

А.Ю. Чоботарьов, А.С. Гордієнко, І.К. Курдиш

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

ВПЛИВ ПРИРОДНИХ МІНЕРАЛІВ НА РІСТ *AZOTOBACTER VINELANDII* ІМВ В-7076

*Встановлено, що при культивуванні *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 в присутності природних мінералів суттєво підвищувалась ростова активність бактерій. Внесення в живильне середовище глауконіту та сапоніту в оптимальних концентраціях (10,0 г/л) обумовлювало збільшення приросту клітин в 6 та 4 рази порівняно з контролем, відповідно. Максимальний стимулюючий ефект фосфориту спостерігався при концентрації 5,0 г/л, за дії якого чисельність життєздатних клітин зростала в 5 разів. Показано наявність контактної взаємодії клітин бактерій з часточками досліджених мінералів.*

Ключові слова: *Azotobacter vinelandii*, культивування, адгезія, глауконіт, сапоніт, фосфорит.

Внесення в середовище культивування бактерій дисперсних матеріалів різної природи призводить до збільшення швидкості росту, зміни фізіологічних та біохімічних процесів у клітинах [3]. Так, у присутності глинистого мінералу палигорськіту суттєво зростала чисельність життєздатних клітин *Bacillus subtilis* [4], а для дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* спостерігалось підвищення зброджувальної активності [6]. Для деяких представників роду *Azotobacter* показано підвищення фізіологічної активності при внесенні в середовище культивування вискодисперсних матеріалів [7]. Нами була виявлена стимулююча дія діоксиду титану на ріст *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 [2]. Механізми даного явища досліджені недостатньо. Один із основних аспектів загальноприйнятого уявлення про позитивний вплив різних абіотичних матеріалів на фізіологічну активність мікроорганізмів є наявність контактної взаємодії між клітинами і твердими матеріалами [11].

Перспективними матеріалами, які до цього часу не були досліджені, і які було б доцільно використовувати в технології культивування мікроорганізмів, можуть бути глауконіт, сапоніт та фосфорит. Так, сапоніт застосовують в сільському господарстві як комплексну мінеральну кормову добавку [9]. Глауконіт та фосфорит використовують як мінеральне добриво природного походження [10, 13].

Метою роботи було дослідити вплив глауконіту, сапоніту та фосфориту на ріст азотфіксуючих бактерій *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був штамп бактерій *A. vinelandii* ІМВ В-7076 [5]. Бактерії вирощували протягом 48 годин при температурі 28 °С на середовищі Ешбі з глюкозою в колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл, в які вносили по 100 мл середовища. Сапоніт, глауконіт та фосфорит вносили у живильне середовище перед стерилізацією в концентраціях від 0,5 до 20,0 г/л. Як інокулом використовували одностовову культуру бактерій. Початковий вміст життєздатних бактерій складав $5,0 \cdot 10^6$ кл/мл. Їх чисельність визначали за кількістю колоній, що виростали на твердому живильному середовищі після висіву суспензії з серійних десятикратних розведень.

Сапоніт Ташківського родовища Хмельницької області є різновидом бентонітових глин із високим вмістом магнію (до 12 %) [15]. Глауконіт Маціорського родовища Хмельницької області відноситься до групи гідролюд та містить значну кількість калію (до 10 %) [14]. Фосфорит родовища Жовнувате Хмельницької області входить до групи апатитів, в складі якого міститься до 10 % P_2O_5 [1]. Мінерали подрібнювали у фарфоровій ступці до порошокподібного стану. Розмір часточок (0,5–350,0 мкм) визначали за допомогою електронного скануючого мікроскопа марки Jeol JSM-6490LV (Японія).

Дослідження адсорбційної взаємодії бактерій *A. vinelandii* з мінералами проводили в середовищі Ешбі без карбонату кальцію. В колби Ерленмейера об'ємом 750 мл вносили по 100 мл суспензії бактерій (титр клітин становив $1,5 \cdot 10^6$ кл/мл) та 5,0 г/л досліджуваного мінералу. Контрольний варіант – суспензія мікроорганізмів без мінералу. Умови досліді: досліді проводили в періодичних умовах (160 об/хв) при 25 °С протягом однієї години. Зразки

центрифугували 5 хв при 2000 g. Такий режим центрифугування забезпечував осадження більше, ніж 95 % часточок дисперсних матеріалів. В надосадовій рідині визначали кількість життєздатних клітин.

