



УДК: 579.24

**ВЛИЯНИЕ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*  
В БЕНТОНИТЕ НА ЕГО ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ****THE INFLUENCE OF *BACILLUS SUBTILIS* BACTERIA'S VITAL ACTIVITY  
IN BENTONITE ON IT'S CHEMICAL COMPOSITION****А.Л. Даудова, В.Х. Межидов  
A.L. Daudova, V.H. Mezhidov**

Грозненский государственный нефтяной технический университет им. акад. М.Д. Миллионщикова,  
НИЦКП Нанотехнологии и наноматериалы, Россия, 361051, г. Грозный, ул. К. Цеткин, 14/53

Grozny State Oil Technical University acad. M.D. Millionshtchikova,  
SRCCU Nanotechnologies and Nanomaterials, 14/53 Clara Zetkin St, Grozny, 361051, Russia

E-mail: nizkp@mail.ru

**Аннотация.** На поверхности твердой фазы, полученной после испарения воды из тонкодисперсной водной суспензии бентонита, обнаружены микроорганизмы *Bacillus subtilis*. Получены фотографии основных стадий их жизни в указанных активных коллоидах: прорастание спор, морфология клеток, их деление, образование спор, самосборки спор и бактерий, виды колоний.

Установлено решающее влияние дисперсности частиц этой глины в воде на популяцию микроорганизмов в бентоните. Показано существенное изменение химического состава бентонита колониями бактерий в следствие увеличения ими концентрации углерода. При этом микроорганизмы *Bacillus subtilis* способны снизить потребительские свойства гидроизоляционных слоев и буровых растворов, в которых длительное время взаимодействуют бентонит и вода. Указанное увеличение численности не патогенных бактерий *Bacillus subtilis* возможно при очистке воды и вин, а также в фармакологических и косметических препаратах, где бентонит обычно используется в качестве адсорбента.

**Résumé.** On a surface of the solid phase received after evaporation of water from a fine-grained aqueous slurry of bentonite, microorganisms *Bacillus subtilis* are found. Photos of the basic stages of their life in the specified active colloids are received: intergrowth of spores, morphology of cells, their division, formation of spores, self-assemblies of spores and bacteria, kinds of colonies.

In the specified experiences it is not possible to observe a bacterium if bentonite is replaced with other food – starch and sugar. It follows from this that in our experiments a bacterium does not arrive in the investigated sample from atmosphere or with water. The same result takes place, if bentonite particles in suspension have the dimensions of more than 5 microns. However, at the dimensions of these particles within 120–500 nanometers it is possible to observe all stages of life of microorganisms. We explain such defining influence of dispersity of particles of this clay on population of microorganisms to that the surface of spores of bacteria is densely occluded by the bentonite having the high adsorptivity and astringencies. Thus, growth of specific surface of a solid phase raises probability of that spore in diameter less than one microgauge will appear in a dispersion medium and its intergrowth will begin. Essential change of chemical composition of bentonite by bacterial clumps in a consequence of biological efflorescence of a mineral montmorillonit with the subsequent augmentations of concentration of Carboneum is shown in the table. Thus, microorganisms *Bacillus subtilis* are capable to reduce consumer properties of waterproofing courses and chisel solutions in which a long time bentonite and water interreact. The specified augmentation of number of not pathogenic bacteriums *Bacillus subtilis* is possible at water treatment and wines, and also in pharmacological preparations and cosmetics where bentonite is routinely used as adsorbent.

**Ключевые слова:** бентонитовая глина, суспензии, активные коллоиды, микроорганизмы, самосборка, колонии, химический состав.

**Key words:** bentonite clay, suspensions, colloids, active microorganisms, self-assembly, colony, chemical composition.

