

## ВЗАЄМОДІЯ БАКТЕРІЙ З ТВЕРДИМИ МАТЕРІАЛАМИ ТА НАНОМАТЕРІАЛАМИ ЯК ОСНОВА НОВИХ БІОТЕХНОЛОГІЙ

**І.К.Курдиш**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна  
e-mail: ivan.kurdish2016@gmail.com*

*У відділі мікробіологічних процесів на твердих поверхнях досліджуються особливості взаємодії метанотрофних, азотфіксувальних, фосфатмобілізувальних та інших груп мікроорганізмів з твердими матеріалами, в тому числі наноматеріалами різної природи, з метою визначення особливостей впливу цього процесу на фізіолого-біохімічну активність мікроорганізмів, розробки новітніх біотехнологій. Вперше запропоновано застосовувати метанотрофні бактерії для зниження метановиділення з вироблених просторів вугільних шахт. Застосування цієї біотехнології дозволило знизити метановиділення на вуглевидобувну дільницю на 47-60%. Встановлено, що контактна взаємодія мікроорганізмів з наночастками різної природи підвищує ростову активність, життєздатність клітин за впливу негативних факторів середовища та при їх розпилювальному висушуванні. Розроблено біотехнологію підвищення виходу життєздатних клітин при отриманні бактеріальних препаратів методом розпилювального висушування, що була впроваджена у виробництво препарату Літосил. На основі взаємодії високоактивних штамів фосфатмобілізувальних бактерій *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 та азотфіксувальних бактерій *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 з наночастками природних мінералів розроблена біотехнологія отримання комплексного бактеріального препарату Азогран. Він значно покращує ріст і розвиток декоративних, квіткових та інших рослин і підвищує врожайність технічних, зернових та овочевих культур на 18-37%. Препарат Азогран впроваджений у виробництво.*

*Ключові слова: метанотрофні бактерії, *Bacillus subtilis*, *Azotobacter vinelandii*, фізіолого-біохімічна активність, наноматеріали, мікробні біотехнології.*

Тридцять років назад в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України була створена лабораторія мікробіологічних процесів на твердих поверхнях, яка в подальшому була реорганізована у однопідрозділ, організатором і керівником якого є доктор біологічних наук, професор І.К. Курдиш. Основним напрямком наукової діяльності цього підрозділу є дослідження взаємодії метанотрофних, азотфіксувальних, фосфатмобілізувальних та мікроорганізмів інших груп з твердими матеріалами, в тому числі наноматеріалами різної природи, з метою визначення особливостей впливу цього процесу на фізіолого-біохімічну активність мікроорганізмів і розробки новітніх біотехнологій. Співробітниками новоствореної лабораторії були к.т.н. Гордієнко А.С., Титова Л.В., Цимберг О.О., Кравчук В.М., Харченко В.І., Єгоров О.В.

Значну увагу співробітники відділу приділяли розробці біотехнології зниження виділення метану з вироблених просторів вугільних шахт,

з яких в зону видобування вугілля надходить до 80% метану від його загальної кількості [1]. Це створює небезпеку для роботи шахтарів. Для зниження метановиділення з вироблених просторів вугільних шахт нами вперше запропоновано застосовувати метанотрофні бактерії, іммобілізовані на поверхні гірських порід, що заповнюють ці простори шахт.

Визначені особливості поверхні клітин ряду видів метанотрофних бактерій. А.С. Гордієнком з колегами встановлена значна роль електроповерхневих властивостей цих бактерій, гідрофобності їх поверхні та ряду фізико-хімічних факторів у адгезивній взаємодії метанотрофів з твердими матеріалами, в тому числі з гірськими породами вугільних шахт [2; 3; 4; 5; 6; 7; 8].

Було показано, що інтенсивність росту бактерій визначається не тільки концентрацією субстрату в середовищі, а й вмістом в ньому бактеріальних клітин. Тому перспективним підходом до управління процесом росту популяції мікроорганізмів є визначення оптимальної для росту питомої концентрації субстратів у середовищі і її підтримання в ході даного біотехнологічного процесу. Такий підхід нами було застосовано для оптимізації росту метанотрофних бактерій [9; 10].

Розроблено методи іммобілізації метанотрофних бактерій на гірській породі у вироблених просторах вугільних шахт [11; 12; 13]. У співпраці з співробітниками Інституту геотехнічної механіки НАН України (співкерівник проекту – д.т.н. М'якенький В.І.) було розроблено ферментаційні установки і біотехнологію отримання біомаси метанотрофних бактерій на шахтному метані та способи обробки гірських порід суспензією метанотрофних бактерій у вироблених просторах шахти [14; 15]. Застосування цієї біотехнології на шахті «Павлоградвугілля» дозволило знизити метановиділення на вуглевидобувну дільницю на 47%, а на шахті ім. Бажанова «ВО Макиїввугілля» – на 60% [14; 16].

В природних умовах бактерії функціонують за тісної взаємодії з твердими, в тому числі високодисперсними матеріалами. Методом мікроелектрофорезу та електронної мікроскопії нами встановлено, що за внесення наночасток діоксиду кремнію (аеросилу А-300) чи глинистих мінералів (бентоніту, монтморилоніту, палигорськіту) в суспензії бактерій вони вступають в контактну взаємодію, в результаті якої клітини покриваються частками цих матеріалів [17]. Така взаємодія спричиняє помітний вплив на фізіолого-біохімічну активність мікробних популяцій. Так, за культивування бактерій *Methylomonas rubra* 15ш чи *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 в середовищі, що містило 50-200 мг/л наночасток діоксиду кремнію або палигорськіту, значно зростала метанокислювальна та ростова активність цих мікроорганізмів [18].

