

І.О. Герасименко, І.К. Курдиш

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

ВПЛИВ ВЕРМИКУЛІТУ ТА ДІОКСИДУ КРЕМНІЮ НА ДЕГІДРОГЕНАЗНУ АКТИВНІСТЬ *BACILLUS SUBTILIS* ІМВ В-7023 І *AZOTOBACTER VINELANDII* ІМВ В-7076

*Встановлено, що культивування *Bacillus subtilis* та *Azotobacter vinelandii* в живильних середовищах, що містили 5,0 г/л вермикуліту призвело до підвищення дегідрогеназної активності бактерій до 34–40 % порівняно з контролем. За внесення в культуральне середовище 0,5 і 2,5 г/л діоксиду кремнію дегідрогеназна активність *B. subtilis* зростала на 6–7 %. При підвищенні його вмісту в середовищі до 5,0 г/л рівень дегідрогеназної активності знижувався. На активність досліджуваних ферментів *Azotobacter vinelandii* діоксид кремнію не спричиняв позитивного впливу.*

*Ключові слова: *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023, *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076, дегідрогеназна активність, вермикуліт, діоксид кремнію.*

Відомо, що при взаємодії бактерій із наноматеріалами, як правило, відбувається сорбція їх часточок на поверхні клітин. Це супроводжується підвищенням фізіолого-біохімічної активності мікробних популяцій: швидкості росту мікроорганізмів, рухливості клітин, рівня синтезу ними біологічно активних речовин [1, 3]. Причиною цього може слугувати вплив наноматеріалів на активність ферментів енергетичного обміну бактерій.

У даний час наноматеріали на основі діоксиду кремнію знаходять застосування в науці і практиці, зокрема, вони можуть використовуватись у процесі виготовлення бактеріальних препаратів азотфіксуєючих мікроорганізмів з метою підвищення виходу біомаси [1]. Поряд із цим у сільському господарстві широке застосування знаходить вермикуліт, він може використовуватись у ролі сорбенту, меліоранту, добрива, радіопротектора. Цей мінерал добре піддається стерилізації, при цьому не відбувається структурних змін і виділення токсичних побічних продуктів. Також вермикуліт здатний утримувати вологу, поживні речовини, його застосовують для виготовлення бактеріальних інокулянтів, які довго зберігаються, не потребують спеціальних умов і добре прилипають до насіння [12]. Отже, вермикуліт та діоксид кремнію є перспективними матеріалами для створення бактеріальних препаратів для рослинництва.

Важливу роль у енергетичному обміні бактерій відіграють дегідрогенази. Рівень їх активності є одним із показників фізіолого-біохімічного стану мікробної популяції [1, 7]. Дослідження дегідрогеназної активності застосовують для оцінки токсичності деяких компонентів ґрунту щодо його мікробіоти та в інших експериментах [13]. Вплив дисперсних матеріалів на активність ферментів енергетичного обміну фосфатмобілізувальних та азотфіксуєючих бактерій не досліджено. Тому метою даної роботи було визначення впливу різного вмісту наночасточок діоксиду кремнію та вермикуліту на загальну дегідрогеназну активність *Bacillus subtilis* та *Azotobacter vinelandii*.

Матеріали і методи. В дослідженнях використовували фосфатмобілізувальні бактерії *B. subtilis* ІМВ В-7023 та азотфіксуєючі мікроорганізми *A. vinelandii* ІМВ В-7076 [5, 6], що входять до складу комплексного бактеріального препарату для рослинництва.

В дослідках застосовували наночасточки діоксиду кремнію та вермикуліт. Діоксид кремнію, що був наданий Інститутом хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України, є синтетичною чистою речовиною, яка характеризується хімічною інертністю. Розмір наночасточок діоксиду кремнію складав 5–40 нм [11].

Вермикуліт (Болгарія) відноситься до природних мінералів групи гідрослюд, що характеризується пошаровою структурою. Цей мінерал містить в певній кількості Al, Fe, Mg, O, Si та домішки Ca, Na, K [9].