## Введение

Ежегодное мировое потребление бентонита превышает 10 миллионов тонн [ИнфоМайн, Москва, 2014]. Его большая набухаемость использована для производства буровых растворов, строительных гидроизоляционных матов и шнуров, а вяжущие свойства – для изготовления металлургических окатышей и литейных форм [Кононенко, 2009, Крупин, Трофимова 2010, Кубал, 2012]. На основе высоких адсорбционных свойств бентонита созданы катализаторы, лекарственные и косметические препараты [Акимбаева, Ергожин, 2007, Семененко, 2008, Везенцев, 2010, Кормош и др., 2011, Акимхан, 2013].

Указанные уникальные свойства обусловлены наноструктурой минерала монтмороллонит, который является основной составляющей этой глины [Овчаренко, 1961]. Нами обнаружены бактерии рода *Bacillus* в процессе экспериментов в тонкодисперсных водных суспензиях бентонита. Такие системы находятся в неравновесном состоянии и являются активными коллоидами [Арансон, 2013]. Учитывая обширное применение этого наноструктурного материала в различных отраслях, авторами данной работы ставится задача определить источник этих микроорганизмов, их морфологию, превращения на различных стадиях жизни и возможные при этом изменения химического состава и потребительских свойств бентонита.

### Объекты и методы исследования

Бентонитовую глину использовали месторождения Катаяма (Чеченская республика). К одному килограмму кусковой глины добавляли 10 литров дистиллированной воды и отстаивали в течение суток, периодически перемешивая. Затем водную суспензию пропускали через сито 80мкм и сушили 3.5 часа при температуре ~120°C. При этом получали пластины бентонита, их размалывали на шаровой мельнице Retsch PM 100 (Германия).

Активацию бентонита проводили в одно молярном растворе хлорида натрия и затем получали 1% водную суспензию, которую кипятили 10 минут в стеклянном лабораторном реакторе LENZ (Германия) при температуре 110°C. Далее суспензию охлаждали и центрифугировали при 2700 об/м на приборе CM-70M-09. После этого частицы бентонита имели размеры ~500 нм и более. Вторичным центрифугированием на приборе ЦЛМН-Р10-02 с более высоким фактором разделения (9 тыс. об/м.) получали тонкодисперсную суспензию с размерами частиц бентонита от 120 до 450 нм (рис. 1). Распределение частиц бентонита по размерам в водной суспензии исследовали методом фотонной корреляционной спектроскопии на приборе Horiba LB 550 (Япония). Концентрацию твердой фазы определяли на рефрактометре ИРФ-454Б2М. В работе использовались стерилизованная посуда и инструменты. Бентонит, использованный в опытах, имел индекс набухания 22 мл/2г и катионную обменную емкость 56.3 мг-экв/100 г.

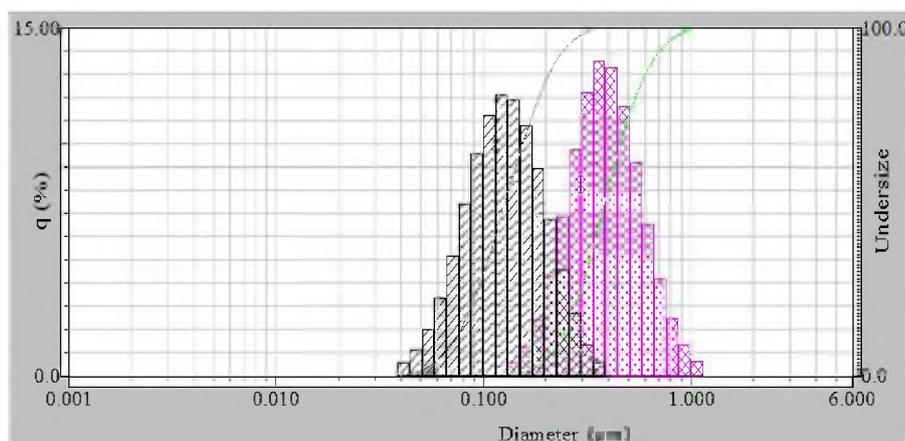


Рис. 1. Распределение частиц бентонита по размерам в суспензиях и интервал средних значений их диаметров  
 Fig. 1. Distribution of particle sizes of bentonite in the suspensions, and the interval average value of their diameters