Вирощування дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та *Candida tropicalis* К-41 в середовищі, в яке вносили наночастки діоксиду кремнію, значно підвищувало їх ростову активність [19; 20]. Подібний вплив даних часток спостерігався за культивування бактерій роду *Azotobacter* та *Bacillus*. Так, за вирощування *Azotobacter chroococcum* 20 в середовищі Ешбі, яке містило 0,05% діоксиду кремнію, чисельність цих бактерій у порівнянні з контролем зростала в 2 рази, а також значно підвищувалась кінематична

в'язкість культуральної рідини, що було обумовлено накопиченням в ній значної кількості полісахариду. Як показала к.б.н. Л.В.Титова з співавт., в середовищі, яке містило 0,05% діоксиду кремнію, модифікованого іонами алюмінію (алюмоаеросилу), ці показники досягали ще більш високих значень [21]. За вирощування *Azotobacter chroococcum* 20 чи *A. vinelandii* 56 в середовищі, яке містило 0,05% аеросилу або алюмоаеросилу, суттєво зростає вміст в ньому тіаміну (вітаміну  $B_1$ ) та піридоксину (вітаміну  $B_6$ ), [22].

Культивування бактерій *Agrobacterium radiobacter* 10 та *A. radiobacter* 204 в середовищі, яке містило 0,05% наночасток діоксиду кремнію, підвищувало ростову активність бактерій у порівнянні з контролем (без наночасток) на 32%. За внесення до нього 1% часток монтморилоніту чи палигорськіту чисельність цих бактерій у порівнянні з контролем зростала на 71,5 та 78,6 % відповідно [23].

Взаємодія бактерій *Methylobionas rubra* 15ш, *Pseudomonas aureofaciens* УКМ-111 та інших мікроорганізмів з наночастками глинистих мінералів монтморилоніту, палигорськіту, бентоніту значно стимулювала життєздатність клітин за їх тривалого зберігання та за дії підвищених температур [24; 25]. Інкубація суспензії *Agrobacterium radiobacter* 204 за температури 50°C протягом 15 хв супроводжувалась зниженням чисельності життєздатних клітин на 40% (контроль). В той же час за попереднього внесення в таку суспензію 1% палигорськіту їх чисельність знижувалась лише на 20% [23]. Подібний вплив спричиняли частки цього мінералу на життєздатність *Bradyrhizobium japonicum* 634 б [26] та бактерій *Azotobacter chroococcum* 20 [27]. Розроблений нами підхід підвищення виживання бактерій за дії екстремальних факторів середовища є перспективним для покращення зберігання колекційних штамів мікроорганізмів, а також для створення нових форм бактеріальних препаратів для рослинництва [28].

Зважаючи на протекторний вплив часток глинистих мінералів на виживання бактерій, нами розроблена біотехнологія підвищення виходу життєздатних бактерій в препаратах при їх виготовленні методом розпилювального висушування. З цією метою в суспензію бактерій вносили до 10 г/л часток палигорськіту, суміш перемішували і після 15 хвилин взаємодії клітин з частками мінералу в суспензію вносили захисне середовище (сухе знежирене молоко, що використовувалось в даному процесі). Такий композит піддавали розпилювальному висушуванню. Цей спосіб дозволив підвищити вихід життєздатних клітин *Streptococcus faecium* та інших видів бактерій за виготовлення їх препаратів вказаним методом у порівнянні з контролем (без часток мінералу, але з сухим молоком) більш, ніж на 60% [29; 30]. Вказана біотехнологія була впроваджена у виробництво препарату «Літосил» на Київському заводі медпрепаратів.

Селекціоновано високоактивні штами фосфатмобілізувальних бактерій *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023[31] та азотфіксувальних бактерій *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 [32]. Встановлено, що за культивування бактерій *B. subtilis* ІМВ В-7023 в середовищі Муромцева, в яке вносили 0,5% наночасток палигорськіту чи монтморилоніту, чисельність життєздатних клітин в суспензії зростала у порівнянні з контролем понад 70% [33]. Помітний стимулювальний вплив на фізіолого-біохімічну активність

бактерій *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 спричиняло їх культивування в середовищі, що містило наночастки діоксиду кремнію, сапоніту, глауконіту, вермикуліту [34].

Взаємодія бактерій з дослідженими наночастками значно підвищує їх дегідрогеназну активність. Так, за культивування *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 в живильному середовищі, яке містило 10 г/л часток вермикуліту, її активність зростала у порівнянні з контролем на 43% [35]. Культивування *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 з частками вермикуліту менш помітно стимулювало дегідрогеназну активність цих бактерій. В середовищі, яке містило 0,1-1,0 г/л вермикуліту, цей показник зростав відносно контролю на 10-13% [36].

Важливими властивостями мікроорганізмів, що входять до складу препаратів для рослинництва, є їх здатність синтезувати біологічно активні речовини, які можуть впливати на ріст, розвиток рослин, їх захист від впливу негативних факторів. За культивування фосфатмобілізуювальних бактерій *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 в середовищі Менкіної з гліцерофосфатом кальцію та глюкозою накопичувався ряд амінокислот (лейцин, серин, ізолейцин, тирозин, фенілаланін, глютамінова та аспарагінова кислоти) [37] та органічних кислот, серед яких в найбільших кількостях визначались оцтова (до 32,5 мкг/мл) та пеларгонова (до 6 мкг/мл) кислоти [38].

Після вирощування бактерій *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 в середовищі Ешбі чи Берка визначалось лише 6 органічних кислот в значно нижчих концентраціях, ніж у *B. subtilis*. В найвищих кількостях виявлена оцтова кислота (до 5,4 мкг/мл). Культивування азотобактера в середовищі Ешбі супроводжувалось накопиченням в ньому незначної кількості амінокислот, загальний вміст яких досягав 2,78 мкг/мл. Однак за їх вирощування з глауконітом чи сапонітом концентрація амінокислот зростала відповідно до 14,4 та 16,7 мкг/мл. В найвищих кількостях накопичувався пролін (до 9,55 мкг/мл) та аргінін (до 7 мкг/мл). [39; 40].

