

**І.Л. Гармашева¹, Н.К. Коваленко¹, В.С. Підгорський¹, О.П. Лівінська¹,
С.І. Войчук¹, Л.Т. Олещенко¹, Т.В. Томила², Т.Ф. Лобунець²**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

²Інститут проблем матеріалознавства ім. М.І. Францевича НАН України,
вул. Кржижановського, 3, Київ, 03680, Україна

ВЗАЄМОДІЯ КЛІТИН ШТАМУ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 337Д УКМ В-2627 З ГЛИНИСТИМИ МІНЕРАЛАМИ *IN VITRO*

Мета. Охарактеризувати взаємодію клітин штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627, що володіє пробіотичними властивостями, з каолінітом й монтморилонітом. **Методи.** Використано методи інфрачервоної спектроскопії, трансмісійної електронної мікроскопії, адсорбційно-структурний статичний об'ємний метод, мікробіологічні та статистичні методи. **Результати.** При взаємодії клітин штаму *L. plantarum* 337Д з частинками глинистих мінералів характеристики пористого простору останніх практично не змінювались у порівнянні з вихідними зразками, розподіл пор за розмірами ставав ширшим за рахунок появи пор великого діаметру, зменшувалась питома поверхня, але сорбційна ємність та шарова будова глинистих мінералів зберігалась. Вперше встановлено вплив каолініту і монтморилоніту на ріст штаму *L. plantarum* 337Д *in vitro*. Найбільший стимулювальний вплив глинистих мінералів спостерігали на другій годині культивування. Питома швидкість росту штаму *L. plantarum* 337Д була у 5,2 рази більшою при культивуванні в середовищі MRS з 4 % каолініту та у 6 разів більшою – в середовищі MRS з 1 % монтморилоніту в порівнянні з контролем. Наявність у середовищі каолініту чи монтморилоніту уповільнювала процес зниження рН при культивуванні штаму *L. plantarum* 337Д порівняно з контролем. За наявності монтморилоніту рН середовища знижувався повільніше, ніж у присутності каолініту. Різниця між значенням рН середовища з 4 % каолініту на початку культивування і через дві години (Δ рН) була в 10 разів меншою в порівнянні з контролем. У той же час рН середовищ з 1 % і 4 % монтморилоніту починав знижуватись через 4 години культивування. **Висновки.** Різний вплив на ріст штаму *L. plantarum* 337Д обумовлений відмінностями фізико-хімічних характеристик каолініту і монтморилоніту, використаних у роботі.

К л ю ч о в і с л о в а: молочнокислі бактерії, алюмосилікати, каолінит, монтморилоніт.

Взаємодія мікроорганізмів і глинистих мінералів здавна привертає увагу багатьох дослідників. Оскільки глинисті мінерали входять до складу ґрунтів і відіграють важливу роль як у функціонуванні, так і в розповсюдженні мікробіоти ґрунтів, найбільша кількість робіт присвячена вивченню їх взаємодії з ґрунтовими бактеріями. Було показано, що глинисті мінерали стимулюють ростову активність штамів *Bradyrhizobium japonicum* [7] і *Azotobacter vinelandii* [9]. Каолінит і монтморилоніт стимулюють процес дихання бактерій видів *Agrobacterium radiobacte*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas striata*, *P. aeruginosa*, крім того вони можуть бути джерелом

мінералів [21]. Відмічено, що алюмосилікати можуть відрізнятися за дією на різні штами *B. japonicum* [7]. Сили, що беруть участь в адсорбції бактерій на мінералах, виникають внаслідок електростатичних (кулонівських) сил [16, 19].

Алюмосилікатні глини здавна використовуються як ентеросорбенти в медицині та ветеринарії. Найбільш відомі комерційні препарати «Каопектат» і «Смекта», що містять у своєму складі каолінит і смектит відповідно, є ефективними антидіарейними засобами [14]. У тваринництві алюмосилікати застосовуються як харчові добавки до кормів для попередження мікотоксикозів у свійських тварин та птиці [18, 23]. Позитивний вплив глинистих мінералів на макроорганізм пов'язаний, у першу чергу, з їх сорбційними властивостями. Показано, що вживання монтморилоніту попереджало гіпертироїдизм у лабораторних тварин [10]; монтморилоніт адсорбує креатинін і посилює його екскрецію з кишечника [26]. Каолінит та інші алюмосилікати ефективно зв'язують ендотоксини при кишкових захворюваннях [13].

Разом з цим, приділяється мало уваги впливу глинистих мінералів на кишкову мікробіоту. Було показано, що додавання глин у корм може впливати на склад мікрофлори кишечника свійських тварин. Так, додавання монтморилоніту значно знижувало кількість *E. coli* і клостридій у кишечнику поросят [24, 25]. У той же час дані щодо впливу глинистих мінералів на представників нормальної мікробіоти обмежені і дещо суперечливі. Повідомлялось як про підвищення кількості біфідобактерій і лактобацил [26], так і про зниження кількості лактобацил [17] при вживанні з кормом глинистих мінералів, а також про відсутність впливу монтморилоніту на кількість представників *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae* і *Salmonella* у кишечнику поросят [22].

Отже, не дивлячись на кількість накопичених експериментальних даних щодо взаємодії бактерій і мінералів, фундаментальні механізми, що задіяні у цьому процесі, все ще не вивчені. У доступній літературі нами не знайдено наукових робіт, присвячених вивченню взаємодії частинок глинистих мінералів з клітинами молочнокислих бактерій (МКБ). Зважаючи на широко розповсюджене вживання глинистих мінералів як харчових добавок, вкрай важливим є дослідження їх впливу на представників нормальної мікрофлори кишечника, зокрема на молочнокислі бактерії. Також цікавим є питання взаємодії глинистих мінералів з пробіотичними штамми МКБ, оскільки пробіотики, так само як і глинисті мінерали, застосовуються при різноманітних розладах шлунково-кишкового тракту.

Метою роботи було дослідження взаємодії клітин штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627, який виявляє широкий спектр біологічної активності і має пробіотичні властивості, з частинками каолініту і монтморилоніту.

Матеріали і методи. У роботі використано штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 Української колекції культур мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (УКМ). Цей штаму було виділено з шлунково-кишкового тракту людей-довгожителів у 1978–1981 роках під час міжнародної геронтологічної експедиції до високогірних селищ Абхазії – регіону з високим рівнем довголіття [4]; показана його висока біологічна активність [5].