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

Результати та їх обговорення. Показано, що внесення в середовище культивування глауконіту спричиняло значну стимулюючу дію на ріст азотфіксувальних бактерій *A. vinelandii* ІМВ В-7076 (рис. 1), а ступінь впливу дисперсного мінералу варіювала залежно від його вмісту в середовищі. Найбільший приріст мікроорганізмів спостерігався при 5,0 та 10,0 г/л глауконіту. За таких умов кількість клітин в дослідних варіантах була відповідно в 4,3 та 6,0 разів вищою, ніж у контролі. Збільшення концентрації мінералу до 20,0 г/л обумовлювало зниження ростової активності культури, але і за таких умов вона була вищою, ніж у контрольному варіанті. Аналогічні результати були отримані для *A. vinelandii* ІМВ В-7076 при взаємодії його з діоксидом титану [2].

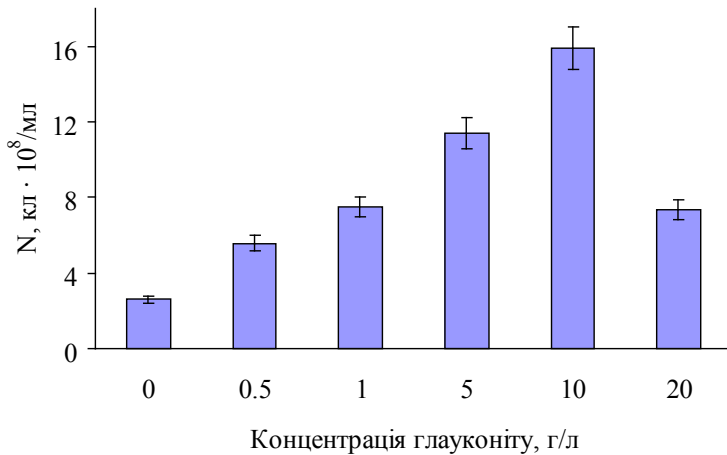


Рис. 1. Залежність чисельності життєздатних клітин (N) *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 від вмісту глауконіту в середовищі культивування

Подібна закономірність спостерігалася при вивченні впливу природного мінералу сапоніту на ріст досліджуваних бактерій (рис. 2). Як і в попередніх дослідях, найбільший приріст мікроорганізмів мав місце при концентрації мінералу в середовищі 5,0 та 10,0 г/л. За таких умов кількість клітин в дослідних варіантах була відповідно в 3,0 та 4,0 рази вищою, ніж у контролі.

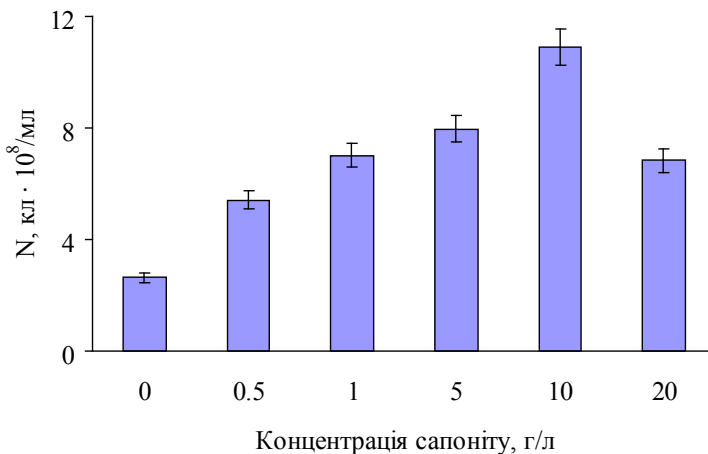


Рис. 2. Залежність чисельності життєздатних клітин (N) *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 від вмісту сапоніту в середовищі культивування

Внесення природного мінералу фосфориту в середовище культивування також обумовлювало стимулювання ростової активності культури *A. vinelandii* (рис. 3). Максимальний стимулюючий вплив на бактерії спостерігався при концентрації мінералу 5,0 г/л, де кількість життєздатних мікроорганізмів перевищувала значення у контрольному варіанті в 5,0 разів (рис. 3).

