з сорбцією даного компоненту на природному мінералі. Однак, було встановлено, що сорбція фосфату на цьому матеріалі не відбувається. Так, наприклад, при внесенні 5,0 г/л сапону (оптимальна концентрація для росту бактерій) в живильне середовище зменшення вмісту фосфату в середовищі не виявлено.

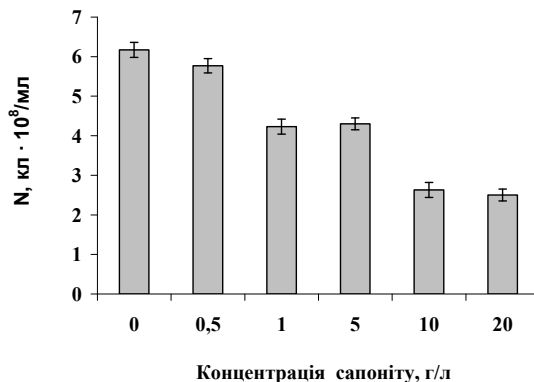


Рис. 2. Чисельність життєздатних клітин (N) *Bacillus subtilis* IMB B-7023 при їх культивуванні в середовищі з сапоном, що містило 0,1 г/л PO_4^{3-}

Взаємодія мікроорганізмів з твердими матеріалами і, насамкінець, метаболічна активність популяції значною мірою визначається властивостями як поверхні матеріалу [5], так і поверхні бактеріальної клітин [3]. Відомо, що склад компонентів поверхні бактерій *B. subtilis* може суттєво варіювати залежно від умов культивування [14].

Раніше показано [3], що досліджувані бактерії, які вирощені в середовищі з вмістом фосфатів 0,2 і 1,0 г/л, відрізняються властивостями поверхні. Тому було доцільним дослідити особливості взаємодії клітин із сапонітом, що одержані за цих умов культивування.

Показано, що сорбція часточок дисперсного матеріалу має місце для бактерій, які вирощені при двох досліджених концентраціях фосфату в середовищі (0,1 та 0,6 г/л PO_4^{3-}) (табл. 1). Так, виявлено, що негативний заряд клітин мікроорганізмів мав вище значення, ніж часточки сапоніту. В той же час, внесення дисперсного мінералу в суспензію бактерій обумовлювало зниження їх ζ - потенціалу. Відомо [2], що даний ефект пов'язаний з сорбцією високодисперсних твердих часточок на поверхні клітин, тобто має місце контактна взаємодія сапоніту з бактеріями. Раніше було показано наявність сорбції на поверхні *B. subtilis* часточок діоксиду кремнію [3].

Таблиця 1

ζ – потенціал клітин *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 вирощених при різних концентраціях фосфату в середовищі при внесенні в суспензію сапоніту

Зразок	ζ – потенціал зразка, мВ	
	0,1 г/л PO_4^{3-}	0,6 г/л PO_4^{3-}
Сапоніт	- 20,0	- 21,4
Суспензія клітин (без мінералу)	- 27,3	- 28,3
Суспензія клітин + 50 мг/л сапоніту	- 24,1	- 25,0
Суспензія клітин + 100 мг/л сапоніту	- 22,7	- 23,7
Суспензія клітин + 150 мг/л сапоніту	- 22,3	- 22,3
Суспензія клітин + 200 мг/л сапоніту	- 21,5	- 21,4

Ймовірність контактної взаємодії мікроорганізмів із твердими матеріалами значно збільшується при наявності в дисперсному середовищі дво- і трьохвалентних катіонів металів [6]. Так, наприклад, при внесенні в мікробну суспензію 100 мг/л йонів Ca^{2+} та Mg^{2+} адгезія бактерій *Methylomonas rubra* до скла збільшується в 10 разів [6]. Відомо [15], що глинисті мінерали характеризуються катіонообмінними властивостями. У зв'язку з цим проведено хімічний аналіз живильного середовища після внесення природного мінералу сапоніту. Встановлено, що з цього мінералу в живильне середовище вивільняється певна кількість двовалентних (Ca^{2+} і Mg^{2+}) катіонів, які можуть впливати на ефективність взаємодії бактерій із часточками сапоніту (табл. 2).

Таблиця 2

Кількість катіонів, що вивільняються з сапоніту в живильне середовище

Катіони, що вивільняються в середовище	Концентрація катіонів в середовищі, мг/л
Na^+	158
K^+	191
Mg^{2+}	63
Ca^{2+}	124
Mn^{2+}	сліди
Fe^{3+}	сліди
Mo^{4+}	сліди
Co^{2+}	сліди

Примітка: Концентрація сапоніту в середовищі 10 г/л.