Взаємодію бактерій з глинистими мінералами вивчали з використанням порошків каолініту (Кремневіт™, ЗАТ «АРТ-ПРОМБУД») і монтморилоніту. Бактерії вирощували на рідкому середовищі MRS [11] при температурі 37 °С протягом 24 годин. Клітини осаджували центрифугуванням при 5000 об/хв протягом 15 хв. Осад бактеріальних клітин двічі промивали дистильованою водою шляхом центрифугування при 5000 об/хв протягом 15 хв. Готували бактеріальну суспензію концентрацією 1×10^9 КУО/мл і додавали до неї порошки каолініту чи монтморилоніту із розрахунку 20 мг/мл. Отримані суспензії центрифугували при 1000 об/хв протягом 15 хв, надосадкову рідину видаляли, осад висушували під вакуумом при 70 °С.

Фазовий склад зразків глинистих мінералів досліджували методом рентгенівського фазового аналізу (РФА) за допомогою дифрактометра ДРОН-3. Розшифровку спектрів здійснювали за допомогою бібліотеки JCPDS-ICDD.

Вивчення гранулометричного складу проводили на лазерному гранулометрі «Наносайзер HS1000» з використанням 0,2 % дисперсій глинистих мінералів.

Дослідження пористої структури зразків проводили адсорбційно-структурним статичним об'ємним методом на приладі ASAP 2000M. Діапазон вимірювання даного методу знаходиться в інтервалі еквівалентних розмірів пор від 0,3 до 300 нм. Отримані ізотерми сорбції азоту на досліджених зразках розраховували згідно теорій BET (Brunauer S., Emmett P.H., Teller E.), VJH (Barrett E.P., Joyner L.S., Halenda P.P.) [2].

ІЧ-спектроскопічні дослідження проводили на Фур'є-спектрометрі ФСМ-1201 в області частот 4000–400 см^{-1} .

Електронно-мікроскопічні дослідження проводили на електронному мікроскопі JEOL JEM 1400 (Японія) при напрузі 80 кВ.

Вплив порошків каолініту і монтморилоніту на ріст та кислотоутворення штаму *L. plantarum* 337Д досліджували в середовищах MRS з вмістом глинистих мінералів 1 %, 2 % і 4 %. Як контроль, використовували середовище MRS. Початкова концентрація бактеріальних клітин складала $3,0 \pm 0,5 \times 10^7$ КУО/мл. Інкубацію проводили в термостаті при 37 °С. Кожні 2 години відбирали проби для вимірювання рН і визначення кількості клітин. Питому швидкість росту визначали за формулою:

$$\mu = \frac{2,3(\lg x_2 - \lg x_1)}{t_2 - t_1}$$

де x_2 і x_1 – концентрації клітин мікроорганізмів в години t_2 і t_1 , 2,3 – коефіцієнт переходу від натуральних логарифмів до десяткових [3].

Статистичну обробку даних проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми «Statistika 7.0» (Stat Soft, Inc. США). Досліди проводили у трьох повторностях.

Результати. *Фізико-хімічні характеристики зразків глинистих матеріалів:*

За даними хімічного й спектрального аналізів основними елементами октаедрично-тетраедричної шарової структури каоліну є Si (20,7 %) і Al (18,95 %), а монтморилоніту – Al (59,0 %), Si (18,0 %), Fe (17 %). У зразках також присутні домішки інших елементів, таких як Mg, Ca, Ti, Mn.

Аналіз дифракційних картин глинистих матеріалів виявив наявність двох кристалічних фаз у кожному з них. Зокрема, в каоліні присутні кристалічні структури типу диккіт і галуазит, у порошку монтморилоніту – монтморилоніт і гетит.

Гранулометричний склад використаних глинистих мінералів наведено у таблиці 1. Більшість частинок каолініту мають розміри від 300 до 800 нм, тоді як монтморилоніт характеризується меншим розміром часток, що в основному не перевищував 500 нм.

Таблиця 1

Гранулометричний склад порошків глинистих мінералів

Зразок	Вміст частинок (%) різного розміру, нм					
	<100	100–300	300–500	500–800	800–1000	>1000
каолініт	0	2,1	45,9	34,1	17,8	0
монтморилоніт	0	29,2	58,6	12,2	0	0

Отримані ізотерми адсорбції азоту на досліджених об'єктах, наведені на рисунку 1, відносяться до IV типу ізотерм [2], а по типу петель гістерезису, згідно класифікації IUPAC – до типу НЗ (рис. 1) [15]. Кожен тип петлі гістерезису ізотерм низькотемпературної адсорбції азоту пов'язаний з певною будовою пористої структури. Тип петель гістерезису НЗ пов'язаний з будовою адсорбентів, які мають щілинні пори, або складаються з пласкопаралельних частинок. Таким чином, об'єкти досліджень являють собою мезопористі шаруваті структури з переважно щілинною моделлю пор. Гістерезис високого тиску свідчить про крупнопористу структуру зразків. Розрахунки отриманих ізотерм адсорбції азоту на досліджених зразках показали, що для каолініту значення питомої поверхні мезопор сягає 23,2 м²/г, а середній їх розмір – 9,4 нм. Досліджений порошок монтморилоніту має питому поверхню 94,8 м²/г, майже 50 % об'єму та поверхні мезопор належить порам вузького діапазону 3,6–4,1 нм (рис. 2). Слід зазначити, що монтморилоніт, завдяки такій поровій будові, здатний до набухання.

