

Н.В. Чуйко, И.К. Курдиш

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

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО САПОНИТА И ДИОКСИДА КРЕМНИЯ НА ХЕМОТАКСИС *AZOTOBACTER VINELANDII* ИМВ В-7076 И *BACILLUS SUBTILIS* ИМВ В-7023

Цель. Изучение влияния наночастиц сапонита и диоксида кремния на подвижность и хемотаксис *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 и *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 – компонентов комплексного бактериального препарата Азогран. **Методы.** В экспериментах применяли микробиологические, физико-химические, биохимические и статистические методы исследования. Хемотаксис бактерий оценивали модифицированным нами капиллярным методом. **Результаты.** Показано, что при внесении в фосфатный буфер 0,05–1,0 г/л наночастиц сапонита и диоксида кремния наблюдалось стимулирование подвижности азотобактера. Эти частицы, как правило, не оказывали влияния на его хемотаксис. Лишь при наличии в среде 0,05 г/л диоксида кремния значение хемотаксисного индекса увеличивалось на 27%. Внесение в среду 0,05–0,5 г/л диоксида кремния или 0,05–0,20 г/л сапонита стимулировало подвижность бацилл, в то время как их хемотаксис снижался. **Выводы.** Взаимодействии бактерий *A. vinelandii* ИМВ В-7076 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 с наночастицами сапонита и диоксида кремния сопровождалось повышением подвижности клеток. Внесение в среду 0,05 г/л диоксида кремния стимулировало хемотаксис клеток азотобактера к глюкозе, тогда как сапонит не оказывал влияния на этот процесс. При содержании в суспензии *B. subtilis* ИМВ В-7023 наночастиц этих минералов хемотаксис бацилл существенно снижался.

Ключевые слова: хемотаксис, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*, высокодисперсные частицы сапонита и диоксида кремния.

В природных условиях микроорганизмы находятся в постоянном взаимодействии с разнообразными дисперсными материалами [1]. Это оказывает существенное влияние на физиолого-биохимическую активность бактериальных клеток [2].

Известно, что первичным этапом взаимодействия интродуцированных в агроэкосистему бактерий с растениями есть их хемотаксис к корневым выделениям. На примере клубеньковых бактерий нами показано, что на этот процесс могут оказывать влияние ряд факторов, в том числе наночастицы глинистых минералов палыгорскита и монтмориллонита, а также диоксида кремния [3,4]. Наряду с вышеперечисленными высокодисперсными материалами внимание учёных привлекает сапонит, относящийся к разновидности минералов группы монтмориллонита, который содержит значительное количество MgO. В связи с этим данный минерал может использоваться в качестве мелиоранта комплексного действия и раскислителя для некоторых видов почв [5].

На основе селекционированных высокоэффективных штаммов *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 и *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 нами создан

комплексный бактериальный препарат Азогран, применение которого позволяет повышать урожайность ряда видов растений на 18–37% [6]. Особенности влияния сапонита и других представителей природных минералов на направленное движение этих бактерий не изучались. Учитывая это, целью данной работы было исследование влияния высокодисперсных сапонита и диоксида кремния на хемотаксисные свойства *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 и *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 – компонентов комплексного бактериального препарата Азогран.

Материалы и методы. Объектом исследований были азотфиксирующие бактерии *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 [7] и фосфатмобилизирующие бактерии *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 [8], выделенные в отделе микробиологических процессов на твердых поверхностях Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины. Бактерии *A. vinelandii* выращивали в среде Эшби следующего состава (в г/л дистиллированной воды): сахароза – 20,0, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 0,4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2, NaCl – 0,2, K_2SO_4 – 0,1, $CaCO_3$ – 2,0, микроэлементы по Фёдорову – 1 мл, pH 7,0 – 7,5.

B. subtilis культивировали в пептонной среде, содержащей (в г/л дистиллированной воды): пептон – 10,0, NaCl – 3,0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3, KCl – 0,3, KH_2PO_4 – 0,2, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ и $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – следы, pH 6,5. Оба штамма бактерий культивировали до середины фазы логарифмического роста, после чего клетки осаждали путём центрифугирования при 2000 г на центрифуге ОПН-8, трижды отмывали калий-фосфатным буфером (0,01 М, pH 7,0) и суспендировали в нем. Полученные суспензии содержали $1 \cdot 10^8$ жизнеспособных клеток в мл.