Значний інтерес серед мікробних метаболітів представляють речовини фенольної природи, оскільки їм притаманний широкий спектр біологічних властивостей. Встановлено, що 16 досліджених штамів фосфатмобілізуювальних бактерій роду *Bacillus*, виділених к.б.н. Рой А.О., за їх культивування протягом 48 год в середовищі Менкіної, здатні накопичувати сполуки фенольної природи [41; 42; 43]. Найбільш активними продуцентами фенолів за даних умов культивування були *B. megaterium* 1 та 2 – 67,3 мкг/мл і 67,7 мкг/мл, відповідно. В поживному середовищі з желатиною і мальтозою всі досліджувані штами бацил накопичували значно вищі кількості сполук фенольної природи. Найвищі концентрації цих речовин визначались в культуральному середовищі *B. subtilis* ІМВ В-7023 – понад 94 мкг/мл [42]. Серед фенольних сполук даного штаму в значних кількостях накопичувались фенілоцтова та 4-гідроксифенілоцтова кислоти. Остання сполука характеризується антиоксидантною активністю [41].

Встановлено, що за культивування *A. vinelandii* ІМВ-7076 в середовищах різного складу також накопичувались речовини фенольної природи. При вирощуванні цього штаму в середовищі Ешбі протягом 72 год в ньому визначалось до 69 мкг/мл цих сполук. За культивування бактерій протягом даного часу в середовищі Берка накопичувалась нижча кількість фенолів – до 30,8 мкг/мл [43]. Показано, що за вирощування огірка,

насіння якого було бактеризоване цими бактеріями, в його тканинах зростав вміст фенольних сполук [44].

Важливим фактором стимулюючого впливу мікроорганізмів на ріст і розвиток рослин є синтез ними фітогормонів. Встановлено, що бактерії *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 і *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 здатні синтезувати ряд речовин фітогормональної природи [45]. За участі к.б.н. Церковняк Л.С. показано, що культивування *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 в середовищі з L-триптофаном супроводжується накопиченням в ньому до 140 нг/мл вільної індолілоцтової кислоти (ІОК) та близько 160 нг/мл цього ауксину в зв'язаному стані [46].

За вирощування цих бактерій без L-триптофану дані бактерії накопичували значно нижчі концентрації вказаного фітогормону як в середовищі без наночасток діоксиду кремнію і вермикуліту, так і за їх наявності в ньому. В той же час за культивування *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 в середовищі з наночастками вермикуліту вміст в ньому ІОК помітно зростав у порівнянні з варіантом без цих часток [47].

Особливо помітний вплив спричиняло культивування як *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076, так і *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 з наночастками вермикуліту на накопичення в середовищі абсцизової кислоти. Як показано к.б.н. Чоботарьовим А.Ю. з співавт. [47], за їх вмісту в середовищі концентрація цього фітогормону зростала відповідно на 132 і 67%. Культивування *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 в середовищі, яке містило наночастки діоксиду кремнію чи вермикуліту, помітно стимулювало накопичення цитокінінів: зеатину, зеатин-рибозиду, в той час як на синтез зеатин-глікозиду, ізопентил аденіну та ізопентил аденозину ці наночастки стимулювального впливу не спричиняли.

Таким чином, бактерії *A. vinelandii* ІМВ В-7076 та *B. subtilis* ІМВ В-7023 синтезують ряд органічних кислот, амінокислот, фітогормонів та сполук фенольної природи, які здатні покращувати ріст і розвиток рослин. Культивування цих штамів в живильних середовищах, що містили наночастки матеріалів природного походження, стимулювало ріст бактерій та накопичення ними біологічно активних сполук в середовищі.

Важлива роль у функціонуванні живих клітин в умовах впливу негативних факторів середовища належить системі їх антиоксидантного захисту. К.б.н. Скороход І.О. з співавт. встановлено, що бактерії *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 та *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 характеризуються високим ступенем антиоксидантного та антирадикального захисту. Значний вплив на ці показники спричиняло культивування *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 в середовищі з наночастками вермикуліту [48; 49]. Встановлено, що вирощування *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 в середовищі з наночастками діоксиду їх низькі концентрації активізували системи антиоксидантного захисту клітин, тоді як за вмісту 1 г/л наночасток діоксиду кремнію антиоксидантна активність знижувалась на 11,8%, активність перехоплення радикалу гідроксила – на 17,6%, відновлювальна активність – на 26,9% [50].

Першою ланкою захисту живих клітин від активних форм кисню (АФК) є ферменти каталаза, пероксидаза та супероксиддисмутаза (СОД). Нами досліджено особливості активності цих ензимів у бактерій *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 та *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023. Вста-

новлено, що культивування цього штаму бацил в середовищі, яке містило 0,05-0,5 г/л наночасток  $\text{SiO}_2$  чи 1,5-2,5 г/л часток вермикуліту, супроводжувалось підвищенням позаклітинної пероксидазної активності. Однак при подальшому збільшенні вмісту цих часток в середовищі даний показник знижувався. На позаклітинну та внутрішньоклітинну каталазну активність, а також на внутрішньоклітинну пероксидазну активність бацил частки діоксиду кремнію та вермикуліту помітного впливу не спричиняли [51].