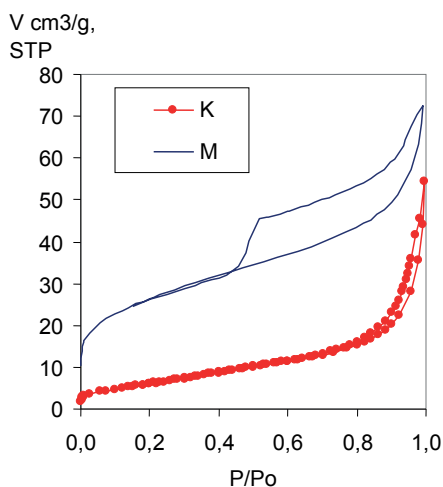


Рис. 1. Ізотерми сорбції азоту на зразках глинистих мінералів каолініт (К) та монтморилоніт (М)

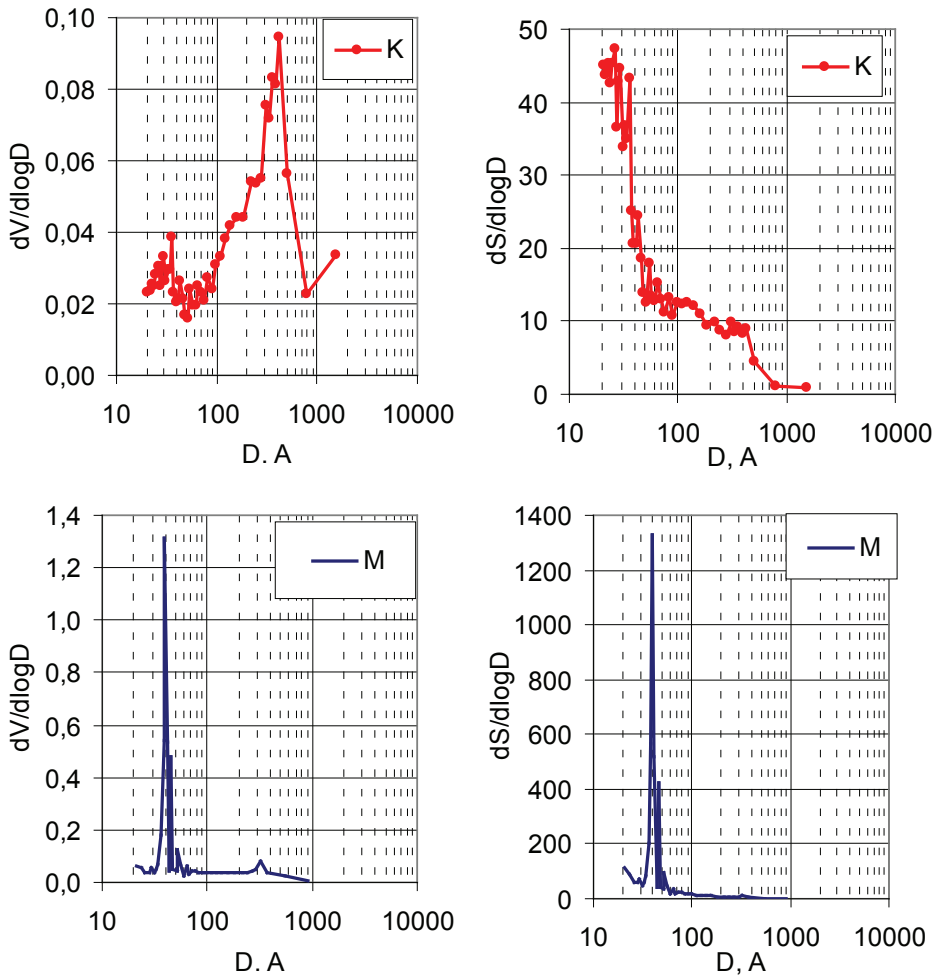


Рис. 2. Диференційні розподілення об'ємів та поверхні пор за розмірами у каолініті (K) та монтморилоніті (M)

ІЧ-спектри зразків використаних у роботі глинистих матеріалів наведені на рисунках 3 і 4. У досліджуваному діапазоні частот $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ виявляються смуги поглинання, характерні для валентних та деформаційних коливань зв'язків: Si – O, S – O – Al, OH, H – O – Al [8]. Шаруваті силікати виявляють одну інтенсивну смугу в області $\nu \sim 1003\text{ см}^{-1}$ і слабкіші смуги в області $\nu \sim 1050\text{ см}^{-1}$ і 925 см^{-1} . Спектр двошарового каолініту відрізняється від тришарового монтморилоніту зсувом смуги поглинання в області $\nu \sim 1003\text{ см}^{-1}$ у довгохвильову сторону. Виражена широка смуга при $\nu \sim 1003\text{ см}^{-1}$ відповідає валентним коливанням Si-O-Si тетраедрів кремнекисневого каркасу, а смуги в інтервалі частот $\nu \sim 600\text{--}460\text{ см}^{-1}$ – деформаційним коливанням зв'язків Me–O. Інтенсивна смуга в інтервалі $\nu \sim 3700\text{--}3100$ і смуга 1638 см^{-1} відносяться до валентних і деформаційних коливань OH-груп вільних та зв'язаних молекул води. Аналіз форми смуг ІЧ-поглинання показав, що для монтморилоніту характерні розширені смуги поглинання в діапазоні частот $\nu \sim 950\text{--}1200\text{ см}^{-1}$ і зникнення тонкої структури смуг, котра є характерною для каолініту. Становить інтерес відмінність у поглинанні досліджених мінералів в області $\nu \sim 3690\text{--}3560\text{ см}^{-1}$ (рис. 3, 4Б). Каолініт виявляє дві OH–

смути, які відрізняються по інтенсивності. Поглинання близько 3690 см^{-1} (високочастотна смуга) позначають (А), а близько 3560 см^{-1} (низькочастотна смуга) — (В). Аналіз співвідношення А/В для каолініту і монтморилоніту показав, що воно різне ($A/B = 1,57$ для каолініту, $A/B = 0,52$ для монтморилоніту). Це може бути пов'язано з різною кількістю гідроксильних груп у кристалічній структурі цих мінералів. У монтморилоніту верхній киснево-гідроксильний шар є лише на 1/3 гідроксильним і на 2/3 – кисневим. Більшість гідроксильних груп зосереджено в міжшаровому просторі. Тому і міжшарова відстань для монтморилоніту більша, ніж для каолініту. За рахунок слабого зв'язку між пакетами, мінерал відрізняється високою ємністю катіонного обміну.