Встановлено, що діоксид кремнію стимулював ріст *B. subtilis* при різних концентраціях фосфату в живильному середовищі, на відміну від впливу на цей процес сапоніту. При концентрації 0,1 г/л PO_4^{3-} підвищення ростової активності спостерігалось при внесенні 0,1 – 1,0 г/л дисперсного матеріалу, тобто при суттєво нижчих значеннях ніж для сапоніту (рис. 3). При культивуванні мікроорганізмів у середовищі, що містило 0,6 г/л PO_4^{3-} стимулюючий вплив діоксиду кремнію проявляється у двох діапазонах концентрацій: 0,1 – 0,5 г/л та 10,0 г/л (рис. 4). Такий характер росту, можливо, пояснюється неоднозначною відповіддю клітин, вирощених за таких умов, на внесення в їх суспензію дисперсного матеріалу [3].

Таким чином, показано, що ефективність впливу сапоніту та діоксиду кремнію на ріст *B. subtilis* визначається як типом дисперсного мінералу, так і вмістом фосфату в середовищі.

щі культивування. Стимулююча дія діоксиду кремнію має місце при різних концентраціях фосфату, в той же час у присутності сапоніту збільшення ростової активності бактерій проявляється тільки при наявності в середовищі 0,6 г/л PO_4^{3-} . Доведено наявність контактної взаємодії клітин з часточками сапоніту, а це є одним із основних аспектів загальноприйнятого уявлення про необхідність даного процесу при розгляді можливого механізму позитивного впливу твердих поверхонь на фізіологічну активність мікроорганізмів.

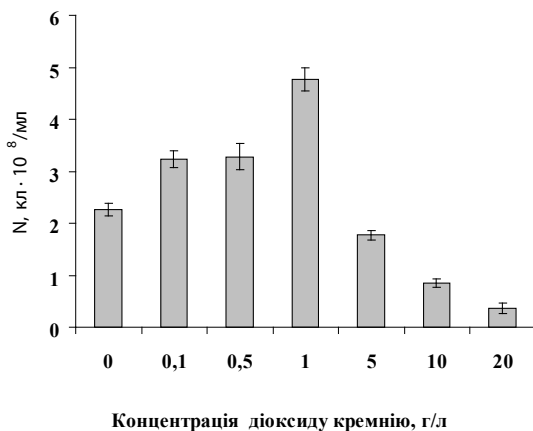


Рис. 3. Чисельність життєздатних клітин (N) *Bacillus subtilis* IMB B-7023 при їх культивуванні в середовищі з діоксидом кремнію, що містило 0,1 г/л PO_4^{3-}

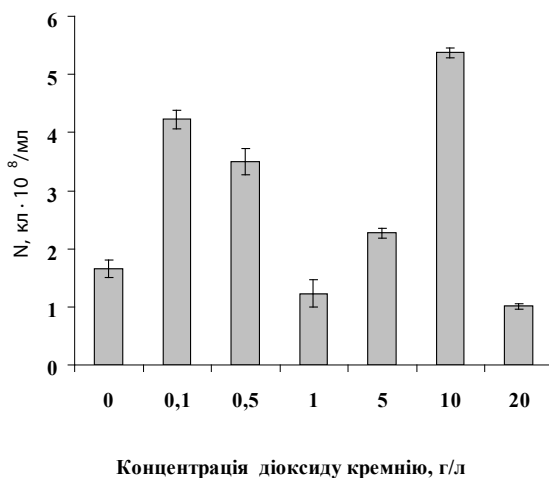


Рис. 4. Чисельність життєздатних клітин (N) *Bacillus subtilis* IMB B-7023 при їх культивуванні в середовищі з діоксидом кремнію, що містило 0,6 г/л PO_4^{3-}

А.Ю. Чеботарев¹, А.С. Гордиенко¹, А.И. Самчук², И.К. Курдиш¹

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

²Інститут геохімії, мінералогії і рудообрання НАН України, Київ

ВЛИЯНИЕ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ И САПОНИТА НА РОСТ *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7023

Резюме

Исследовали рост *Bacillus subtilis* IMB B-7023 при наличии в среде культивирования диоксида кремния и сапонита. Установлено, что внесение в среду данных материалов существенно влияет на ростовую активность бактерий. Эффективность и направленность данного процесса зависит как от типа дисперсного материала, так и от содержания фосфата в среде. Так, при концентрации 0,6 г/л PO_4^{3-} сапонит

стимулирует рост бактерий, а при более низкой концентрации (0,1 г/л PO₄³⁻) имеет место снижение ростовой активности микроорганизмов. В то же время в присутствии диоксида кремния стимуляция роста бактерий наблюдается при различных концентрациях фосфата в среде. Показано, что данный эффект не является следствием сорбции фосфата на поверхности исследованных дисперсных материалов. Выявлено наличие контактного взаимодействия твердых частиц с клетками бактерий.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, культивирование, сапонит, диоксид кремния.