Суспензию известной концентрации и размеров частиц микропипеткой DV 100 заливали в ячейку 2.0×2.0×1.0 см, на дне которой в качестве подложки располагали покровное стекло. Такие образцы коллоидов располагали в камере с заданной температурой. В них со временем в нижней части ячейки осаждались наночастицы бентонита, а над ними формировался слой воды. Далее происходит испарение воды с повышением концентрации растворенных солей и гелеобразованием из наночастиц бентонита. При этом катионный обмен между раствором и гелем увеличивает набухание наночастиц и повышает вероятность доступа раствора к спорам бактерий, о которых будет сказано ниже. За столбиком воды в этом активном коллоиде начинается испарение влаги из геля. После завершения процессов испарения воды доставали стекло – подложку, на которой сформировалась твердая фаза. Исследовали морфологию и химический состав полученного поверхностного слоя образца с помощью растрового электронного микроскопа Quanta 3D 200i, оснащённого системой энергодисперсионного микроанализа Genesis Apex 2 EDS от EDAX (США).

## Результаты и их обсуждение

При исследовании методами растровой электронной микроскопии образцов бентонита природных, или приготовленных после отмывки примесей, на их поверхностях не обнаруживаются частицы, напоминающие микроорганизмы. Оказалось, что редкие одиночные палочки, подобные бактериям, наблюдаются на поверхности слоя бентонита, который несколько недель был смочен водой и затем высушен. В питательной среде без участия бентонита, то есть состоящей только из крахмала, сахара и дистиллированной воды, прошедшей все указанные выше процессы подготовки образца, после испарения влаги при 25°C палочки не обнаруживаются. Из этого следует, что в процессе подготовки нами образцов суспензий бентонита не происходит поступление бактерий рода *Bacillus* из воды или атмосферы. Аналогичный результат дают водные суспензии без сахара и крахмала, в которых размер частиц бентонита более 10 мкм. Такая же суспензия, измельченная до 120–500 нанометров, после испарения воды, на оставшейся твердой поверхности имеет бактерии рода *Bacillus*. По литературным данным, размер спор этих бактерий менее одного микрона [Емцев, Мищустин, 2014]. Их поверхность может быть плотно закрыта бентонитом, так как он обладает хорошими адсорбционными и вяжущими свойствами. Указанные обстоятельства, видимо, осложняют индикацию спор в бентоните. Очевидно, в тонкодисперсной суспензии частицы бентонита имеют большую удельную поверхность. Это увеличивает вероятность того, что на поверхности частиц бентонита и в дисперсионной среде окажется некоторое количество, из возможных в глине, споров микроорганизмов. Концентрация солей *Na*, *Ca*, *K* и других в суспензии определяется химическим составом бентонита и его катионной обменной емкостью. По мере испарения воды из опытного образца концентрация солей в суспензии увеличивается. Это ведет к набуханию и к дальнейшему диспергированию частиц бентонита с увеличением вероятности появления в растворе новых спор. При этом, если в бентоните есть споры, то должен начаться процесс их прорастания вследствие активного синтеза белка и рибонуклеиновой кислоты (РНК). Такие частицы под действием архимедовой силы всплывают на поверхность воды и формируют различные фигуры самосборки.