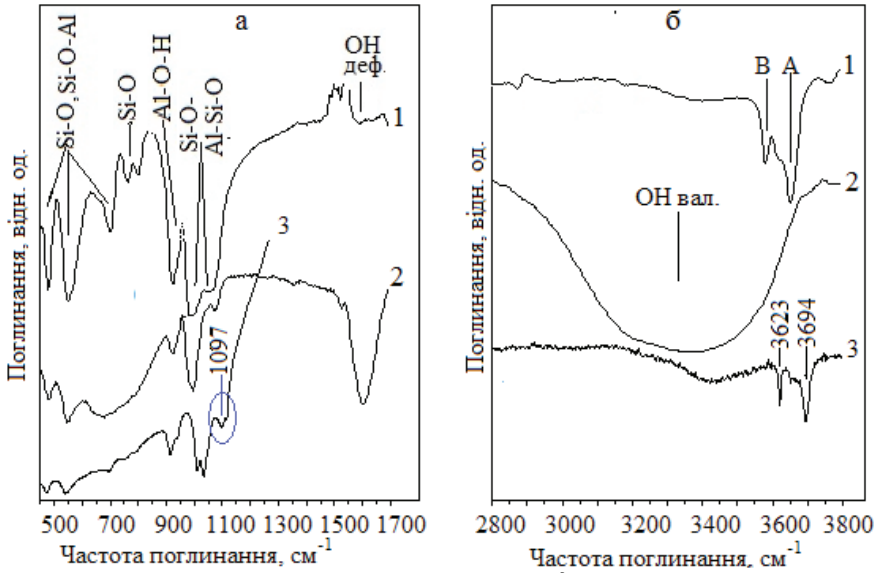


Рис. 3. Інфрачервоні спектри зразків каолініту і композиту на його основі
1 – каолініт; 2 – суспензія каолініту в дистильованій воді; 3 – суспензія каолініту і клітин штаму *L. plantarum* 337Д

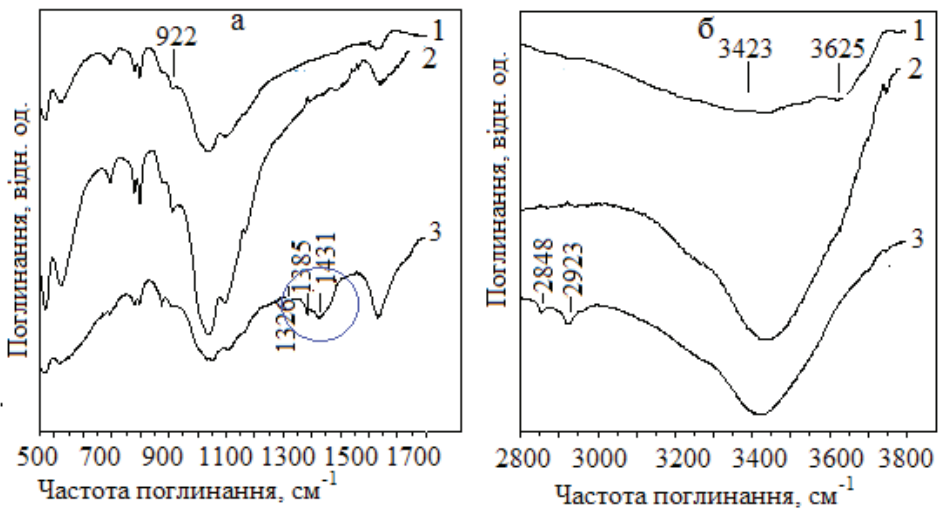


Рис. 4. ІЧ-спектри монтморилоніту і композиту на його основі
1 – монтморилоніт (вихідний зразок); 2 – монтморилоніт (після подрібнення);
3 – суспензія монтморилоніту і клітин штаму *L. plantarum* 337Д

При приготуванні суспензії порошку каолініту в дистильованій воді спостерігається зміна вигляду ІЧ-спектру. В області коливань валентних гідроксильних груп відбувається злиття трьох смуг поглинання компонент ($\nu \sim 3690, 3560, 3423 \text{ см}^{-1}$) в одну широку інтенсивну смугу з частотою $\nu \sim 3374 \text{ см}^{-1}$ (характерну для валентних коливань ОН-груп молекул води), а смуга деформаційних ОН-коливань з частотою $\nu \sim 1638 \text{ см}^{-1}$ посилюється по інтенсивності. В ІЧ-спектрі водної суспензії спостерігаються також зміни в інтервалі $\nu \sim 900\text{--}1200 \text{ см}^{-1}$, що зводяться до розширення і злиття властивих йому смуг, з набуванням контурів, характерних для аморфної фази (рис. 4А).

Для ІЧ-спектрів поглинання суспензії частинок каолініту і бактеріальних клітин спостерігається зменшення інтенсивності усіх смуг поглинання і з'являється нова смуга з частотою $\nu \sim 1094 \text{ см}^{-1}$. Такі зміни можна пов'язати з процесом взаємодії клітин *L. plantarum* 337Д з поверхнею каолініту і утворенням композиту на його основі.

Для зразку, після подрібнення монтморилоніту, на ІЧ-спектрі спостерігається посилення всіх смуг поглинання, а також утворення інтенсивної і широкої смуги поглинання в області $\nu \sim 3700\text{--}3100 \text{ см}^{-1}$. Такі зміни вказують на зростання дрібної фракції дисперсного складу порошку в порівнянні з вихідним зразком. Ці дані підтверджують результати гранулометричного аналізу.

На ІЧ-спектрі монтморилоніту з молочнокислими бактеріями виду *L. plantarum* 337Д з'являються нові смуги в діапазоні частот $\nu \sim 1500\text{--}1300 \text{ см}^{-1}$, що відповідають ряду хімічних зв'язків, які описують органічну складову нанокompозиту (С–О, –СООН, С–Н, N–H) (рис. 4А). В діапазоні частот $\nu \sim 2960\text{--}2800 \text{ см}^{-1}$ з'являються слабкі смуги поглинання, що характеризують коливання валентних С–Н зв'язків. Крім того, спостерігається зменшення інтенсивності всіх смуг поглинання в діапазоні частот $\nu \sim 1300\text{--}450 \text{ см}^{-1}$ і ріст інтенсивності смуг, що відносяться до валентних та деформаційних ОН коливань у монтморилоніті в порівнянні з вихідним зразком. Інтенсивність смуги поглинання з частотою $\nu \sim 922 \text{ см}^{-1}$ зменшується. Такі зміни свідчать про взаємодію монтморилоніту з клітинами штаму *L. plantarum* 337Д і утворення композиту на його основі. На відміну від каолініту, в монтморилоніті взаємодія з молочнокислими бактеріями відбувається за рахунок А1–ОН–О зв'язків, де О – кисень сусіднього шару, і завдяки слабкому зв'язку між шарами мінерал має високу ємність катіонного обміну.

