

УДК 579.64:631.44

А.С. Гордиенко, Т.С. Антонюк, И.К. Курдиш

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев ГСП, Д 03680, Украина, тел.: 8 (044) 526 90 11,
e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

ВЛИЯНИЕ ГЛИНИСТЫХ МИНЕРАЛОВ НА АДГЕЗИЮ БАКТЕРИЙ – КОМПОНЕНТОВ ГРАНУЛИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА

*Глинистые минералы монтмориллонит и палыгорскит, которые применяются при получении гранулированных бактериальных препаратов, снижают адгезию клеток *Azotobacter vinelandii* и *Bacillus subtilis* к твердой поверхности (стекло). Следовательно, данные дисперсные минералы не будут препятствовать распространению бактерий в прикорневой зоне растений, куда вносятся микробные препараты с целью повышения продуктивности культурных растений.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: адгезия бактерий, глинистые минералы

Взаимодействие микроорганизмов с высокодисперсными материалами, в том числе с глинистыми минералами, обуславливает ряд явлений и эффектов, которые представляют интерес как в теоретическом, так и в практическом аспектах. Так, внесение твердых частиц в среду культивирования способствует во многих случаях возрастанию физиологической активности бактерий [11]. Глинистые минералы обеспечивают увеличение устойчивости клеток к повышенным температурам [7] и высушиванию [5].

Обработка суспензий микроорганизмов глинистыми минералами приводит к тому, что возрастает эффективность отделения клеток от дисперсионной среды [3, 5], т. е. имеет место снижение агрегативной устойчивости бактериальных суспензий. Учитывая тот факт, что в основе процессов коагуляции и адгезии лежат одни и те же физико-химические закономерности, представляло интерес изучить влияние глинистых минералов на прикрепление бактерий к твердым поверхностям. Необходимость данных исследований обусловлена тем, что глинистые минералы используются при получении гранулированных микробных препаратов [8]. Поэтому возникает вопрос о том не будут ли данные материалы способствовать прочному прикреплению клеток бактерий – компонентов этих препаратов к частицам почвы, что может повлиять на их миграцию в прикорневой зоне.

Материалы и методы

Объектами исследований служили штаммы бактерий *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 [10] и *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 [9]. Азотобактер выращивали на модифицированной среде Берка, г/л: $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ – 0,8; KH_2PO_4 – 0,2; натрий лимоннокислый – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0,2; $CaCl_2$ – 0,1; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0,015; $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 9 H_2O$ – 0,005; Na_2MoO_4 – 0,005; сахароза – 20, 0. Для культивиро-

А.С. Гордиенко, Т.С. Антонюк, И.К. Курдиш, 2009



вания бактерий *B. subtilis* использовали среду следующего состава, г/л: пептон — 10,0; NaCl — 3,0; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ и KCl по 0,3; KH_2PO_4 и $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ по 0,1; $MnSO_4$; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ по 0,001. Бактерии выращивали в условиях периодического культивирования на качалке (240 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 750 мл со 100 мл суспензии при 28 °С в течение 18 ч (*B. subtilis*) и 48 ч (*A. vinelandii*).

Клетки отмывали последовательно дважды дистиллированной водой и один раз фосфатным буфером (рН 7,0, ионная сила 0,05), в котором в дальнейшем проводили все исследования.

Использовали глинистые минералы монтмориллонит и палыгорскит Черкасского месторождения глин (Украина). Для исследований отбирали фракцию глин, частицы которой не оседают в процессе центрифугирования при 6000 g в течение 15 мин. Такие частицы имеют размеры значительно меньше 1 мкм и не видны в световой микроскоп. Использование данной фракции глинистого минерала в концентрации, не превышающей 500 мг/л, не изменяет оптическую плотность суспензии бактерий при внесении в нее дисперсного материала.

Адгезию бактерий исследовали в расположенных вертикально колонках диаметром 16 мм, которые содержали по 15 г стеклянных гранул размером 1 — 2 мм. Суспензию бактерий предварительно смешивали с суспензией глинистого минерала, выдерживали 30 мин., и по 7 мл полученной смеси вносили в колонки, обеспечивая слой носителя полным покрытием водной фазой.

Концентрация клеток в суспензии составляла: *B. subtilis* — $1,0 \cdot 10^9$ кл/мл, *A. vinelandii* — $2,5 \cdot 10^8$ кл/мл. После контакта с адсорбентом в течение 2 ч суспензию сливали и по разности в оптической плотности суспензии бактерий до и после взаимодействия с носителем рассчитывали количество клеток, сорбировавшихся на 1 г стеклянных гранул.