На рисунке 2а представлена микрофотография диска, который сформировался на поверхности воды в процессе её испарения из образца и затем опустился на гель. В начале опыта столбик суспензии бентонита имел высоту 4 мм, средний размер частиц глины 300 нм, концентрацию менее 1% и температуру 25°C. Вокруг диска и под ним расположились на твердой поверхности бентонита микрокристаллы, выросшие из солей, которые обычно присутствуют в этой глине. На рисунке 2б показан фрагмент полученного диска. Видно, что диск образован в процессе самосборки прорастающих спор. По нашим данным, приведенным выше, источником спор является бентонит. В стадии прорастания спор происходит активный синтез белка и рибонуклеиновой кислоты, что приводит к увеличению их размеров до одного микрометра и более [Емцев, Мищустин, 2014]. На фотографии (см. рис. 2б), встречается немало спор, деформированных внутренним давлением, что указывает на наличие пленки, защищающей содержимое в объеме диска, где идет процесс прорастания бактерий [Мальцев, Мансурова, 2011]. Их питание прекратилось вследствие испарения воды до завершения лизиса или разрыва оболочки с выходом из неё ростовой трубки. Это состояние колонии спор зафиксировал и сохранил твердеющий гель тонкодисперсной суспензии. Как видно, использованный нами метод позволяет реализовать, и зафиксировать стадии жизни микроорганизмов.

На рисунке 2 представлен результат самосборки (в) и его увеличенный фрагмент (г), полученные при испарении воды из суспензии с размером частиц 400 нм и высотой столба 4 мм при температуре 30°C. Ветвистые самосборки образованы беспорядочным скоплением бактерий и наложением их друг на друга. Они также беспорядочно рассеяны на всей поверхности твердой фазы между скоплениями. На фрагменте (рис. 2г) хорошо видны палочковидные бактерии *Bacillus subtilis* с закругленными концами. Длина их 5–7 мкм, диаметр ~1 мкм, на одном конце палочки имеются тонкие (~20 нм) жгутики длиной в два-три раза большей, чем сами палочки. Вращательное движение жгутика обеспечивает движение клетки. Микроорганизмы всплывают на поверхность воды и начинают выделять межклеточный матрикс для создания биопленки с микрофлорой более устойчивой в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды. Одновременно с этим, в экспериментальном образце поверхность воды с колонией микроорганизмов, вследствие испарения, медленно опускается на гель бентонита, который, теряя воду, затвердевает и надежно фиксирует размеры, форму, ориентацию, положение каждого микроорганизма и

всей колонии. При этом колония в процессе осаждения повторяет кривизну рельефа твердой поверхности бентонита. Из представленного следует, что в природном бентоните имеются споры микроорганизмов, которые способны, при наличии питания, прорасти.