Вермикуліт, що використовували в дослідках, спочатку 3 рази промивали водою. Потім висушували в сушильній шафі при 105 °С, подрібнювали в гомогенізаторі 2 рази протягом 5 хв., після чого подрібнений вермикуліт просіювали через сито з діаметром пор до 0,1 мм.

Одержані таким способом часточки вермикуліту були представлені пластинками, довжиною до 100 мкм і товщиною до 50 нм.

Для культивування *B. subtilis* використовували рідке живильне середовище Спізізена [15], а для *A. vinelandii* – Берка [8] з глюкозою (10 г/л). Бактерії вирощували в 750 мл колбах Ерленмейера, що містили по 100 мл живильного середовища, при 28 °С і перемішуванні (240 об/хв.) протягом 24 годин.

Вплив дисперсних матеріалів на дегідрогеназну активність визначали в режимі «гострих дослідів» для виключення відмінностей в чисельності клітин у контрольних та дослідних зразках за рахунок стимулювання росту бактерій цими матеріалами [1, 3, 12]. Для цього по 50 мл відповідної суспензії бактерій вносили у контрольні (без наночастинок) та дослідні колби (з певним наноматеріалами в концентрації 0,1–5,0 г/л) і культивували протягом 1 години за вищезазначених умов.

Перед визначенням дегідрогеназної активності бактерії осаджували на центрифугі ОПН-8 при 6600 г протягом 15 хв для *B. subtilis* і 25 хв – для *A. vinelandii*. Клітини ресуспендували в стерильному живильному середовищі, готували суспензії *B. subtilis* з оптичною густиною 0,5 од. і *A. vinelandii* – 1,85 од. Для цього використовували фотоколориметр КФК-2МП, довжини оптичного шляху 5 мм і $\lambda=540$ нм.

Метод визначення дегідрогеназної активності [7] мікроорганізмів, модифікований нами, заснований на відновленні дегідрогеназами безбарвної солі 2,3,5-трифенілтерразолію хлориду (ТТХ) в червону сполуку трифенілформаза (ТФФ) в анаеробних умовах із наступною екстракцією ТФФ етиловим спиртом. Отримані після 1-годинного культивування у вищезазначених умовах суспензії бактерій центрифугували, ресуспендували в 50 мл 0,07 М фосфатного буфера (рН 7,0). У пробірці Тунберга вносили по 1 мл 0,1 М розчину глюкози та 1 мл бактеріальної суспензії, у боковий відросток – 0,5 мл 1 % розчину ТТХ. Далі пробірки вакуумували, вміст бокового відростку переливали в головне відділення пробірки, після чого суміш інкубували у термостаті (28 °С) протягом 1 год. До вмісту пробірок Тунберга додавали 5 мл 96 % етанолу, енергійно струшували і залишали на 20 хв для екстракції формазазу. Отриману суміш центрифугували 15 хв при 6600 г, у супернатанті визначали оптичну густина (ОГ) у кюветках 10 мм, $\lambda=490$ нм за допомогою фотоколориметру КФК-2МП. Кількість ТФФ визначали за калібрувальною кривою (0–0,06 мг/мл ТФФ в етиловому спирті; $y = 19,283x + 0,0854$; $R^2 = 0,9508$). Дегідрогеназну активність виражали у мг ТФФ/ г сухої біомаси/ год.

Для визначення можливої сорбції ТФФ на часточках досліджуваних матеріалів готували розчин цієї сполуки (2 г/л) в етиловому спирті і змішували його з фосфатним буфером у співвідношенні 2:1. Визначали вихідну оптичну густина суміші. В пробірки вносили по 7,5 мл вказаної суміші й по 5 мг наноматеріалів. У контрольні пробірки наноматеріалу не вносили. Інкубували протягом 1 год при 28 °С, після чого визначали оптичну густина розчинів вищепоказаним способом.

Результати та їх обговорення. Досліджено можливість сорбції трифенілформазазу на часточках наноматеріалів. Показано, що після інкубації реакційної суміші у термостаті показник оптичної густини у контрольних та у дослідних пробах коливався у межах похибки (табл. 1). Тому можливу незначну сорбцію ТФФ наноматеріалами у наших дослідженнях можна не враховувати.