За результатами електронно-мікроскопічних досліджень, до складу порошків входять частинки у вигляді пластинок різного розміру. Крім того, у зразку каолініту спостерігаються трубки галуазиту довжиною до 2–3 мкм, що підтверджує дані гранулометричного аналізу та ІЧ-спектроскопії.

Взаємодія клітин молочнокислих бактерій з частинками глинистих мінералів.

Взаємодію між частинками глинистих матеріалів і бактеріальними клітинами вивчали у водних суспензіях. Дослідження композитів з бактеріальних клітин і наночастинок глинистих матеріалів показало, що взаємодія між бактеріями та частинками відбувається за рахунок поверхневих шарів клітинних стінок бактерій, а саме капсульного шару, який має полісахаридну природу (рис. 5). За результатами ТЕМ, трубки галуазиту

мають більшу спорідненість до бактеріальної поверхні у порівнянні з пластинками.

У комплексі глина/бактеріальна клітина зберігається сорбційна ємність та шарова будова глинистих мінералів. При взаємодії клітин штаму *L. plantarum* 337Д з частинками глинистих мінералів характеристики пористого простору практично не змінюються у порівнянні з характеристиками вихідних зразків, розподіл пор за розмірами стає ширшим за рахунок появи пор великого діаметру, зменшується питома поверхня.

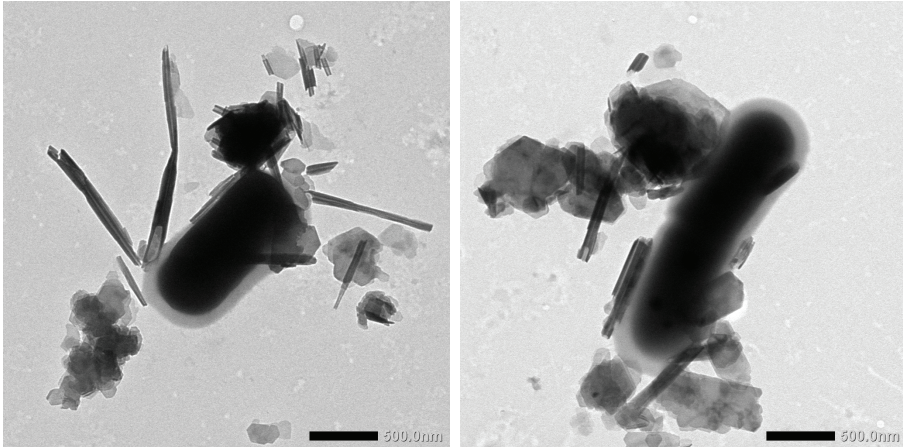


Рис. 5. Взаємодія клітин штаму *L. plantarum* 337Д з частинками каолініту

Вплив глинистих мінералів на ріст штаму L. plantarum 337Д.

Додавання каолініту в культуральне середовище стимулювало ріст штаму *L. plantarum* 337Д, у залежності від концентрації (рис. 6А). Максимальна питома швидкість росту в контрольному середовищі і в середовищі з 1 % каолініту досягалась на 6 годині культивування, тоді як у середовищах з 2 % і 4 % – на 4 годині культивування. Найбільший стимулювальний вплив спостерігали при внесенні 4 % каолініту. Так, уже на другу годину культивування питома швидкість росту була більшою у 5,2 рази порівняно з контролем. При внесенні 1 % і 2 % каолініту стимулювальний вплив починався на четвертій годині культивування, питома швидкість росту збільшувалась у 2,9 і 4,8 рази в порівнянні з контролем відповідно. На шосту годину культивування питома швидкість росту в середовищі з 1 % каолініту не відрізнялась від контрольного середовища; в середовищі з 4 % каолініту стимулювальний вплив зберігався, але в середовищі з 2 % каолініту питома швидкість росту дещо знижувалась (у 1,15 рази порівняно з контролем). Після 8 годин культивування питома швидкість росту штаму *L. plantarum* 337Д у середовищах з 1 % і 2 % каолініту не відрізнялась від контролю. У той же час після 8 і 10 годин культивування в середовищі з 4 % каолініту питома швидкість росту була вищою в порівнянні з контролем, у 1,12 і 1,18 рази відповідно.

При вирощуванні штаму *L. plantarum* 337Д в середовищі з монтморилонітом (рис. 6Б) вже на другу годину культивування спостерігали підвищення питомої швидкості росту в порівнянні з контролем у 6,0, 3,6 і 2,3 рази при концентраціях 1 %, 2 % і 4 % відповідно. На четверту годину культивування стимулювальний вплив

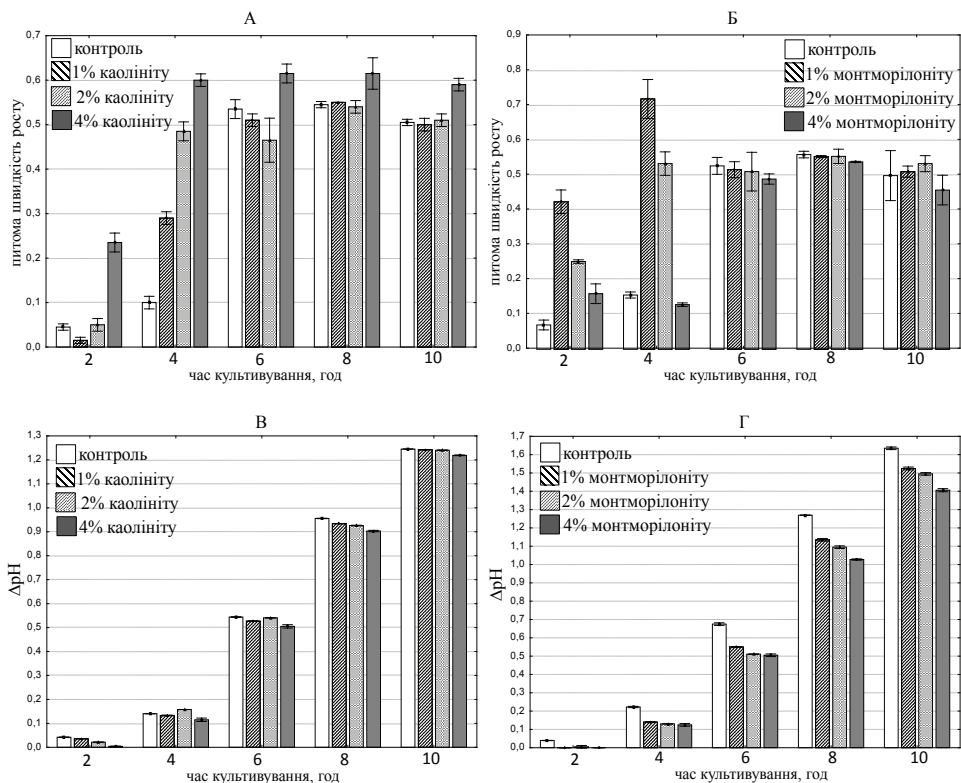


Рис. 6. Вплив каолініту і монтморилоніту на швидкість росту і кислотоутворення штаму *L. plantarum* 337Д *in vitro*