Хемотаксис бактерий исследовали капиллярным методом [9]. Контрольные капилляры содержали калий-фосфатный буфер (0,01 М, pH 7,0). В качестве аттрактанта использовали 0,1 М раствор глюкозы на основе того же калий-фосфатного буфера. Хемотаксис оценивали по значению хемотаксисного индекса (отношение количества клеток в капиллярах с глюкозой к их численности в капиллярах с буфером). Численность бактерий в капиллярах определяли микроскопически методом прямого подсчета.

В экспериментах использовали природный глинистый минерал сапонит (Ташковского месторождения Хмельницкой области, Украина) и синтетический диоксид кремния в концентрациях 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 г/л (предоставлен Институтом химии поверхности НАН Украины). Размер частиц диоксида кремния составлял 5–40 нм. Для выделения высокодисперсной фракции сапонита его предварительно растирали в фарфоровой ступке и суспендировали в дистиллированной воде. После отстаивания полученную взвесь гомогенизировали на ультразвуковом дезинтеграторе и осаждали на центрифуге при 400 г. Из надосадочной жидкости получали наноразмерные частички, которые не наблюдались в световом микроскопе. В суспензии определяли содержание сапонита и рассчитывали объёмы, необходимые для получения его соответствующих количеств в суспензиях бактерий.

После внесения высокодисперсных материалов в суспензии бактерий их перемешивали и оставляли на 30 мин для установления контактного взаимодействия, а затем исследовали хемотаксис.

Статистическую обработку результатов исследований осуществляли, используя методы вариационной статистики [10].

Результаты. Показано, что при внесении в суспензию *A. vinelandii* ИМВ В-7076 0,1-1,0 г/л частиц сапонита количество бактерий, зашедших в контрольные капилляры с фосфатным буфером, было на 5-22% выше, чем при отсутствии минерала в суспензии. Эти результаты свидетельствуют о том, что взаимодействие клеток с частицами сапонита стимулировало хаотическую подвижность азотобактера (рис. 1). Подобное влияние оказывал сапонит на численность этих бактерий в капиллярах с глюкозой. Так, количество клеток, зашедших в капилляры с глюкозой в присутствии 0,2-1,0 г/л сапонита, также увеличивалось на 12–18% (рис. 1). Отсутствие различий в значениях хемотаксисного индекса в контрольном варианте (с сапонитом без глюкозы – 6,0 единиц) и опытном варианте с данным аттрактантом (5,7–5,8 единиц) свидетельствует о том, что взаимодействие данных бактерий с исследованными частицами глинистого минерала не влияло на хемотаксис азотобактера (таблица).

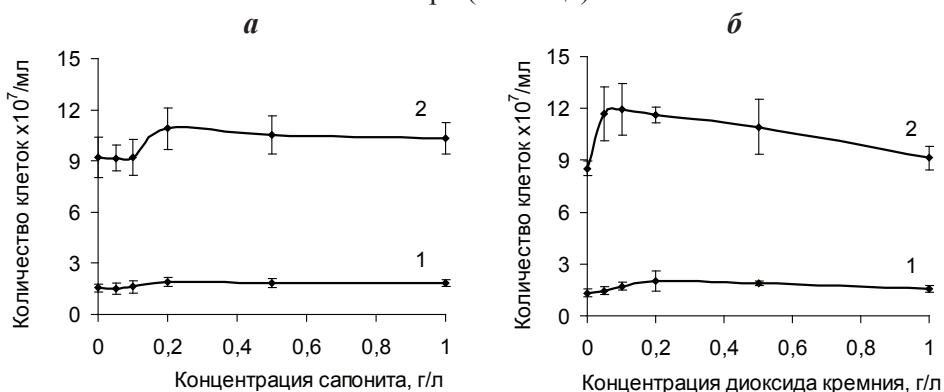


Рис.1. Влияние сапонита (а) и диоксида кремния (б) на хемотаксисные свойства *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076. Количество клеток в капиллярах с калий-фосфатным буфером (1) и глюкозой (2).