Певний вплив на активність ферментів антиоксидантної дії бактерій спричиняла їх взаємодія з іншими наноматеріалами. Так, за культивування *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 в середовищі, в яке вносили 1г/л бентоніту чи сапоніту, супероксиддисмутазна активність бактерій зростала на 17,5%. За додавання до цього середовища 0,5 мМ іонів  $\text{Mn}^{2+}$ , які можуть входити до складу активного центру цього ферменту, СОД-активність зростала у порівнянні з контролем (без наночасток) – на 31,5% [52].

Показано, що бактерії *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 та *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 здатні спричиняти антиоксидантний вплив на насіння рослин, що підлягало дії стрес-фактору. Так, обробка насіння жита сорту Інтенсивне-9 протягом 15 чи 30 хв 50% пероксидом водню знижувала його схожість на 14 та 70% відповідно. Однак обробка такого насіння культуральним середовищем *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 чи *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 відновлювала схожість цього насіння на 12-16% [53]. Подібні результати нами були отримані за впливу пероксиду водню на насіння вики сорту Маргарита та наступної його обробки культуральним середовищем бактерій роду *Bacillus* [54].

Значна увага у відділі приділялась дослідженню особливостей взаємодії інтродукованих в агроєкосистему бактерій з рослинами та іншими компонентами фітосфери. Первинним етапом цього процесу є хемотаксис бактерій до насінневих та кореневих ексудатів. Дослідженню цього питання значну увагу приділяла к.б.н. Н.В. Чуйко. Встановлено, що бактерії *Bradyrhizobium japonicum* 634 б, *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 і *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 проявляють хемотаксис до широкого спектру вуглеводів, амінокислот, органічних кислот [55; 56; 57; 58; 59].

Досліджено вплив ряду факторів на хемотаксисні властивості цих мікроорганізмів. Показано, що за їх взаємодії з наночастками діоксиду кремнію чи глинистих мінералів значно підвищувалась рухливість клітин, в той час як хемотаксис бацил і ризобій знижувався [56; 58]. Помітне зниження хемотаксису бацил також спостерігали за їх контакту з полісахаридом азотобактера, який сорбувався на поверхні клітин *B. subtilis*, що супроводжувалось підвищенням дзета-потенціалу бацил від -35,8 мВ до -46 мВ, значень, характерних для клітин азотобактера [58; 59]. Ці результати вказують на можливість блокування рецепторів хемотаксису на поверхні даних бактерій дослідженими наночастками та полісахаридом азотобактера [59].

Нами показано, що підвищення хемотаксису *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 і *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 за дії певних факторів корелює зі збільшенням їх адгезії до коріння рослин [57]. Встановлено, що найвищою адгезивною активністю цього штаму азотобактера до коріння рослин огірка сорту Конкурент характеризувались бактерії, відібрані в фазі їх

логарифмічного росту (24 год). Клітини бактерій, відібрані в стаціонарній фазі росту (72 год культивування), адгезувались в значно менших кількостях, а після їх культивування протягом 96 год кількість адгезованих клітин на поверхні коріння була в 10 разів нижчою, ніж в першому варіанті. Ці відмінності були обумовлені високими показниками негативного заряду поверхні бактерій і втратою рухливості клітин за їх тривалого культивування [60]. Значною адгезивною активністю до поверхні коріння рослин характеризуються також фосфатмобілізувальні бактерії роду *Bacillus* [61].

Зважаючи на пластифікаційні властивості глинистих мінералів, їх стимулювальну дію на фізіолого-біохімічну активність бактерій, захисний вплив наночасток на життєздатність клітин, їх антиоксидантні властивості, на основі взаємодії селекціонованих нами штамів азотфіксувальних бактерій *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 та фосфатмобілізувальних бактерій *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 з частками глинистого мінералу бентоніту створено комплексний гранульований препарат Азогран для рослинництва [62].

Цей препарат покращує азотне, фосфорне живлення рослин, стимулює їх ріст і розвиток завдяки синтезу ряду біологічно активних речовин бактеріями, в тому числі сполук фітогормональної природи, здатності пригнічувати ураження рослин фітопатогенами та фітофагами. Встановлено, що *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 є антагоністом значної кількості штамів фітопатогенних бактерій і мікроміцетів [63]. Цей штам помітно пригнічував поширення в фітосфері збудника бактеріального раку помідорів [64], а також інших фітопатогенів [65]. Нами встановлено, що епіфітна обробка рослин значно знижує поширення в агроecosистемах ряду видів фітофагів [65; 66].

Зважаючи на те, що взаємодія *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 і *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 з частками вермикуліту значно стимулює ріст, фізіолого-біохімічну активність цих бактерій, а також сприяє їх виживанню за тривалого зберігання, на основі взаємодії цих штамів з частками спученого вермикуліту нами створено сипку форму комплексного бактеріального препарату Азогран, яка є зручною для бактеризації насіння рослин [67].

Препарат Азогран спричиняє більш помітний стимулювальний вплив на ріст і розвиток рослин у порівнянні з застосуванням моноштамових препаратів. Як гранульований, так і сипкий препарат Азогран є стабільними при тривалому зберіганні (до 6 місяців).

Подібний стимулювальний вплив на формування бобово-ризобіального симбіозу та врожайність сої спричиняли запропоновані нами бінарні бактеріальні композиції на основі *Bradyrhizobium japonicum* 634б і *Bacillus megaterium* 2, *B. japonicum* 634б і *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 чи *B. japonicum* 634б і *Azotobacter chroococcum* 20 у співвідношенні 1:0,1. При їх застосуванні кількість бульбочок на корінні рослин збільшувалась на 29–71%, їх маса – на 32 – 35%, маса наземної частини рослин – на 47–76 % порівняно з застосуванням *B. japonicum* 634б (контроль) [68].