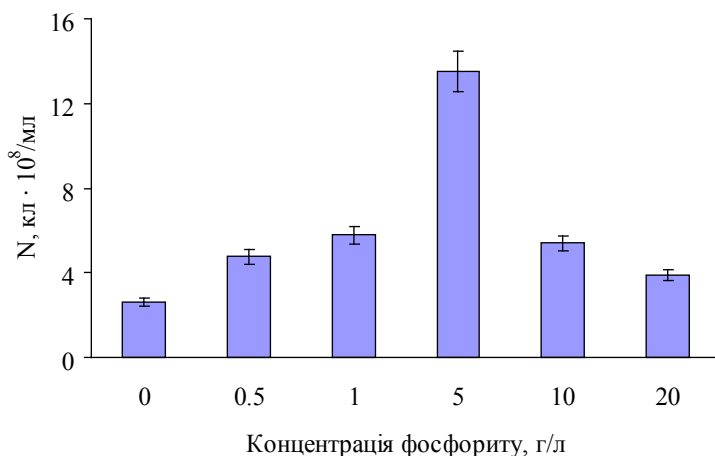


Рис. 3. Залежність чисельності життєздатних клітин (N) *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 від вмісту фосфориту в середовищі культивування

Необхідно зазначити, що при високому вмісті мінералів у середовищі (20,0 г/л) має місце зниження позитивного впливу цих матеріалів на ріст бактерій. Така ж залежність спостерігалась для *B. subtilis* і *A. vinelandii* при їх культивуванні в присутності палигорськіту [4] і діоксиду титану [2]. Відомо, що при певних концентраціях дисперсних матеріалів клітина оточена шаром, сформованим із твердих часточок [12]. Можливо, це заважає надходженню субстрату до поверхні клітини і, як наслідок, призводить до зниження ростової активності мікроорганізмів.

Механізм стимулюючої дії твердих поверхонь на ростову активність мікроорганізмів невідомий. Нами на основі одержаних даних було зроблено припущення, що даний ефект є наслідком «полегшеної» дифузії субстрату в клітину [2]. Однією з причин цього може бути наступне. Як показано в роботі [8], контакт твердих часточок із полісахаридом впливає на концентрацію зв'язаної води і це призводить до деформації супрамолекулярних структур. Можливо, даний фізико-хімічний процес має місце при взаємодії досліджуваних мінералів із полісахаридними компонентами, що формують капсулу *A. vinelandii*. Внаслідок цього може змінюватись просторова структура капсули, що, ймовірно, буде сприяти «полегшеній» дифузії субстрату. В той же час, реалізація такого механізму потребує контакту часточок твердих мінералів із поверхнею бактерій. У зв'язку з цим, наступним етапом досліджень було виявити наявність адсорбційної взаємодії між *A. vinelandii* та мінералами.

Встановлено (таблиця), що внесення в суспензію бактерій мінералів забезпечує суттєве зменшення кількості клітин у надосадовій рідині порівняно з контрольним варіантом. Оскільки досліджені дисперсні матеріали являються гетерогенними за розміром часточок, даний ефект можна пояснити тим, що, по-перше, певна частина бактерій адсорбується на часточках дисперсних матеріалів; по-друге, не виключена можливість процесу гетерокоагуляції, наслідком якого є утворення агрегатів з клітин і дрібних твердих часточок. Надалі бактерії разом із мінералами видаляються в осад при центрифугуванні. Тобто отримані результати свідчать про наявність контактної взаємодії між клітинами та мінералами.

Отже, додавання у живильне середовище глауконіту, сапоніту та фосфориту значно підвищує ростову активність культури *A. vinelandii*. При внесенні в середовище культивування природних мінералів приріст життєздатних бактерій збільшується порівняно з контрольними варіантами в 4–6 разів, залежно від типу мінералу.

Кількість клітин *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 в надосадовій рідині при внесенні в суспензію бактерій природних мінералів

Зразок	Кількість клітин в надосадовій рідині, %
Контроль	100
Глауконіт	13,2
Сапоніт	5,7
Фосфорит	10,5

Примітка: Контроль – кількість клітин в надосадовій рідині за відсутності дисперсних матеріалів

А.Ю. Чеботарев, А.С. Гордиенко, І.К. Курдиш

Институт мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

**ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ МИНЕРАЛОВ НА РОСТ
AZOTOBACTER VINELANDII IMB B-7076**

Резюме

Установлено, що при культивуванні *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 в присутстві природних мінералів суттєво підвищувалась ростова активність бактерій. Внесення в питательную среду глауконита и сапонита в оптимальных концентрациях (10,0 г/л) обуславливало увеличение прироста клеток в 6 и 4 раза по сравнению с контролем, соответственно. Максимальный стимулирующий эффект фосфорита наблюдался при концентрации 5,0 г/л, при этом численность жизнеспособных клеток возрастала в 5 раз. Показано наличие контактного взаимодействия клеток бактерий с частицами исследованных минералов.