1 % і 2 % монтморилоніту в середовищі зберігався, питома швидкість росту в порівнянні з контролем була більшою в 4,6 і 3,4 рази відповідно. У той же час, питома швидкість росту в середовищі з 4 % монтморилоніту була в 1,21 рази меншою в порівнянні з контролем. Після 6 години культивування питома швидкість росту штаму *L. plantarum* 337Д в контрольному середовищі і в середовищах з монтморилонітом не відрізнялась.

Ріст молочнокислих бактерій супроводжується зниженням рН середовища внаслідок утворення молочної кислоти як кінцевого продукту розщеплення вуглеводів. Досліджено динаміку зниження рН середовищ з різним вмістом каолініту чи монтморилоніту і порівняно її зі зниженням рН у контрольному середовищі. За наявності каолініту процес закислення середовища відбувався повільніше порівняно з контролем (рис. 6В). Різниця між значенням рН середовища на початку культивування і через 2 години (ΔpH) була меншою в порівнянні з контролем на 14,3 %, 50 % і 90,5 % у середовищах з 1 %, 2 % і 4 % каолініту відповідно. Через 4 години культивування показник ΔpH середовищ з 1 % і 4 % каолініту був меншим на 5 % і 17,8 % відповідно в порівнянні з ΔpH контрольного середовища. У той же час у середовищі з 2 % каолініту спостерігали збільшення значення ΔpH на 12 % в порівнянні з контролем. Через 6 годин культивування ΔpH в середовищах з 1 % і 4 % каолініту зменшилась на 3 % і 7,2 % відповідно, а ΔpH у середовищі з 2 % каолініту не відрізнялась від контрольного. Через 8 годин ΔpH у середовищах з 1 %, 2 % і 4 % була меншою на 2,2 %, 3 % і 5,5 % відповідно. На 10 годину культивування

тільки за наявності 4 % каолініту кислотність середовища була дещо нижчою в порівнянні з контрольним, ΔpH була меншою лише на 2 %.

Протягом 2 годин культивування штаму *L. plantarum* 337Д рН середовища з 1 % і 4 % монтморилоніту не змінювався (рис. 6Г) порівняно з початковим значенням ($\Delta\text{pH}=0$). В той же час, у контрольному середовищі і в середовищі з 2 % монтморилоніту рН знижувався, причому в середовищі з 2 % монтморилоніту ΔpH була меншою на 87 % у порівнянні з контрольним середовищем. Через 4 години культивування ΔpH у середовищах з 1 %, 2 % і 4 % монтморилоніту була меншою на 37 %, 41,4 % і 43,7 % відповідно порівняно з контрольним середовищем. При подальшому культивуванні у середовищах з 1–4 % монтморилоніту ΔpH через 6, 8 і 10 годин була меншою в порівнянні з контрольним на 18,5–25,8 %, 10,5–49,7 % і 6,7–14,0 % відповідно.

Обговорення. Порівнювати отримані нами дані з даними інших авторів на жаль складно, оскільки було показано, що взаємодія мікроорганізмів і частинок глинистих мінералів залежить від поверхневих властивостей бактеріальних клітин, їх фізіологічного стану чи розмірів [12]. Однак, отримані нами результати підтверджуються даними інших авторів. Показано, що найбільш важливу роль в адсорбції *Pseudomonas putida* на гетиті, каолініті і монтморилоніті відіграють електростатичні сили [16]. Клітини *P. putida* краще адсорбувались на каолініті в порівнянні з монтморилонітом. Було продемонстровано участь молекул води у процесі сорбції бактерій *P. putida* на глинистих мінералах каолініті й монтморилоніті [19]. Нами встановлено, що інтенсивність усіх смуг ІЧ поглинання, як для суспензії каолініту і клітин штаму *L. plantarum* 337Д, так і суспензії монтморилоніту і клітин штаму *L. plantarum* 337Д зменшується у порівнянні з вихідними зразками за рахунок адсорбції на поверхні органічних складових.

Додавання глинистих мінералів у середовище MRS прискорювало ріст штаму *L. plantarum* 337Д і уповільнювало процес зниження рН середовища в порівнянні з контролем. Стимулювальний вплив на ріст штаму *L. plantarum* 337Д 4 % каолініту у середовищі спостерігали вже через дві години культивування й щонайменше після 10 годин культивування. Стимулювальний вплив 1–2 % каолініту спостерігали лише на четвертій годині культивування. Таким чином, максимальний стимулювальний вплив монтморилоніту проявлявся після двох годин культивування і тривав до шостої години. Слід відзначити незначний пригнічувальний вплив глинистих мінералів на ріст штаму *L. plantarum* 337Д. Питома швидкість росту після 6 годин культивування в середовищі з 2 % каолініту була меншою в 1,15 рази порівняно з контролем. При цьому 4 % монтморилоніту в середовищі дещо уповільнювали (в 1,21 рази) ріст штаму *L. plantarum* 337Д на четвертій годині культивування. Стимулювальна дія глинистих мінералів на ростову та фізіологічну активності представників мікробіоти ґрунту була встановлена в ряді досліджень [6, 7, 9].

Авторами [20] зроблено припущення, що іонообмінні властивості глинистих мінералів можуть змінювати характеристики середовища кишечнику, такі як рН чи ступінь окислення, і таким чином впливати на ріст бактерій мікробіоти кишечнику. Показано, що частинки глинистих мінералів стимулюють процес дихання бактерій, в основному за рахунок

підтримки рН середовища, найбільш сприятливого для їх активного росту [21].