Электрофоретические исследования проводили на установке для микроэлектрофореза [1]. Готовили три типа образцов: 1 — суспензия клеток (контроль 1); 2 — суспензия глинистого минерала (фракция частиц размером 1 — 5 мкм) — контроль 2; 3 — суспензия клеток бактерий, в которую внесен глинистый минерал (частицы высокодисперсной фракции размером меньше 1 мкм). В последнем случае после внесения в суспензию бактерий глинистого минерала образцы выдерживали в течение 15 мин. Концентрация клеток была постоянной - $1,0 \cdot 10^8$ кл/мл. Изменяли скорость электрофореза 50 клеток или частиц минерала и рассчитывали их электрофоретическую подвижность (ЭФП).

Результаты и их обсуждение

Установлено (рис.1), что глинистые минералы способствуют уменьшению количества клеток *A. vinelandii*, прикрепившихся к поверхности твердых частиц. Наблюдается также различие в степени снижения адгезии клеток в зависимости от типа глинистого минерала. Так, в присутствии палыгорскита имеет место незначительное (~ 25 %) уменьшение адгезионной способности бактерий при концентрации глины до 100 мг/л. Дальнейшее увеличение содержания данного минерала в суспензии не влияет на эффективность процесса прикрепления клеток. Внесение в суспензию бактерий монтмориллонита обеспечивает уменьшение адгезии во всей области изученных концентраций глинистого минерала и при его содержании 500 мг/л количество прикрепившихся клеток снижается по сравнению с контролем более чем в три раза.



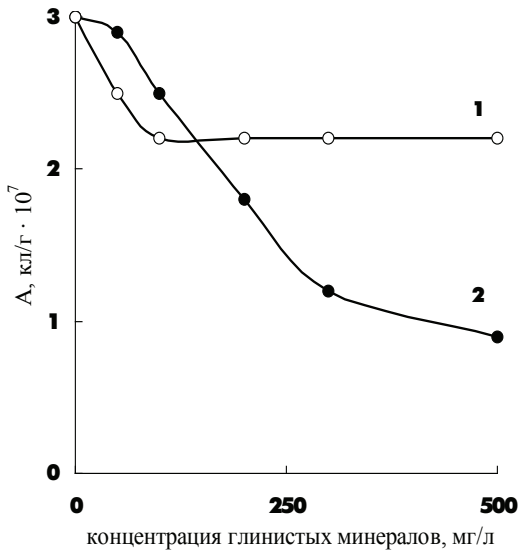


Рис.1. Количество адсорбированных клеток *Azotobacter vinelandii* (A) при внесении в суспензию бактерий глинистых минералов палыгорскита (1) и монтмориллонита (2)

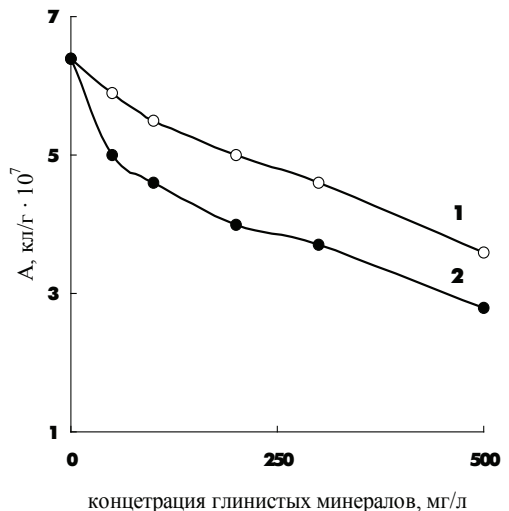
Fig. 1. Quantity of adsorbed *Azotobacter vinelandii* cells (A) at addition of clay minerals palygorskite (1) and montmorillonite (2) into bacterial suspension

Исследованные глинистые минералы отличаются по химическому составу, форме частиц, гидрофильно-гидрофобным свойствам [12] и электроповерхностным свойствам (рис.3). Поэтому установленное различие по влиянию этих материалов на процесс адгезии бактерий *A. vinelandii* можно было бы объяснить именно с этих позиций, но только в том случае если полученный эффект наблюдался и для другой культуры бактерий.

В то же время установлено (рис 2), что зависимости снижения адгезивной способности клеток *B. subtilis* к поверхности стекла для обоих глинистых минералов имеют однотипный характер. А именно, во всей изученной области концентраций глинистых минералов увеличение их содержания в суспензии бактерий приводит к постепенному уменьшению количества прикрепившихся клеток. Более того, палыгорскит эффективнее снижает адгезию бактерий данной культуры. Таким образом, вероятно, влияние глинистых минералов на процесс прикрепления клеток к адсорбенту обуславливается не только свойствами частиц глины, но также и особенностями строения поверхности бактерий.