Таблиця 1

Вплив наноматеріалів на оптичну густина розчину трифенілформазазу

№ п/п	Досліджуваний зразок	Оптична густина, одиниць
1	Контроль (без наночастинок)	0,478 ± 0,005
2	з вермикулітом	0,467 ± 0,005
3	з діоксидом кремнію	0,467 ± 0,006

Внаслідок проведених досліджень було встановлено, що внесення до живильного середовища *B. subtilis* вермикуліту в дозі 0,1 г/л не спричиняло стимулюючого впливу на дегідрогеназну активність бактерій. У той же час, їх культивування в середовищі з більш високими кількостями мінералу супроводжувалось підвищенням дегідрогеназної активності *B. subtilis*. Найбільший стимулюючий вплив спостерігали за внесення 0,5 г/л цього мінералу. В даному

випадку показник дегідрогеназної активності зростав порівняно з контролем на 34 % (рис. 1). Внесення до середовища 1,0–5,0 г/л вермикуліту викликало підвищення дегідрогеназної активності на 21–28 %.

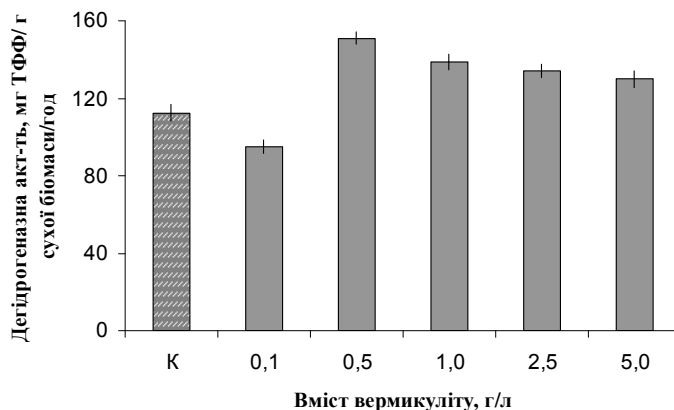


Рис. 1. Вплив вермикуліту на дегідрогеназну активність *Bacillus subtilis* IMB B-7023.

За внесення в середовище 0,1 г/л наночастинок діоксиду кремнію дегідрогеназна активність бацил залишалась майже на рівні контролю. При його вмісті 0,5–2,5 г/л дегідрогеназна активність підвищувалась на 6–7 % відносно контролю. Однак за більш високого вмісту діоксиду кремнію у середовищі (2,5–5,0 г/л) відбувалось поступове зниження дегідрогеназної активності (табл. 2).

Таблиця 2

Дегідрогеназна активність *Bacillus subtilis* та *Azotobacter vinelandii* в залежності від вмісту діоксиду кремнію в культуральному середовищі, мг ТФФ/мг сухої біомаси/ год

Вміст діоксиду кремнію, г/л	Дегідрогеназна активність, мг ТФФ/ г сухої біомаси/ год	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Контроль	112,7 ± 4,1	9,0 ± 0,3
0,1	114,8 ± 3,7	9,2 ± 0,1
0,5	119,8 ± 1,3	9,3 ± 0,2
1,0	120,6 ± 1,8	9,4 ± 0,1
2,5	119,6 ± 1,8	8,9 ± 0,1
5,0	103,7 ± 1,6	8,0 ± 0,1

Примітка: Контроль – бактерії без діоксиду кремнію

Внесення вермикуліту в культуральне середовище спричиняло суттєвий вплив на дегідрогеназну активність *A. vinelandii* (рис. 2). За їх культивування в середовищі, що містило 0,1–1,0 г/л вермикуліту, цей показник зростав відносно контролю на 7–11 %. Збільшення вмісту вермикуліту обумовлювало поступове підвищення дегідрогеназної активності. Найвищі її показники були отримані за внесення в середовище 5,0 г/л часточок мінералу. В цьому випадку дегідрогеназна активність була на 40 % вищою, ніж у контролі.