Застосування комплексного бактеріального препарату Азогран в агроecosистемах значно покращує ріст і розвиток газонної трави, ряду видів декоративних рослин (хлорофітуму, драцени, іренизе, товстянки, самшиту, туї), квіткових рослин (беганії, троянд та інших), сіянців і саджанців сосни і ялини, [69; 70; 71], підвищує урожайність технічних, зернових та

овочевих культур на 18–37% [ 69; 72; 73; 74].

Нами показано, що внесення двох гранул препарату під розсаду помідорів підвищувало їх врожайність на 37%, а внесення однієї гранули цього препарату в кореневу зону троянд сорту Ліус збільшувало кількість квітконосних пагонів рослин на 45% [69; 70; 71].

Таким чином, показано, що взаємодія ряду видів мікроорганізмів з твердими поверхнями та наноматеріалами різної природи помітно стимулює фізіолого-біохімічну активність мікробних популяцій, захищає їх від впливу негативних факторів середовища. Отримані результати є основою нових біотехнологій. На основі взаємодії *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 та *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 з частками бентоніту та вермикуліту розроблено, відповідно, гранульований та сипкий комплексний бактеріальний препарат Азогран для рослинництва. Цей препарат значно покращує ріст і розвиток декоративних, квіткових та інших рослин та підвищує врожайність технічних, зернових та овочевих культур на 18–37%.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ С ТВЕРДЫМИ МАТЕРИАЛАМИ И НАНОМАТЕРИАЛАМИ КАК ОСНОВА НОВЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ

*И.К.Курдиш*

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

### Резюме

В отделе микробиологических процессов на твердых поверхностях исследуются особенности взаимодействия метанотрофных, азотфиксирующих, фосфатмобилизирующих и других групп микроорганизмов с твердыми материалами, в том числе наноматериалами разной природы, с целью определения особенностей влияния этого процесса на физиолого-биохимическую активность микроорганизмов, разработки новых биотехнологий. Впервые предложено использовать метанотрофные бактерии для снижения метановыделения из выработанных пространств угольных шахт. Применение этой биотехнологии понижало метановыделение на угледобывающий участок на 47–60%. Показано, что контактное взаимодействие микроорганизмов с наноматериалами разной природы повышает их ростовую активность, жизнеспособность бактерий при влиянии негативных факторов среды и при их распылительном высушивании. Разработана биотехнология повышения выхода жизнеспособных клеток при получении бактериальных препаратов методом распылительного высушивания, которая внедрена в производство препарата Литосил. На основе взаимодействия высокоактивных штаммов фосфатмобилизирующих бактерий *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и азотфиксирующих бактерий *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 с наночастицами природных минералов создана биотехнология получения комплексного бактериального препарата Азогран. Он значительно улучшает рост и развитие декоративных, цветочных и других растений и повышает урожайность технических, зерновых и овощных культур на 18–37%. Препарат Азогран внедрен в производство.

*Ключевые слова:* метанотрофные бактерии, *Bacillus subtilis*, *Azotobacter vinelandii*, физиолого-биохимическая активность, наноматериалы, микробные биотехнологии.



# INTERACTION OF BACTERIA WITH SOLID MATERIALS AND NANOMATERIALS AS BASIS NEW BIOTECHNOLOGIES

I. K. Kurdish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

## Summary

The Department of Microbiological Processes on Solid Surfaces investigates the interactions of methanotrophic, nitrogen-fixing, phosphate-mobilizing and other groups of microorganisms with solid materials, including nanomaterials of various natures. The main objective of these studies is to determine the peculiarities of the effect of these processes on the physiological and biochemical activity of microorganisms and the development of the modern biotechnologies. For the first time it was proposed to use methanotrophic bacteria to reduce methane emissions from the worked out spaces of coal mines. Application of this biotechnology has allowed to reduce the methane release to the coal mining site by 47–60%. It was established that the contact interaction of microorganism with nanoparticles of various nature increases their growth activity, cell viability through the influence of negative environmental factors and the result of spray drying. The technology of the increasing the yield of viable cells in bacterial preparation by the method of spray drying was introduced in the production of the preparation Litosil. The biotechnology preparation Azogran on the basis of the interaction of highly active strains of phosphate-mobilizing bacteria *Bacillus subtilis* IMV B-7023 and nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076 with nanomaterials of natural minerals use creation. It significantly improves the growth and development of ornamental, flower and other plants and increases the yield of technical, grain and vegetable crops by 18–37%. Azogran preparation is introduced into production.

*Keywords:* methanotrophic bacteria, *Bacillus subtilis*, *Azotobacter vinelandii*, physiological and biochemical activity, nanomaterials, microbial biotechnology.

1. Kurdish IK, Myakenky VI, Demchenko VB, Kigel NF, Artemov KV, Trunov LF. [Prediction of intensity of microbiological methane oxidation in goafs of coal mines]. Microbiol. Z. 1992; 54(3): 66-74. Russian.
2. Gordienko AS, Kurdish IK. [Electrokinetic properties of *Methylomonas rubra* cells and their interaction with dispersed materials]. Microbiol. Z. 1990; 52 (4):88-92. Russian.
3. Kurdish IK, Kigel NF. [Effect of palygorskite, a clayey mineral, on physiological activity and adhesion of methanotrophic bacteria]. Microbiol. Z. 1992; 54 (1):73-78. Russian.
4. Gordienko AS, Zbanatskaya IV, Kurdish IK. Increase in the negative surface charge of *Methylomonas rubra* cells at contact interaction with the particles of silicon dioxide. Microbiol. Z. 1999; 61 (5): 48-55.
5. Kurdish IK, Gordienko AS, Kigel' NF and Kisten' AG. Comparative Study on Adhesion of Various Species of Methanotrophic Bacteria to Solid Materials. Appl. Biochem. Microbiol. 1998; 34(3): 222-226.
6. Kisten AG, Kigel NF, Kurdish IK, Gordienko AS. [Effect of some physico-chemical environment factors on adhesion of methanotrophic bacteria]. Microbiol. Z. 1996;