Таблица.
Влияние высокодисперсных материалов на хемотаксис бактерий

Материал	Вид бактерий	Хемотаксисный индекс (единицы) при содержании высокодисперсного материала в суспензии бактерий (г/л)					
		0	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00
Сапонит	<i>A. vinelandii</i> ИМВ В-7076	6,0	6,0	5,7	5,8	5,8	5,8
	<i>B. subtilis</i> ИМВ В-7023	9,2	9,1	8,9	8,9	4,1	2,5
Диоксид кремния	<i>A. vinelandii</i> ИМВ В-7076	6,4	8,1	7,0	5,8	5,8	5,8
	<i>B. subtilis</i> ИМВ В-7023	10,3	7,5	7,3	6,3	5,7	4,0

Внесение в суспензию *A. vinelandii* ИМВ В-7076 наночастиц диоксида кремния также приводило к увеличению подвижности клеток. Так, при наличии в суспензии бактерий 0,05–1,0 г/л этого высокодисперсного

материала количество клеток в капиллярах с буфером увеличивалось по сравнению с вариантом без данных наночастиц на 9–50% (рис.1). Численность клеток в опытных капиллярах с глюкозой в присутствии диоксида кремния повышалась на 7–40% (рис.1). Полученные показатели хемотаксисного индекса свидетельствуют о стимулировании направленного движения азотобактера к глюкозе при концентрации диоксида кремния 0,05 г/л на 27% (таблица).

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что внесение 0,05–0,20 г/л сапонита в суспензию *B. subtilis* ИМВ В-7023 не оказывало влияния на подвижность клеток и их хемотаксис. Однако при повышении его содержания до 0,5–1,0 г/л наблюдалось увеличение подвижности этих бактерий на 121–124% (рис. 2). Количество клеток бацилл в капиллярах с глюкозой, по сравнению с контрольным вариантом без минерала, либо оставалось неизменным (при его содержании 0,05–0,50 г/л), либо существенно уменьшалось (при 1,0 г/л) (рис. 2). Соответственно, хемотаксис *B. subtilis* ИМВ В-7023 под влиянием 0,5–1,0 г/л сапонита снижался в 2,2–3,7 раза (таблица). Таким образом, при взаимодействии *B. subtilis* ИМВ В-7023 с частицами сапонита подвижность клеток повышалась, тогда как хемотаксисные свойства бацилл при низком содержании частиц минерала не изменялись, а при 1г/л – существенно снижались.

Стимулирующее влияние на подвижность *B. subtilis* ИМВ В-7023 оказывало внесение в их суспензию 0,05-0,50 г/л диоксида кремния. После взаимодействия этих бактерий с данным материалом в капилляры с буфером заходило на 11–46% больше клеток (рис.2). В то же время их количество в капиллярах с глюкозой (рис. 2), и, как следствие, значения хемотаксисного индекса существенно понижались (максимально в 2,6 раза при 1,0 г/л высокодисперсного материала) (таблица).

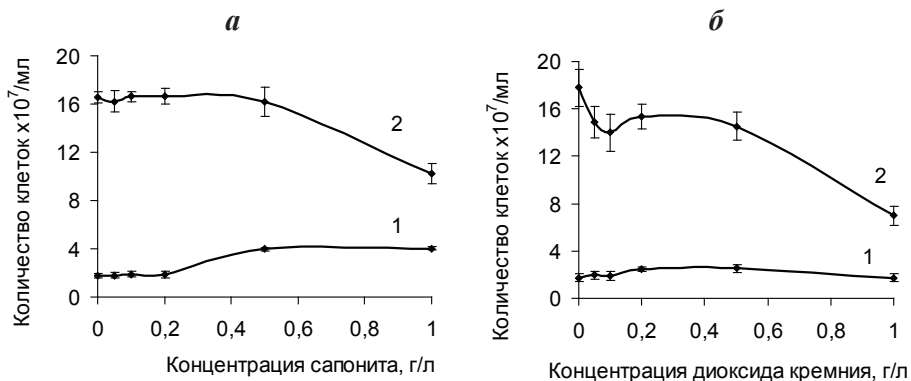


Рис.2. Влияние сапонита (а) и диоксида кремния (б) на хемотаксисные свойства *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023. Количество клеток в капиллярах с калий-фосфатным буфером (1) и глюкозой (2).