У той же час встановлено, що внесення в живильне середовище наночастинок діоксиду кремнію незначно впливало на дегідрогеназну активність азотобактера. Якщо за вмісту в середовищі 0,1–2,5 г/л цього наноматеріалу дегідрогеназна активність залишалась майже на рівні контролю, то за більш високих доз діоксиду кремнію в середовищі (5,0 г/л) спостерігалось незначне зниження цього показника (на 11 % порівняно з контролем) (табл. 2).

Позитивний вплив вермикуліту на загальну дегідрогеназну активність *B. subtilis* і *A. vinelandii* може бути обумовлений рядом факторів. З літературних даних відомо, що внесення дисперсних матеріалів у рідке живильне середовище бактерій може супроводжуватись підвищенням масопереносу кисню при перемішуванні цього середовища [2], а також контактною взаємодією наночастинок із поверхнею клітин, що здатна впливати на їх функціонування [2, 14].

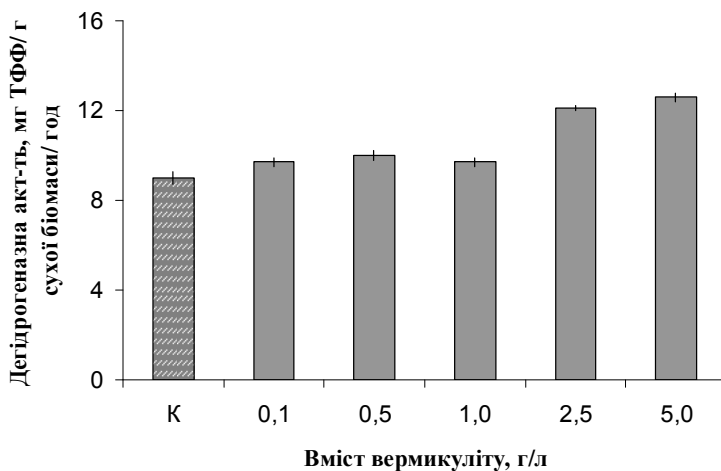


Рис. 2. Вплив вермикуліту на дегідрогеназну активність *Azotobacter vinelandii* IMB 7076

Слід зазначити, що за вмісту різних дисперсних матеріалів у середовищі культивування бактерій можуть відбуватись зміни його складу за рахунок вилузування з наночасточок певних мінеральних елементів [4, 10] та сорбції на твердих поверхнях компонентів середовища. Зважаючи на вміст у вермикуліті Mg^{2+} та Ca^{2+} можна припустити, що за рахунок виходу у поживне середовище цих катіонів і відбувається стимулювання загальної дегідрогеназної активності досліджуваних бактерій, бо як відомо ці катіони є активаторами дегідрогеназної активності [4]. У той же час діоксид кремнію є хімічно чистою речовиною, яка не містить мінеральних домішок і з нього мікроорганізми не можуть отримати додаткові елементи живлення. Ймовірно тому нами не було зафіксовано значного його стимулюючого впливу на загальну дегідрогеназну активність бактерій. Не виключена сорбція цими матеріалами також компонентів середовища. Тому механізми впливу наноматеріалів на фізіолого-біохімічну активність мікроорганізмів потребують подальшого дослідження.

Таким чином, внесення вермикуліту в середовище культивування *B. subtilis* чи *A. vinelandii*, як правило, супроводжувалось підвищенням дегідрогеназної активності бактерій. У той же час, культивування *B. subtilis* в середовищі, що містило 0,1–2,5 г/л діоксиду кремнію, супроводжувалось незначним підвищенням дегідрогеназної активності бактерій. За більш високого його вмісту в середовищі цей показник знижувався. Даний мінерал також не спричиняв позитивного впливу на дегідрогеназну активність *A. vinelandii*.