- 58(3): 62-70. Russian.
7. Kisten' AG, Roi AA, Kurdish IK and Shevchenko TV. Adhesion of Mixed Cultures of Methanotrophic Bacteria to Solid Materials. *Appl. Biochem. Microbiol.* 1998; 34(4): 377-381.
  8. Gordienko AS, Shevchenko TV, Kurdish IK. [Effect of chemical modification of *Methylocystis parvus* cells surface on electrokinetic properties and adhesion of these bacteria]. *Microbiol. Z.* 1997; 59(2): 24-29. Russian.
  9. Kurdish IK, Muchnik FV, Malashenko YuR, Dementieva OA. Specific [Concentration of Nutrients as a Criterion Controlling Microorganism Cultivation]. *Mikrobiol. Z.* 1988; 50(3): 13- 16. Russian.
  10. Kurdish IK, Muchnik FV, Malashenko JR. The mathematical model to control the microbial cultivation process by the specostat principle. *Progress in Biotechnology.* (Eds. A. Blazej, A.Ottova). Elsevier. Amsterdam- Oxford- New York- Tokyo. 1990; (6): 175-182.
  11. Kurdish IK, Kravchuk VN, Egorov OV, Karpenko VI, Malashenko YuR. [Adhesion of methane-oxidizing bacteria to rocks of coal mines]. *Microbiol. Z.* 1990; 52(1): 73-77. Russian.
  12. Kurdish IK, Kigel N F, Egorov OV. [Physiological activity of methanotrophic bacteria under their interaction with mountain rocks]. *Microbiol.Z.* 1991; 53(1): 92-98. Russian.
  13. Kurdish IK. [On the problem of perspectiveness of application of certain species of methanotrophs to decrease methane liberation in coal mines]. *Microbiol. Z.* 1996; 58(4): 86-92. Russian.
  14. Myakenky VI, Kurdish IK [Microbiological oxidation of coal mine methane]. *Kiyv. Naukova dumka*, 1991. Russian.
  15. A.C.USSR № 166739. [Method of degassing the worked out lava space] Myakenky VI, Kurdish IK, Demchenko V B and other. 1991; *Bul.* 45. Russian.
  16. Myakenky VI, Kurdish IK, Demchenko VB, Petukh AP, Shmigol AV, Trunov LF. [Efficiency of microbiological oxidation of methane in the exhausted spaces of coal mines]. *Microbiol. Z.* 1992; 54(1): 67-73. Russian.
  17. Gordienko AS, Zbanatskaja IV, Kurdish IK. Change in electro-surface properties of *Methylomonas rubra* cells at contact interaction with particles of silicon dioxide. *Can. J. Microbiol.* 1993; 39(9): 902-905.
  18. Kurdish IK, Kigel NF. [Effect of high-dispersed materials on physiological activity of methanotrophic bacteria]. *Microbiol. Z.* 1997; 59(2): 29-36. Russian.
  19. Kurdish IK, Bikhunov VL, Tsimberg EA, Elchits SV, Vygovskaya EL, Chuiko AA. [Effect of dispersed silicon dioxide-aerosil A-300 on the growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*]. *Microbiol. Z.* 1991; 53(2): 41-44. Russian.
  20. Tsimberg EA, Titova LV, Kurdish IK. [Effect of highly-dispersed materials on the growth of *Candida* yeast]. *Microbiol. Z.* 1991; 53(4): 55-58. Russian.
  21. Kurdish IK, Titova LV, Tsimberg EA, Antipchuk AF, Tantsyurenko EV. [Effect of Aerosil on the Growth of *Azotobacter chroococcum*]. *Microbiol. Z.* 1993; 55(1): 38-42. Russian.
  22. Titova LV, Antipchuk AF, Kurdish IK, Skochinskaya NN, Tantsyurenko EV. [Effect of high-dispersed materials on physiological activity of *Azotobacter* bacteria]. *Microbiol. Z.* 1994; 56(3): 60-65. Russian.