Рис.2. Количество адсорбированных клеток *Bacillus subtilis* (A) при внесении в суспензию бактерий глинистых минералов монтмориллонита (1) и палыгорскита (2)

Fig. 2. Quantity of adsorbed *Bacillus subtilis* cells (A) at addition of clay minerals montmorillonite (1) and palygorskite (2) into bacterial suspension



Ранее было показано [6], что палыгорскит может оказывать различное влияние на адгезию некоторых метанотрофных бактерий. Так при концентрации этого минерала в суспензии бактерий *Methylomonas rubra* до 200 мг/л адгезия клеток к стеклу возрастала на 70 %. Дальнейшее увеличение содержания глинистого минерала обуславливало снижение его стимулирующего влияния на взаимодействие бактерий с твердой поверхностью. В то же время, для бактерий *Methylococcus capsulatus* ингибирующее действие глинистого минерала на адгезию клеток имеет место уже при низких концентрациях глины, аналогично эффекту, установленному для бактерий *B. subtilis* и *A. vinelandii*.

Авторами [6] было высказано предположение о том, что степень влияния глинистого минерала на процесс адгезии бактерий, очевидно, детерминирована способностью частиц глины к контактному взаимодействию с поверхностью клеток. Подобное предположение вполне обосновано, так как было установлено [2, 4], что наличие адгезии мелких частиц глины на поверхности бактерий определяет эффективность процесса коагуляции клеток и последующего их седиментационного отделения от дисперсионной среды.

Метод микроэлектрофореза позволяет установить наличие адсорбционного взаимодействия между клетками микроорганизмов и твердыми частицами [2, 13]. Одним из условий применения данного метода является наличие достоверного различия в электроповерхностных свойствах изучаемых объектов, т. е. различий в определяемой в эксперименте ЭФП бактерий и твердых частиц. В этом случае, если имеет место сорбция мелких частиц твердой фазы на поверхности клеток, ЭФП таких комплексов бактерия-дисперсный материал стремится (снижается либо увеличивается) к значению ЭФП дисперсного материала. Такая зависимость отражает процесс постепенного заполнения поверхности клеток сорбируемыми частицами при увеличении их концентрации в суспензии бактерий. Соответствие значения ЭФП клеток таковому частиц дисперсного материала указывает на образование на поверхности бактерий слоя из сорбированных частиц, что подтверждается данными электронной микроскопии [2,13].

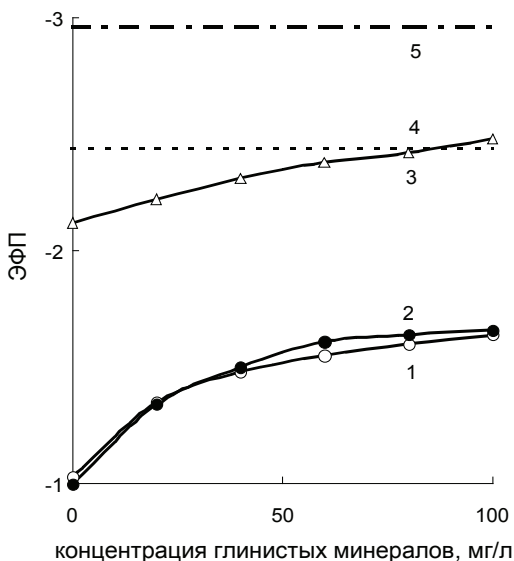


Рис.3. Электрофоретическая подвижность (ЭФП, $\mu\text{м} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) клеток *Azotobacter vinelandii* (1,2) и *Bacillus subtilis* (3) при внесении в их суспензию палыгорскита (1) и монтмориллонита (2, 3); ЭФП частиц палыгорскита (4) и монтмориллонита (5)

Fig. 3. Electrophoretic mobility (EPM) of *Azotobacter vinelandii* (1,2) and *Bacillus subtilis* (3) cells at addition of palygorskite (1) and montmorillonite (2, 3) into their suspension; EPM of palygorskite (4) and montmorillonite (5) particles

Результаты исследований, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что сорбция частиц как монтмориллонита, так и палыгорскита на поверхности клеток азотобактера незначительная. Об этом говорит тот факт, что даже при высоких концентрациях минералов (100 мг/л) бактерии не приобретают значений ЭФП, характерных для частиц глин. Слабо выражена адгезия частиц монтмориллонита и на поверхности бактерий *B. subtilis*. Несущественное различие в электроповерхностных свойствах палыгорскита и клеток данной культуры не позволило изучить методом микроэлектрофореза наличие адсорбционного взаимодействия между данными объектами исследования.

Таким образом установлено, что поверхность клеток *A. vinelandii* и *B. subtilis* имеет низкое родство к частицам глинистых минералов. Вероятно, это и является основной причиной ингибирующего действия дисперсных материалов на адгезию данных бактерий. А именно, глинистые частицы занимают активные центры сорбции на поверхности стекла и клетки контактируют уже непосредственно с частицами. Поскольку это взаимодействие незначительное, то и прикрепление бактерий на такой модифицированной поверхности снижается.