Отже, встановлено, що різний вплив на ріст штаму *L. plantarum* 337Д може бути обумовлений відмінностями фізико-хімічних характеристик каолініту і монтморилоніту, використаних у роботі. Для каолініту значення питомої поверхні мезопор сягає 23,2 м²/г, а середній їх розмір – 9,4 нм. Монтморилоніт має мезопористу нежорстку шарувату структуру з переважно щільною будовою пор та високими значеннями питомої поверхні та об'єму мезопор. Значення питомої поверхні мезопор сягає 94,8 м²/г. Майже 50 % об'єму та поверхні мезопор належить порам вузького діапазону 3,6–4,1 нм (при загальному об'ємі мезопор 0,11 см³/г), які забезпечують високий потенціал взаємодії з адсорбованими молекулами водного середовища та продуктів метаболізму штаму *L. plantarum* 337Д, зокрема молочної кислоти. Слід зазначити, що процес адсорбції на монтморилоніті супроводжується набуханням не тільки за рахунок його молекулярної будови, але й за рахунок його супрамолекулярної будови — пор вузького діапазону 3,6–4,1 нм.

Дослідження взаємодії клітин бактерій з глинистими мінералами має важливе практичне значення. Авторами [1] було встановлено, що адсорбційні взаємодії між клітинами бактерій і глинистим мінералом палигорскітом підвищують виживання бактерій при їх зневодненні при висушуванні, а також ефективність седиментаційного відділення біомаси від культуральної рідини, що може бути корисним при отриманні сухих бактеріальних препаратів. Одержані в роботі результати дослідження впливу частинок каолініту і монтморилоніту на культури молочнокислих бактерій можуть бути застосовані у медичній та фармацевтичній промисловості для створення нових препаратів, а також для розробки нових біологічних добавок для підвищення продуктивності птахівництва і тваринництва. Отже, отримані нами дані мають важливе практичне значення і є підставою для подальшого, більш поглибленого вивчення впливу частинок глинистих мінералів на фізіолого-біохімічну активність молочнокислих бактерій.

**И.Л. Гармашева¹, Н.К. Коваленко¹, В.С. Подгорский¹, Е.П. Ливинская¹,
С.И. Войчук¹, Л.Т. Олещенко¹, Т.В. Томила², Т.Ф. Лобунец²**

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

²Институт проблем материаловедения им. М.И. Францевича НАН Украины,
ул. Кржижановского, 3, Киев, 03680, Украина

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК ШТАММА *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 337Д УКМ В-2627 С ГЛИНИСТЫМИ МИНЕРАЛАМИ *IN VITRO*

Резюме

Цель. Охарактеризовать взаимодействие клеток штамма *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627, который обладает пробиотическими свойствами, с каолинитом и монтмориллонитом. **Методы.** Используются методы инфракрасной спектроскопии, трансмиссионной электронной микроскопии, адсорбционно-структурный статичный объемный метод, микробиологические и статистические методы. **Результаты.** При

взаимодействии клеток штамма *L. plantarum* 337Д с частицами глинистых минералов характеристики пористого пространства последних практически не изменились в сравнении с исходными образцами, распределение пор по размерам стало более широким за счет появления пор большого диаметра, уменьшалась удельная поверхность, но сорбционная емкость и слоистое строение глинистых минералов сохранялось. Впервые установлено влияние каолинита и монтмориллонита на рост штамма *L. plantarum* 337Д *in vitro*. Наибольшее стимулирующее влияние глинистых минералов наблюдалось через два часа культивирования. Удельная скорость роста штамма *L. plantarum* 337Д была в 5,2 раза больше при культивировании в среде MRS с 4 % каолинита и в 6 раз больше – в среде MRS с 1 % монтмориллонита в сравнении с контролем. Наличие в среде каолинита или монтмориллонита замедляло процесс снижения pH при культивировании штамма *L. plantarum* 337Д в сравнении с контролем. При наличии монтмориллонита pH среды снижался медленнее, чем при наличии каолинита. Разница между значением pH среды с 4 % каолинита в начале культивирования и через два часа (Δ pH) была в 10 раз меньше в сравнении с контролем. В то же время pH среды с 1 % и 4 % монтмориллонита начинал снижаться через 4 часа культивирования. **Выводы.** Разное влияние на рост штамма *L. plantarum* 337Д обусловлено отличиями физико-химических характеристик каолинита и монтмориллонита, использованных в работе.

К л ю ч е в ы е с л о в а: молочнокислые бактерии, алюмосиликаты, каолинит, монтмориллонит.

**I.L. Garmasheva¹, N.K. Kovalenko¹, V.S. Pidgorskyi¹, O.P. Livins'ka¹,
S.I. Voychuk¹, L.T. Oleschenko¹, T.V. Tomila², T.F. Lobunets²**

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotnogo Str., Kyiv, 03143, Ukraine

²Frantsevich Institute for Problems in Materials Science NAS of Ukraine,
3 Krzhizhanovsky Str., Kyiv, 03680, Ukraine

INTERACTION OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 337D UKM B-2627 STRAIN CELLS WITH CLAY MINERALS *IN VITRO*

Summary

Objective. To characterize the interaction of *Lactobacillus plantarum* 337D UKM B-2627 strain, which has probiotic properties, with kaolinite and montmorillonite. **Methods.** The methods of infrared spectroscopy, transmission electron microscopy, the adsorption-structural static volumetric method, microbiological and statistical methods were used. **Results.** The characteristics of the porous space of clay mineral particles were practically did not change compared with initial samples during the interaction with *L. plantarum* 337D UKM B-2627 strain cells, pore size distribution had become wider due to the emergence of large diameter pores, reduced surface area, but the adsorption capacity and the layered structure of clay minerals preserved. For the first time the effect of kaolinite and montmorillonite on growth of *L. plantarum* 337D strain *in vitro* was studied. The greatest stimulating effect of clay minerals was observed within two hours of cultivation. The specific growth rate of *L. plantarum* 337D strain was in 5.2 times higher when cultured in MRS medium with 4 % of kaolinite and 6 times more – in MRS medium with 1 % montmorillonite versus control. The presence in the medium of kaolinite or

montmorillonite slowed the process of reducing pH during growth of the *L. plantarum* 337D strain, compared with the control. In the presence of montmorillonite pH decreased more slowly than in the presence of kaolinite. The difference between initial pH value of medium with 4 % kaolinite and after two h (Δ pH) was 10 times less in comparison with the control. At the same time, pH of the medium with 1 % or 4 % montmorillonite began to decrease after 4 hours of cultivation. **Conclusions.** Different effect on the growth of *L. plantarum* 337D strain due to differences of physical and chemical characteristics of kaolinite and montmorillonite used in the study.