A. Yu. Chobotarjov¹, A.S. Gordienko¹, A.I. Samchuk², I.K. Kurdish¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²M.P.Semenenko Institute of Geochemistry, Mineralogy and Ore Formation,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

INFLUENCE OF SILICON DIOXIDE AND SAPONITE ON GROWTH OF *BACILLUS SUBTILIS* IMV B-7023

S u m m a r y

Growth of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 was studied under the presence of silicon dioxide and saponite cultivation in the medium. It was established that the adding of these materials into the medium affects significantly the bacteria growth activity. Efficiency and orientation of the process depends on the type of dispersed material and contents of phosphate in the cultivation medium. Thus, under the concentration of 0.6 g/l PO₄³⁻ saponite stimulates the growth of bacteria but at a lower concentration (0.1 g/l PO₄³⁻) growth activity of microorganisms becomes lower. At the same time in the presence of silicon dioxide the stimulation of bacterial growth is observed at different concentrations of phosphate in the medium. It is shown that the present effect is not the result of the phosphate sorption on the surface of the investigated dispersed materials. The contact interaction of solid particles with bacterial cells was found.

The paper is presented in Ukrainian.

K e y w o r d s: *Bacillus subtilis*, cultivation, saponite, silicon dioxide.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Chobotarjov A. Yu., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Глоба Л.И., Гордиенко А.С. Установка для микроэлектрофореза // Мед. техника. – 1980. – № 2. – С. 50–51.
2. Глоба Л.И., Гордиенко А.С., Гарбара С.В., Ротмистров М.Н. Взаимодействие бактерий с природным черкасским палыгорскитом при различных значениях pH среды // Микробиол. журн. – 1983. – 45, № 2. – С. 22–26.
3. Гордиенко А.С., Курдиш И.К. // Электроповерхностные свойства и взаимодействие с частицами диоксида кремния клеток *Bacillus subtilis* // Биофизика. – 2007. – 52, № 2. – С. 314–317.
4. Гордиенко А.С., Чеботарев А.Ю., Курдиш И.К. Влияние диоксида титана на рост *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 // Микробиол. журн. – 2009. – 71, № 3. – С. 19–25.
5. Коваленко Т.А., Перминова Л.В., Чуенко Т.В., Ившина И.Б., Куюкина М.С., Рычкова М.И., Филл Дж.К. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов микроорганизмов. 5. Иммобилизация нерастущих клеток дрожжей и растущих алканотрофных родококков // Биотехнология. – 2006. – № 1. – С. 76–83.
6. Курдиш И.К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. КВЦ. – Київ, 2001. – 142с.
7. Курдиш И.К., Бега З.Т. Влияние глинистых минералов на рост фосфатмобилизующих бактерий *Bacillus subtilis* // Прикл. биохим. и микробиол. – 2006. – 42, № 4. – С. 438–442.
8. Пат. 54923 України, Штам *Bacillus subtilis* IMV B-7023 для одержання бактеріального препарату для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. Опубл. 17.03.2003. Бюл. № 3.
9. Титова Л.В., Курдиш И.К., Гордиенко А.С., Цимберг Е.А., Закардонце О.А. Особенности взаимодействия *Azotobacter chroococcum* 20 с высокодисперсным диоксидом кремния // Микробиол. журн. – 1994. – 56, № 4. – С. 30–35.
10. Унифицированные методы анализа вод. / Под ред. Ю.Ю. Лурье. – М: Химия, 1971. – 207с.
11. Хімич В.В., Хімич О.В., Мельник В.Я. Сапоніт і комплексна вітамінно-мінеральна добавка в раціонах молочних корів // Корми і виробництво – К.: Аграрна наука, 2001. – Вип. 47. – С. 273–274.
12. Costerton J.W., Marrie M.J., Cheng K.J. Phenomena of Bacterial Adhesion // Bacterial Adhesion: Mechanism and Physiological Significance. – New York, London: Plenum Press, 1985. – P.3–43.

13. *Fletcher M.* Effect of Solid Surfaces on the Activity of Attached Bacteria // *Bacterial Adhesion*. – New York, London: Plenum Press, 1985. – P. 326–339.
14. *Graham L.L., Beveridge T.J.* Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall // *J. Bacteriol.* – 1994. – **176**, N 5. – P. 1413–1421.
15. *Murray H.H.* Applied clay mineralogy. – Amsterdam; Oxford: Elsevier, 2007. – 188 p.

Отримано 16.03.2009