Следовательно, результаты проведенных исследований указывают на то, что монтмориллонит и палыгорскит, являющиеся основой при приготовлении гранулированных бактериальных препаратов, снижают адгезию клеток культур *A. vinelandii* и *B. subtilis* к твердой поверхности. При наличии достаточного количества водной фазы данные дисперсные материалы не будут препятствовать распространению бактерий в прикорневой зоне, куда собственно и вносятся гранулированные микробные препараты.

ЛИТЕРАТУРА

- Глоба Л. И., Гордиенко А. С. Установка для микроэлектрофореза // Мед. техника.- 1980.— № 2.— С. 50—51.
- Глоба Л. И., Гордиенко А. С., Гарбара С. В., Ротмистров М. Н. Взаимодействие бактерий с природным черкасским монтмориллонитом при разных значениях рН среды // Микробиол. ж.— 1983.— 45, № 2. — С. 22—26.
- Глоба Л. И., Никовская Г. Н. Влияние монтмориллонита на удаление микроорганизмов из воды при коагуляции // Химия и технология воды.- 1984. — 6, № 4.— С. 316—319.
- Гордиенко А. С., Глоба Л. И., Гвоздяк П. И. Удаление бактерий из воды после ее микробиологической очистки от ПАВ // Химия и технология воды.— 1986.— 8, № 5.— С. 43—45.
- Гордиенко А. С., Курдиш И. К., Краснобрижий Н. Я. Влияние глинистого минерала палыгорскита на выживаемость клеток бактерий при их обезвоживании // Микробиол. ж.— 1990.— 52, № 5.— С. 75—78.
- Курдиш И. К., Кигель Н. Ф. Влияние глинистого минерала палыгорскита на физиологическую активность и адгезию метанотрофных бактерий // Микробиол. Ж.— 1992. — 54, № 1.— С. 73—78.
- Курдиш И. К., Антонюк Т. С. Влияние глинистых минералов на жизнеспособность некоторых бактерий при повышенных температурах // Микробиол. ж.— 1999.— 61, № 3.— С. 3—8.
- Курдиш И. К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. Киев: КВЦ, 2001. — 140 с.
- Курдиш И. К., Рой А. О. Патент України № 54923 А. Штам бактерій *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального добрива для рослинництва. Опубл. 17.03.2003, Бюл. № 3.
- Курдиш И. К., Бега З. Т. Патент України № 72856 А. Штам бактерій *Azotobacter vinelandii* для одержання бактеріального добрива для рослинництва. Опубл. 15.04.2005, Бюл. № 4.
- Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. — М: Изд-во МГУ, 1987. — 256 С.
- Тарасевич Ю. И., Овчаренко Ф. Д. Адсорбция на глинистых минералах. — К.: Наукова думка, 1975.— 351 с.
- Marshall K. C. Studies by microelectrophoretic and microscopic techniques of the sorption of illite and montmorillonite to Rhizobia // J. Gen. Microbiol.—1969.— 56, N3.— P. 301—306.



УДК 579.64:631.44

А. С. Гордієнко, Т. С. Антонюк, І. К. Курдиш

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, ДСП, Д 03680, Україна, тел. 8 (044) 526 90 11,
e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

ВПЛИВ ГЛИНИСТИХ МІНЕРАЛІВ НА АДГЕЗИЮ БАКТЕРИЙ – КОМПОНЕНТІВ ГРАНУЛЬОВАНИХ ПРЕПАРАТІВ

Реферат

Глинисті мінерали монтморилонит та палигорскіт, які застосовуються для одержання гранульованих бактеріальних препаратів, зменшують адгезію клітин *Azotobacter vinelandii* і *Bacillus subtilis* до твердої поверхні (скло). Таким чином, дані дисперсні матеріали не будуть перешкоджати розповсюдженню бактерій в прикореневій зоні, куди вносяться мікробні препарати з метою підвищення продуктивності культурних рослин.

К л ю ч о в і с л о в а: адгезія бактерій, глинисті мінерали.

A. S. Gordienko, T. S. Antonyuk, I. K. Kurdish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, UNAS, Academ. Zabolotny str.,
154, Kiev, D 03680, Ukraine, tel: 8 (044) 526 90 11,
e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

INFLUENCE OF CLAY MINERAL ON BACTERIA ADHESION – THE COMPONENTS OF GRANULATED PREPARATION FOR PLANT GROWING

Summary

Clay minerals montmorillonite and palygorskite used in production of granulated bacterial preparation decrease adhesion of *Azotobacter vinelandii* and *Bacillus subtilis* cells to the solid surface (glass). Consequently the given dispersed minerals won't prevent the bacteria distribution in plant root zone, where the microbial preparations are introduced with the purpose of productivity raising of the cultivated plants.

К e y w o r d s: bacterial adhesion, clay minerals.