Ключевые слова: *Azotobacter vinelandii*, культивування, адгезія, глауконіт, сапоніт, фосфорит.

A. Yu. Chobotarjov, A. S. Gordienko, I. K. Kurdish

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

**INFLUENCE OF NATURAL MINERALS ON GROWTH
OF *AZOTOBACTER VINELANDII* IMB B-7076**

Summary

It was shown that the cultivation of *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 in the presence of natural minerals significantly increased the growth of bacteria activity. Adding in the medium glauconite and saponite in optimal concentration (10 g/l) conditioned the increase of cell growth six and four times compared with control, accordingly. The maximum stimulating effect was observed when the concentration of phosphates was 5.0 g/l, herewith the number of viable cells increased 5 times. The presence of contact interaction of bacterial cells with investigated particles minerals was shown.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: *Azotobacter vinelandii*, cultivation, adhesion, glauconite, saponite, phosphorite.

The author's address: *Chobotarjov A. Yu.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Брагин Ю.М. Зернисті фосфорити України. – Сімферополь: ВПП «Таврія», 2000. – 73 с.
2. Гордиенко А.С., Чеботарев А.Ю., Курдиш І.К. Влияние диоксида титана на рост *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 // Мікробіол. журн. – 2009. – 71, № 3. – С. 19–25.
3. Курдиш І.К. Гранулированые микробные препараты для растениеводства: наука и практика. – Киев: КВЦ, 2001. – 142 с.
4. Курдиш І.К., Бега З.Т. Влияние глинистых минералов на рост фосфатмобилизующих бактерий *Bacillus subtilis* // Прикл. биохим. и микробиол. – 2006. – 42, № 4. – С. 438–442.
5. Пат. 72856 UA, МПК (2006), C12N 1/20, AO1C 1/06, AO1N 63/00, AO1P 21/00, CO5F 11/08 (2006.01), C12R 1/065 (2006.01). Штам бактерій *Azotobacter vinelandii* для одержання бактеріального добрива для рослинництва / І.К. Курдиш, З.Т. Бега. – Опубл. 15.08.2006. Бюл. №8.

6. Подгорский В.С., Ковалев Н.Н., Сумневич В.Г., Гавриленко М.Н., Зырянова Л.Ф. Оптимизация процесса культивирования дрожжей в присутствии дисперсного минерала палыгорскита // Микробиол. журн. – 2001. – **63**, № 1. – С. 10–14.
7. Титова Л.В., Антипчук А.Ф., Курдиш И.К., Скочинская Н.Н., Танцюренко Е.В. Влияние высокодисперсных материалов на физиологическую активность бактерий рода *Azotobacter* // Микробиол. журн. – 1994. – **56**, № 3. – С. 60–65.
8. Турова А.А. Взаємодія біоактивних кремнеземних матриць з водою та макромолекулами: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2009. – 21 с.
9. 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. – **47**. – С. 273–274.
10. Oelkers E.H., Valsami-Jones E. Phosphate mineral reactivity and global sustainability // Elements. – 2008. – **4**, N2. – P. 83 – 87.
11. Fletcher M. Effect of solid surfaces on the activity of attached bacteria // Bacterial adhesion. – New York, London: Plenum press, 1985. – P. 326 – 339.
12. Gordienko A. S., Zbanatskaya I. V., Kurdish I. K. Change in electrosurface properties of *Methylomonas rubra* cells at contact interaction with particles of silicon dioxide // Can. J. Microbiol. – 1993. – **39**, N9. – P. 902 – 905.
13. Liliana C., Selvia T. Direct application of phosphate rocks and glauconite as alternative sources of fertilizer in Argentina // Exploration and Mining Geology. – 2003. – **12**, N1-4. – P. 71 – 78.
14. Sakharov B. A., Besson G., Drits V. A. et al. X-ray study of the nature of stacking faults in the structure of glauconites // Clay Minerals. – 1990. – **25**, N6. – P. 419 – 435.
15. Vogels R.J.M.J., Kloprogge J. T., Geus J.W. Synthesis and characterization of saponite clays // American Mineralogist. – 2005. – **90**, N 5-6. – P. 931-944.

Отримано 20.03.2009