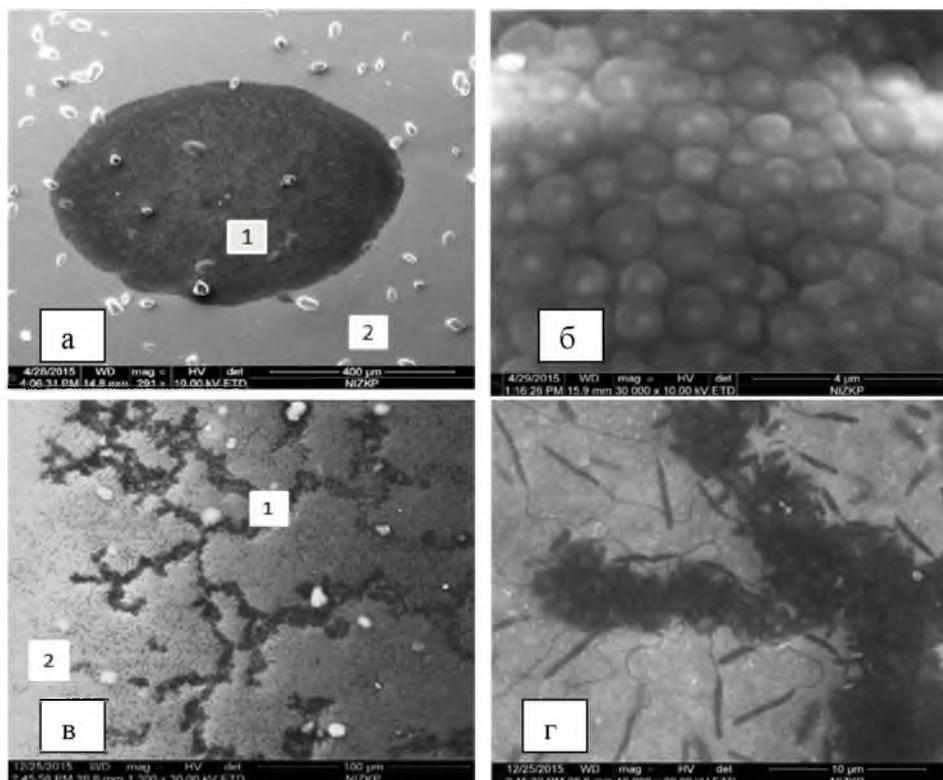


Рис. 2. Колонии бактерий и их спор на поверхности геля бентонита при различных увеличениях  
 Fig. 2. Colony of bacteria and it's disputes at different magnification

В таблице представлен химический состав товарного (улучшенного активацией) бентонита до и после появления колоний микроорганизмов, а также самих колоний, указанных на рисунке 2а и в.

Таблица  
 Table

**Химический состав в % массы поверхностей твердой фазы бентонита с бактериями и без них  
 The chemical composition in mass % of solids surfaces with bacterias and without its**

Химические элементы	Активный бентонит	Рисунок 2а		Рисунок 2в	
		Область 1 (со спорами бактерий)	Область 2 (без спор бактерий)	Область 1 (с активными бактериями)	Область 2 (без активных бактерий)
C	0.56	32.59	0.51	6.27	0.91
O	47.8	35.10	44.17	53.49	51.65
Na	1.27	2.96	2.84	3.30	3.20
Mg	1.37	0.37	1.43	1.84	1.57
Al	11.33	5.98	12.32	9.05	9.86
Si	25.7	14.59	27.63	19.2	25.43
P	-	0.81	0.29	0.7	0.20
Cl	0.40	1.09	1.30	0.58	0.8
K	3.09	1.79	2.80	1.41	1.91
Ca	0.83	0.20	0.32	1.02	1.12
Ti	0.57	0.23	0.47	0.14	0.29
Fe	6.85	3.90	5.42	2.43	2.72
Co	0.23	0.20	0.36	0.21	0.28

Из приведенного в таблице следует, что дискообразная фигура, образованная самосборкой спор в процессе их прорастания, имеет концентрацию углерода на 32% выше

по сравнению с остальной поверхностью опытного образца и товарным бентонитом. Повышение концентрации углерода до 6,3% наблюдается и в области скопления бактерий (рис. 2 в). Это указывает на то, что деятельность микроорганизмов в бентоните способна существенно изменить химический состав, а значит и его уникальные свойства.

На увеличенном изображении фрагмента (рис. 3б) диска, образованного палочками *Bacillus subtilis* (см. рис. 3а) видно, что в процессе опыта выросли палочки, и они начали делиться. Слабые силы взаимодействия между данными частицами, по сравнению с прорастающими спорами, располагают их на больших расстояниях друг от друга. Поэтому количество частиц на единице площади не высокое и круг, образованный ими, слабо обозначен. Следует отметить, что в наших экспериментах дискообразные самосборки бактерий встречаются часто, но они являются не единственными. На рисунке 3 представлены фотографии колоний в виде полосы (в) и фронта распространения (г) клеток *Bacillus subtilis* в стадии деления.

Повышение концентрации углерода для областей с бактериями, указанными на рис. 3 в, составило 4% для области 1, а на рис. 3 г – 3,6% для области 1 и 21% для области 3. Эти изменения химического состава бентонита происходили за сутки его взаимодействия с водой.