23. Kurdish IK, Titova LV. Use of High-Dispersed Materials for Culturing and Obtaining Granular *Agrobacterium radiobacter* Preparation. Appl. Biochem. Microbiol. 2001; 37(3): 318-321.
24. Kurdish IK, Kigel NF, Bortnik SF. [Stabilization of physiological activity of methanotroph *Methylomonas rubra* 15m under storage]. Microbiol. Z. 1993; 55(4): 37-43. Russian.
25. Kurdish IK, Roy AA, Garagulya AD, Kiprianova EA. Survival and antagonistic activity of *Pseudomonas aureofaciens* UKM B-111 stored in fine materials. Microbiology. 1999; 68(3): 387-391.
26. Kurdish IK, Antonyuk TS. [Effect of clayey minerals on viability of some bacteria at high temperatures]. Microbiol. Z. 1999; 61(3): 3-8. Russian.
27. Kurdish IK, Titova LV. Granular Preparations of *Azotobacter* Containing Clay Minerals. Appl. Biochem. Microbiol. 2000; 36(4): 418-420.
28. Kurdish IK. [Granulated Microbial Preparation for Plant-growing: Science and Practice]. Kyiv. 2001. KVITs. ISBN 966-7192-33-4. Russian.
29. Gordienko AS, Kurdish IK, Krasnobrizhy NYa. [Effect of clay mineral palygorskite on survivability of bacteria under their dewatering]. Microbiol. Z. 1990; 52(5): 75-78. Russian.
30. Patent of Ukraine №14654A. [Method for obtaining dry bacterial preparation]. Kurdish IK, Krasnobrizhy NYa, Gordienko AS. Published 1991. Bul. №5. Ukrainian.
31. Patent of Ukraine № 54923A. [Strain of bacteria *Bacillus subtilis* for bacterial fertilizer obtaining for plant-growing]. Kurdish IK, Roy AO. Published in 2003, bulletin 3. Ukrainian.
32. Patent of Ukraine № 72856. [Strain of bacteria *Azotobacter vinelandii* for bacterial fertilizer obtaining for plant-growing]. Kurdish IK, Bega ZT. Published in 2006, bulletin 8. Ukrainian.
33. Kurdish IK, Bega ZT. Effect of Argillaceous Minerals on Growth of Phosphate-mobilising Bacteria *Bacillus subtilis*. Appl. Biochem. Microbiol. 2006; 42(4): 388-391.
34. 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.
35. Gerasymenko IO, Kurdish IK. [Influence of Vermiculite and Silicon Dioxide on Dehydrogenase Activity of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 and *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076]. Microbiol. Z. 2015; 77(1): 20-24. Ukrainian.
36. Kurdish IK, Gerasimenko IO. [Influence of Physico-chemical Factors on Dehydrogenase activity of *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076]. Microbiol. Z. 2017; 79(4): 3-11. Ukrainian.
37. Tsercovniak LS, Roy AA, Kurdish IK. [Synthesis of aminoacids of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 in the medium with glycerophosphates]. Microbiol. Z. 2009; 71(5): 18-23. Ukrainian.
38. Roy AA, Gordienko AS, Kurdish IK. [Some properties of the patern and resistant to streptomycin strain *Bacillus subtilis* IMV B-7023 a compound of bacterial preparations for plant growing]. Current state and prospects for the development of microbiology and biotechnology. Minsk, June 1-2. 2006. – Minsk, Rakov. 2006; 294-296. Russian.
39. Kurdish IK, Roy AO, Skorochoch IO, Chobotarov AYu, Herasimenko IO. [Elaboration of a free-flowing complex bacterial preparation for cereal crops]. Nanosize system and nanomaterials: studies in Ukraine. Kiyv, Akademperiodika, 2014; 610-614. Russian.

40. Kurdish IK. [Influence of biogenic and abiogenic factors on the efficiency of microorganisms introduction into agroecosystems]. *Microbiol. Biotech.* 2009; (1): 22-38. Ukrainian.
41. Tserkovniak LS, Kurdish IK. Phosphate-mobilizing Bacteria *Bacillus subtilis* as Phenolic Producers. *Appl. Biochem. Microbil.* 2009; 45(3): 279-284.
42. Anton Ocheretyanko, Iryna Skorochod, Alla Roy, Ivan Kurdish. Accumulation of Phenolic Compounds in Cultural Media of Phosphate-Mobilizing Bacteria of Genus *Bacillus* Cohn. *Intern. J. Scientific Research in Knowledge.* 2015; 3(5): 131-138.
43. Anton Ocheretyanko, Iryna Skorochod, Alla Roy, Ivan Kurdish. Influence of Physical and Chemical Factors on the Accumulation of Phenolic Compounds Nitrogen-Fixing Bacteria *Azotobacter vinelandii* IMV B-7023// *Acta Velit.* 2016; 2(1): 49-55.
44. Brusnika VYu, Ocheretyanko AA, Useinov RSh and other. Influence of *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076 on the content of phenolic compounds in cucumber plants. *Quarantine and integrated plant protection. Prospects of development in the XXI century.* Kyiv. 2015; 32-33.
45. Ivan Kurdish, Alla Roy, Iryna Skorochod et al. Free-Flowing Complex Bacterial Preparation for Crop and Efficiency of its use in Agroecosystems. *J. Microbil., Biotechnol. and Food Science.* 2015; 4(6): 527-531.
46. Tserkovniak LS, Bega ZT, Ostapchuk AN, Kuz'min VE, Kurdish IK. [Production of biologically active substances of indol nature by bacteria of *Azotobacter* Genus]. *Ukr. Biochem. Z.* 2009; 81(3): 122-128. Russian.
47. Andrii Chobotarov, Mykola Volkogon, Lesya Voytenko, Ivan Kurdish. Accumulation of Phytohormones by Bacteria *Azotobacter vinelandii* and *Bacillus subtilis* under Influence of Nanomaterials. *J. Microbiology, Biotechnology and Food Sciences.* 2017. 7(3): 271-274.
48. Iryna Scorochod, Alla Roy, Ivan Kurdish. Antioxidant Potential of the Phosphate-Mobilizing Bacteria *Bacillus subtilis* IMV B-7023 and *Bacillus subtilis* IB-22. *J. Free Radicals and Antioxidants.* 2014; 141: 371-377.
49. Skorochod IO, Kurdish IK. [Antioxidant and antiradical activities of the culture medium of *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076]. Abstract of reports XV-th Congress of Vinogradskyi Society of Microbiologists of Ukraine. September 11-15, 2017. Odesa, 2017; 149. Ukrainian.
50. Iryna Scorochod, Alla Roy, Ivan Kurdish. Influence of Silica Nanoparticles on Antioxidant Potential of *Bacillus subtilis* IMV B-7023. *Nanoscale Research Letters.* 2016; 11: 1-6.
51. Skorochod IO, Kurdish IK. [Influence of Nanoparticles of Silica and Vermiculite on Activity of Enzymes of Antioxidant Defense] *Microbiol. Biotechnol.* 2013; (1): 59-67. Ukrainian.
52. Chobotarov AYu, Skorochod IO, Kurdish IK. [The influence of some nanomaterials and cations on superoxide dismutase activity of *Azotobacter vinelandii* IMV B -7076]. Abstract of reports XV-th Congress of Vinogradskyi Society of Microbiologists of Ukraine. September 11-15. 2017. Odesa. 2017; 157. Ukrainian.
53. Skorochod IO, Tserkovniak LS, Kurdish IK. [The antioxidant effect of *Bacillus subtilis* and *Azotobacter vinelandii* on the seeds of cereals]. *Microbiol. Z.* 2011; 73(1): 44-50. Ukrainian.