Key words: lactic acid bacteria, aluminosilicates, kaolinite, montmorillonite.

1. Гордиенко А.С., Курдиш И.К., Краснобрижуй Н.Я. Влияние глинистого минерала палыгорскита на выживаемость бактерий при обезвоживании // Микробиол. журн. – 1990, Т. 52, № 5.– С. 75–78.
2. Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость. М.: Мир, 1984, 310 с.
3. Егоров Н.С. Промышленная микробиология. «Высшая школа».– Москва.–1989.– С. 688.
4. Квасников Е.И., Григоров Ю.Г., Коваленко Н. К. и др. Молочнокислые бактерии пищеварительного тракта и питание долгожителей Абхазии // Микроб. журн.– 1984.– Т. 46, № 3.– С. 11–18.
5. Коваленко Н.К., Немировская Л.Н., Касумова С.А. Бактериоциногенная и лизоцимстимулирующая активность молочнокислых бактерий // Микробиол. журн.– 1999, Т. 61, № 6.– С. 42–50.
6. Курдиш И.К., Кигель Н.Ф. Влияние высокодисперсных материалов на физиологическую активность метанотрофных бактерий // Микробиол. журн.– 1997, Т. 59, № 2.– С. 29–35.
7. Курдиш И.К., Мельникова Н.Н. Влияние глинистых минералов на рост и нодуляционную активность *Bradyrhizobium japonicum*// Микробиол. журн.– 2011.– Т. 73, № 4. – С. 36–40.
8. Подгорский В.С., Коваленко Н.К., Гармашева И.Л., Ливинская Е.П., Рагуля А.В., Томила Т.В., Лобунец Т.Ф. Нанокompозиты на основе глинистых материалов и биологически активных клеточных компонентов пробиотических штаммов молочнокислых бактерий, С. 446–450 // «Наноразмерные системы и наноматериалы: исследования в Украине». Главный редактор Наумовец А.Г. Киев: Академперіодика, 2014, 768 с.
9. Чоботарьов А.Ю., Гордієнко А.С., Курдиш І.К. Вплив природних мінералів на ріст *Azotobacter vinelandii* IMB В-7076 // Микроб. журн.– 2010.– Т. 72, № 5. – С. 27–31.
10. Cai Y, Meng X, Cao Y, Lu H, Zhu S, Zhou L. Montmorillonite ameliorates hyperthyroidism of rats and mice attributed to its adsorptive effect // Eur. J. Pharmacol. – 2006.– 551.– P. 156–161.
11. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. – 1960.– 23.– P. 130–135.
12. Gannon J.T., Manilal V.B., Alexander M. Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – 57.– P. 190–193.

13. Gardiner K.R., Anderson N.H., McCaigue M.D., Erwin P.J., Halliday M.I., Rowlands B.J. Adsorbents as antiendotoxin agents in experimental Colitis // Gut.– 1993.– 34.– P. 51–55.
14. Guarino A., Bisceglia M., Castellucci G. et al. Smectite in the treatment of acute diarrhea: a nationwide randomized controlled study of the Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) in collaboration with primary care pediatricians. SIGEP Study Group for Smectite in Acute Diarrhea // J Pediatr Gastroenterol Nutr.– 2001.– 32.– P. 71–75.
15. IUPAC Manual of Symbols and Terminology, Appendix 2, Pt. I, Colloid and Surface Chemistry. Pure Appl. Chem., 31 578 (1972).
16. Jiang D., Huang Q., Cai P., Rong X., Chena W. Adsorption of *Pseudomonas putida* on clay minerals and iron oxide // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.– 2007.– 54.– P. 217–221
17. Li J., Kim I.H. Effects of dietary supplementation of sericite on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles and fecal microflora shedding in growing pigs // Anim Feed Sci Technol. – 2013.–184.– P. 100–104.
18. Phillips T.D. Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxine-induced disease // Toxicol Sci.– 1999.– 52.– P. 118–126.
19. Rong X., Huang Q., He X., Chen H., Cai P., Liang W. Interaction of *Pseudomonas putida* with kaolinite and montmorillonite: A combination study by equilibrium adsorption, ITC, SEM and FTIR // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.– 2008.– 64.– P. 49–55
20. Song M., Liu Y., Soares J.A., Che T.M., Osuna O., Maddox C.W. et al. Dietary clays alleviate diarrhea of weaned pigs // J Anim Sci. 2012.–90.– P. 345–60.
21. Stotzky G., Rem L.T. Influence of clay minerals on microorganisms. Montmorillonite and kaolinite on bacteria // Can J Microbiol.– 1966.– 12.– P. 547–563.
22. Thacker P.A. Performance of growing-finishing pigs fed diets containing graded levels of biotite, an aluminosilicate clay // Asian-Aust J Anim Sci.– 2003.–16.– P. 1666–1672.
23. Wang J.P., Chi F., Kim I.H. Effects of montmorillonite clay on growth performance, nutrient digestibility, vulva size, faecal microflora, and oxidative stress in weaning gilts challenged with zearalenone // Anim Feed Sci Technol.– 2012.–178.– P. 158–166.
24. Xia M.S., Hu C.H., Xu Z.R., Ye Y., Zhou Y.H., Xiong L. Effects of copper-bearing montmorillonite (Cu-MMT) on *Esherichia coli* and diarrhea on weanling pigs // Asian-Aust J Anim Sci.– 2004.–17.– P1712–1716.
25. Xia M.S., Hu C.H., Xu Z.R. Effects of copper bearing montmorillonite on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs // Anim Feed Sci Technol. – 2005.– 118.– P. 307–317.
26. Zhang Y., Wang X., Long L., Liu T., Cao Y. Montmorillonite adsorbs creatinine and accelerates creatinine excretion from the intestine // J. Pharm. Pharmacol.– 2009.– 61.– P. 459–464.

Отримано 17.05.2016