Таким образом, показано, что взаимодействие *A. vinelandii* ИМВ В-7076 с наночастицами сапонита и диоксида кремния (0,05-1,0 г/л) сопровождалось повышением хаотической подвижности бактерий. В то же время сапонит не оказывал влияния на хемотаксис данных бактерий, тогда как при их взаимодействии с 0,05 г/л диоксида кремния происходило стимулирование хемотаксиса клеток к глюкозе.

Взаимодействие *B. subtilis* ИМВ В-7023 с частицами сапонита (0,5–1,0 г/л) и диоксида кремния (0,05–0,50 г/л) стимулировало хаотическую подвижность этих бактерий. При содержании в суспензии наночастиц этих минералов хемотаксис бацилл существенно снижался.

Обсуждение результатов. Нами было показано, что при внесении наночастиц диоксида кремния и сапонита в суспензию *A. vinelandii* ИМВ В-7076 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 частицы минералов сорбируются на поверхности этих бактерий. Такое взаимодействие оказывает существенное влияние на физиолого-биохимическую активность исследованных бактерий [2, 11–14].

Установлено, что внесение наночастиц природных глинистых минералов монтмориллонита, палыгорскита и синтетического диоксида кремния в суспензию клубеньковых бактерий сои *Bradyrhizobium japonicum* сопровождалось повышением их подвижности и снижением хемотаксиса [3, 4]. Подвижность исследованных в этой работе *A. vinelandii* ИМВ В-7076 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 также повышалась под влиянием сапонита и диоксида кремния.

Стимулирование физиологической активности различных микроорганизмов дисперсными материалами подтверждается многими исследованиями [2]. Механизмы этих явлений еще недостаточно изучены. Однако они в значительной степени обусловлены контактным взаимодействием бактерий с исследованными наночастицами. Это, по мнению некоторых авторов, может сопровождаться повышением доступности для микроорганизмов питательных веществ, сорбировавшихся на этих частицах [15], изменением свойств поверхности частиц [16] и бактерий [17]. Для микроорганизмов, интенсивно продуцирующих полисахарид, к которым относится азотобактер, высказана гипотеза «облегченной диффузии» субстрата в клетку [18]. Она основана на факте изменения в присутствии диоксида кремния концентрации связанной воды и деформации супрамолекулярных структур водных гелей крахмала, использованного в качестве модельного полисахарида [19].

Ингибирование хемотаксиса *B. subtilis* ИМВ В-7023 к аттрактанту глюкозе сапонитом и диоксидом кремния можно объяснить исходя из уже высказанного ранее для *B. japonicum* [3, 4] предположения о блокировке или конформационным изменением высокодисперсными материалами белков-рецепторов хемотаксисной системы. При этом необходимо отметить то, что азотобактер оказался единственным из исследованных нами микроорганизмов, на хемотаксис которого высокодисперсные материалы не оказывали отрицательного влияния, а в отдельном случае даже стимулировали его.

Ранее нами было показано, что в смешанной культуре *A. vinelandii* ИМВ В-7076 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 хемотаксис азотобактера к глюкозе не изменялся, в то время как у бациллы он снижался. Ингибирующее влияние на хемотаксис бацилл оказывал выделенный полисахарид азотобактера. При его внесении в суспензию бацилл их хемотаксис заметно снижался [20].

Можно предположить, что полисахаридная капсула азотобактера защищает компоненты хемотаксисной системы бактерий от внешних вли-

яний, предотвращая контактное взаимодействие наночастиц минералов с белками-рецепторами хемотаксиса, что и способствует таковому при взаимодействии этих бактерий с наноматериалами.

Штамм *A. vinelandii* ИМВ В-7076 является компонентом комплексного бактериального препарата для растениеводства. Поскольку хемотаксис почвенных бактерий к корневым экссудатам растений является важным этапом для реализации стратегии занятия благоприятных для функционирования экологических ниш, защищенная полисахаридным слоем система хемотаксиса азотобактера, по-видимому, может иметь важное значение при интродукции в агроэкосистему биопрепаратов, включающих эти бактерии.