И.А. Герасименко, И.К. Курдиш

Институт микробиологии и вирусологии им Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ВЛИЯНИЕ ВЕРМИКУЛИТА И ДИОКСИДА КРЕМНИЯ НА ДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7023 И *AZOTOBACTER VINELANDII* IMB B-7076

Резюме

Обнаружено, что культивирование *Bacillus subtilis* и *Azotobacter vinelandii* в питательных средах, которые содержали 5,0 г/л вермикулита, привело к повышению дегидрогеназной активности бактерий до 34–40 % в сравнении с контролем. При внесении в культуральную среду 0,5 и 2,5 г/л диоксида кремния дегидрогеназная активность *B. subtilis* повышалась на 6–7 %. С повышением его содержания в среде до 5,0 г/л уровень дегидрогеназной активности снижался. На активность исследуемых ферментов *A. vinelandii* диоксид кремния не оказывал положительного влияния.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis* IMB B-7023, *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076, дегидрогеназная активность, вермикулит, диоксид кремния.

**INFLUENCE OF VERMICULITE AND SILICON DIOXIDE ON
DEHYDROGENASE ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* IMV B-7023 AND
AZOTOBACTER VINELANDII IMV B-7076**

Summary

Culturing of *Bacillus subtilis* and *Azotobacter vinelandii* in nutrient media containing 5.0 g/l of vermiculite resulted in increasing of dehydrogenase activity of bacteria to 34-40 % compared with control. When adding in nutrient media 0.5 and 2.5 g/l of silicon dioxide the dehydrogenase activity of *B. subtilis* increased by 6-7 %. With increasing of its content in the medium to 5.0 g/l the level of dehydrogenase activity decreased. Silicon dioxide did not affect positively dehydrogenase activity of *A. vinelandii*.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: *Bacillus subtilis* IMV B-7023, *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076, dehydrogenase activity, vermiculite, silicon dioxide.

The author's address: Gerasymenko I.O., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Инишева Л.И., Ивлева С.Н., Щербакова Т.А.* Руководство по определению ферментативной активности торфяных почв и торфов. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 2002. – 119 с.
2. *Курдиш И.К.* Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. – Киев: КВЦ, 2001. – 142 с.
3. *Курдиш И.К.* Взаємодія бактерій з твердими матеріалами: наукові проблеми і перспективи// Мікробіологічний журнал – 2008. – **70**, № 2–3. – С. 102–108.
4. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)/* Под ред. Прохоровой М.И. – Ленинград: изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
5. *Патент України № 54923 А.* Штам *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального препарату для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. / Опубл. 17.03.2003. Бюл. № 3.
6. *Патент України № 72856.* Штам *Azotobacter vinelandii* для одержання бактеріального препарату для рослинництва / Курдиш І.К., Бега З.Т. / Опубл. 15.08.2006. Бюл. № 8.
7. *Практикум по агрохимии /* Под ред. Академика РАСХН В.Г. Минеева. – Москва: Изд-во МГУ, 2001. – 689 с.
8. *Рубенчик Л.И.* Азотобактер и его применение в сельском хозяйстве. – Киев: Изд-во АН УССР, 1960. – 327с.
9. *Тарасевич Ю.И., Овчаренко Ф.Д.* Адсорбция на глинистых минералах. – Киев: Наук. думка, 1975. – 352 с.
10. *Улахович Н.А., Медянцева Э.П., Бабкина С.С., Кутырева М.П., Гатаулина А.Р.* Металлы в живых организмах. – Казань: Казанский ун-т, 2012. – 102 с.
11. *Чуйко А.А., Горлов Ю.И., Лобанов В.В.* Строение и химия поверхности кремнезема. – Киев: Наук. думка, 2007. – 348 с.
12. *Lori Graham-Weiss, Mary Lynn-Bennett, Alan S. Paau.* Production of bacterial inoculants by direct fermentation on nutrient-supplemented vermiculite // *Appl. and Environ. Microbiology.* 1987. – **53**, N 9. – P. 2138–2141.
13. *Nweke C.O., Alisi C.S., Okolo J.S., Nwanyanwu C.E.* Toxicity of zinc to heterotrophic bacteria from a tropical river sediment // *Appl. Ecol. and Environ. Research.* – 2008. – **5**, № 1. – P. 123–132.
14. *Fletcher M.* Effect of solid surfaces on the activity of attached bacteria // *Bacterial adhesion.* – 1985. – P. 419–435.
15. *Spizizen J.* Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1958. – **44.** – P. 1072 – 1078.

Отримано 15.01.2014