54. Skorochod IO, Roy AO, Melentiev OI, Kurdish IK. [Influence of Bioactive Substances of Phosphate-mineralising Strains of Genus *Bacillus* on Plant Seeds affected by Oxidative Stress]. *Microbiology and Biotechnology*. 2013; (2): 41-51. Russian.
55. Kurdish IK, Antonyk TS, Chuiko NV. Influence of Environmental Factors on the Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology*. 2001; 70(1): 91-95.
56. Chuiko NV, Gordienko AS, Kurdish IK. Chemotaxis and Growth of *Bradyrhizobium japonicum* in Presence of Fine-Dispersed Silica. *Microbiology*. 2006; 75(1): 44-47.
57. Chuiko NV, Kurdish IK. [The influence of high-dispersity Saponite and Silicone Dioxide on Chemotaxis of *Azotobacter vinelandii* SMV B-7076 and *Bacillus subtilis* IMV B-7023]. *Microbiol. Z.* 2017; 79(3): 36-43. Russian.
58. Kurdish IK, Chuiko NV, Bega ZT. Chemotactic and Adhesive Properties of *Azotobacter vinelandii* and *Bacillus subtilis*// *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010; 46(1): 51-56.
59. Chuiko NV, Gordienko AS, Kurdish IK. Chemotaxis of *Azotobacter vinelandii* and *Bacillus subtilis* in Mixed Culture. *Microbiology*. 2013; 82(2): 186-189.
60. Kurdish IK, Bega ZT, Gordienko AS, Dyrenko DI. The Effect of *Azotobacter vinelandii* on Plant Seed Germination and Adhesion of these Bacteria to Cucumber Roots. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2008; (4): 400-404.
61. Kurdish IK, Bega ZT, Bulavenko LV, Dyrenko DI. [Features of adhesion of bacteria of the genus *Azotobacter*, strain *Bacillus subtilis* IMV B-7023 to the roots of plants and their colonization]. *Materials of the VI International Scientific Conference (Minsk, June 2-6, 2008, Vol.2) Minsk*. 2008: 121-123. Russian.
62. Declarative patent for invention №57269 A. [Method for obtaining granular bacterial preparation] Kurdish IK., Roy AO., Bega ZT. Published 18.06.2003. Bul. 6. Ukrainian.
63. Roy AO, Zaloilo OV, Chernova LS. [Antagonistic activity of phosphate-mobilizing bacilli to phytopathogenic fungi and bacteria]. *Agroecological Z.* 2005; (1): 50-55. Russian.
64. Roy AA, Pasichnyk LA, Tserkovniak LS et al. [Influence of Bacteria of *Bacillus subtilis* on the Agent of Bacterial Cancer of Tomatoes] *Mikrobiol. Z.* 2012; 74(5): 74-80. Russian.
65. Roy AO, Matselyukh OV, Zubko PD, Varbanets LD, Kurdish IK. [Proteolytic activity of phosphorous mobilizing bacteria of *Bacillus* genus and their influence on some phytophages]. *Agricultural microbiology*. 2014; 20: 66-73. Russian.
66. Zubko PD, Kurdish IK. [Features of the spatial distribution of bacteria-components of the complex preparation Azogran in the root zone of cucumber]. Abstract of reports XV-th Congress of Vinogradskyi Society of Microbiologists of Ukraine. September 11-15, 2017. Odesa. 2017; 60. Ukrainian.
67. Patent for invention №106135. [Method for obtaining a free-flowing complex bacterial preparation for plant growing]. Kurdish IK, Roy AO. Published 20. 07. 2014. Bul. 14. Ukrainian.
68. Melnikova N, Bulavenko L, Titova L, Kurdish I. [The influence of nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing bacteria on the formation and functioning of the legume-rhizobia symbiosis in soybean plants]. *Bulletin of the Lviv State Agricultural University. Agronomics*. 6. Lviv. 2002; 145-151. Ukrainian.
69. Kurdish IK. [Introduction of microorganisms in agroecosystems], *Naukova dumka*, Kyiv, 2010. Ukrainian.

70. Kurdish IK, Chuiko NV, Bulavenko LV, Direnko DI. [Efficiency of the introduction of granular bacterial preparations into the agroecosystem of flowering plants]. Collection of the Uman Agrarian University. The basis for the formation of productivity of agricultural crop with intensive cultivation technologies. -2008; 186-192. Ukrainian.
71. Chuiko NV, Bega ZT, Bulavenko LV, Kurdish IK. [Influence of bacterial preparation of complex action on decorative plants growth]. Microbiol. Biotech. 2010; (2): 43-50. Russian.
72. Shirokonos AM, Zvei YaP, Kurdish IK, Roy AO. The influence of granulated preparations on potat yield. Agroecological. Z. 2004; (3): 24-28. Ukrainian.
73. Kurdish I, Roy A, Chuiko N, Belogubova O, Bulavenko L, Bega Z, Dyrenko D, Chobotarjov A. [The application of granulated bacterial preparation complex action in a plant-grower]. Agroecological Z. 2008; June. 141-142. Ukrainian.
74. Skorokhod IO, Tserkovniak LS, Kurdish IK, Plotnikov VV, Gylchuk VG, Korniychuk OV. [Influence of granulated bacterial preparation complex action on the growth and yield of barley]. Mikrobiol. Z. 2012; 74(3): 23-28. Ukrainian.

Отримано 16.02.2018