Таким образом, взаимодействие бактерий *A. vinelandii* ИМВ В-7076 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 с наночастицами сапонита и диоксида кремния сопровождалось повышением подвижности клеток. Сапонит не оказывал влияния на хемотаксис азотобактера. В то же время его взаимодействие с 0,05 г/л диоксида кремния сопровождалось стимулированием хемотаксиса клеток к глюкозе. При содержании в суспензии *B. subtilis* ИМВ В-7023 наночастиц этих минералов хемотаксис бацилл существенно снижался.

Н.В. Чуйко, І.К. Курдиш

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

ВПЛИВ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО САПОНІТУ І ДІОКСИДУ КРЕМНІЮ НА ХЕМОТАКСИС *AZOTOBACTER VINELANDII* ІМВ В-7076 І *BACILLUS SUBTILIS* ІМВ В-7023

Резюме

Мета. Дослідження впливу наночастинок сапоніту і діоксиду кремнію на рухливість і хемотаксис *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 і *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 – компонентів комплексного бактеріального препарату Азогран. **Методи.** В експериментах застосовували мікробіологічні, фізико-хімічні, біохімічні і статистичні методи досліджень. Хемотаксис бактерій визначали модифікованим нами капілярним методом. **Результати.** Показано, що при внесенні в фосфатний буфер 0,05–1,0 г/л наночастинок сапоніту і діоксиду кремнію спостерігалось стимулювання рухливості азотобактера. Ці часточки, як правило, не спричиняли впливу на його хемотаксис. Лише за наявності у середовищі 0,05 г/л діоксиду кремнію значення хемотаксисного індексу збільшувалось на 27%. Внесення у середовище 0,05–0,5 г/л діоксиду кремнію чи 0,05–0,20 г/л сапоніту стимулювало рухливість бацил, в той час як їх хемотаксис знижувався. **Висновки.** Взаємодія бактерій *A. vinelandii* ІМВ В-7076 і *B. subtilis* ІМВ В-7023 з наночастичками сапоніту і діоксиду кремнію супроводжувалась підвищенням рухливості клітин. Внесення у середовище 0,05 г/л діоксиду кремнію стимулювало хемотаксис клітин азотобактера до глюкози, тоді як сапоніт не впливав на цей процес. При вмісті в суспензії *B. subtilis* ІМВ В-7023 наночастинок цих мінералів хемотаксис бацил суттєво знижувався.

Ключові слова: хемотаксис, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*, високодисперсні часточки сапоніту і діоксиду кремнію.

**THE INFLUENCE OF HIGH-DISPERSITY SAPONITE AND SILICONE
DIOXIDE ON CHEMOTAXIS OF *AZOTOBACTER VINELANDII* IMV B-7076
AND *BACILLUS SUBTILIS* IMV B-7023**

Summary

Aim. The study of influence of the saponite nanoparticles and silica nanoparticles on mobility and chemotaxis of *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076 and *Bacillus subtilis* IMV B-7023. These bacteria are the components of complex bacterial preparation Azogran. **Methods.** The microbiological, physical-chemical, biochemical and statistical methods were used in the experiments. Chemotaxis of bacteria was investigated by modified by us capillary method. **Results.** Stimulation of mobility *A. vinelandii* IMV B-7076 was observed at addition into the phosphate buffer of 0.05 – 1.0 g/L of saponite nanoparticles and silica nanoparticles. These particles, as a rule, had no effect on his chemotaxis. The value of index chemotaxis was increased by 27% only in the presence of 0.05 g/L silicone dioxide in medium. The mobility of bacilli was stimulated at addition in nutrient medium of 0.05 – 0.5g/L silicone dioxide or 0.05 – 0.20 g/L saponite , but them chemotaxis was decreased. **Conclusions.** Interactions of bacteria *A. vinelandii* IMV B-7076 and *B. subtilis* IMV B-7023 with saponite nanoparticles and silica nanoparticles was accompanied by an increase mobility of cells. Chemotaxis of *A. vinelandii* IMV B-7076 cells to glucose was stimulated by addition of 0,05 g/l silicone dioxide into bacterial suspension. Saponite had no effect on this process. The chemotaxis of *B. subtilis* IMV B-7023 significantly was decreased at the content of nanoparticles of these minerals in the suspension of bacilli.

Keywords: chemotaxis, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*, high-dispersity particles of saponite and silicone dioxide.

1. Huang Q., Ming P, Violante A. Soil Mineral-Microbe-Organic interactions. Springer-Verlag Berlin: Heidelberg; 2008. 353 p.
2. Kurdish IK. Granulated Microbial Preparation for Plant Growing: Science and Practice. Kyiv: KVITs; 2001. 142 p.
3. Chuiko NV, Kurdish IK. The Chemotactic Properties of Bradyrhizobium japonicum in the Presence of Natural Fine-Grained Minerals. Microbiology. 2004; 73 (3): 364–367.
4. Chuiko NV, Gordienko AS, Kurdish IK. Chemotaxis and Growth of Bradyrhizobium japonicum in the Presence of Fine-Dispersed Silica. Microbiology. 2006. 75, (1); 44–47.
5. Spivak V, Astrelin I, Tolstopalova N, Atamaniuk I. Ecological sorbent which is mainly consist of saponite mineral from Ukrainian clay-field. Chemistry & Chemical Technology. 2012; 6(4):451-457.
6. Kurdish I.K. [Introduction of microorganisms in the agroecosystems]. Kyiv: Naukova dumka; 2010. -253 p. Ukrainian.
7. Patent of Ukraine № 72856. [Strain of bacteria *Azotobacter vinelandii* for bacterial fertilizer obtaining for plant-growing]. Kurdish IK, Bega ZT. Publ. 2006. Bul. № 8. Ukrainian.
8. Patent of Ukraine №54923 A. [Strain of bacteria *Bacillus subtilis* for bacterial fertilizer

- obtaining for plant growing]. Kurdish I.K., Roy A.O. Published in 2003. Bul. №3. Ukrainian.
9. Kurdish IK, Antonyuk TS, Chuiko NV. Influence of Environmental Factors on the Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology*. 2001; 70 (1): 106–110.
 10. Lakin G.F. 1990. [Biometry]. Moskow: Vysshaya shkola; 352p. Russian.
 11. Chobotarjov AYu, Gordienko AS, Kurdish IK. [Influence of natural minerals on growth of *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076]. *Microbiol Z.* 2010; 72 (5): 27-31. Ukrainian.
 12. Chobotarjov AYu, Gordienko AS, Samchuk AI, Kurdish IK. [Influence of silicon dioxide and saponite on growth of *Bacillus subtilis* IMV B-7023]. *Microbiol Z.* 2010; 72 (4): 33-39. Ukrainian.
 13. Herasimenko IO, Voychuk SI, Chobotarjov AYu, Kurdish IK. The influence of nano-sized silicon dioxide on the physiological and biochemical properties of *Azotobacter vinelandii*. Nano-sized systems: structure, properties, technology (NASIS-2013): IV International Scientific Conference, 19-22 November 2013 year: collection of abstracts. Kyiv: 2013. 452.
 14. Gordienko AS, Kurdish IK. Surface Electrical Properties of *Bacillus subtilis* Cells and the Effect of Interaction with Silicon Dioxide Particles. *Biophysics*. 2007. 52 (2): 217-220.
 15. Fletcher M. Effect of solid surfaces on activity of attached bacteria. *Bacterial adhesion*. New York, London: Plenum press; 1985. 339-326.
 16. Yu Liu, Shu-Fang Yang, Yong Li, Hui Xu, Lei Qin, Joo-Hwa Tay. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *J. of Biotechnology*. 2004; 110 (3): 251–256.
 17. Chobotarjov AYu, Gordienko AS, Kurdish IK. [Growth peculiarities of *Bacillus subtilis* and streptomycin resistant mutant in the medium with saponite] *Microbiol Z.* 2013; 75 (5): 62-67. Russian.
 18. Gordienko AS, Chobotarjov A Yu, Kurdish IK. [Influence of titanium dioxide on growth of *Azotobacter vinelandii* IMV V-7076]. *Microbiol Z.* 2009; 71 (3): 19-25. Russian.
 19. Turov VV, Novza AA, Leboda R, Skubisewska-Zieba J, Szesniak M, Turov KV. Bound water in starch hydrogels with high dispersed silica. *Problems of Cryobiology*. 2005; 15(4): 636-644.
 20. Chuiko NV, Gordienko AS, Kurdish IK. Chemotaxis of *Azotobacter vinelandii* and *Bacillus subtilis* in a mixed culture. *Microbiology*. 2013; 82 (2): 186–190.