На рисунке 4 представлены две стадии формирования спор бактерий *Bacillus subtilis*. На микрофотографии 4а споры находятся в оболочке материнской клетки, и они имеют близкие диаметры, а представленные на – 4б смещены к концам клеток, которые деформированы или исчезли вследствие лизиса.

Механизм формирования колониями микроорганизмов различных фигур представляет самостоятельный физико-химический и биологический интерес.

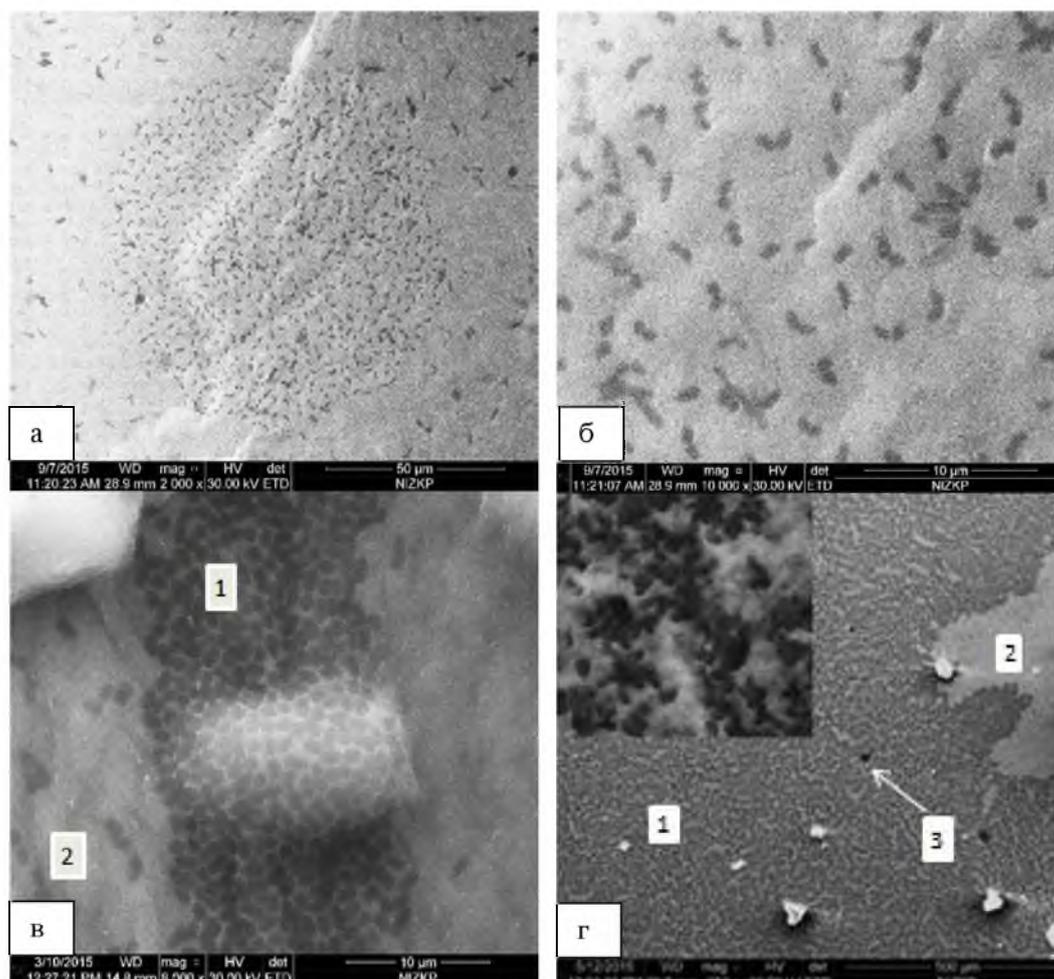


Рис. 3. Колонии бактерий в виде диска, полосы и фронта роста их численности  
Fig. 3. Colonies of bacteria as a disc, strip and the front of growth of their size

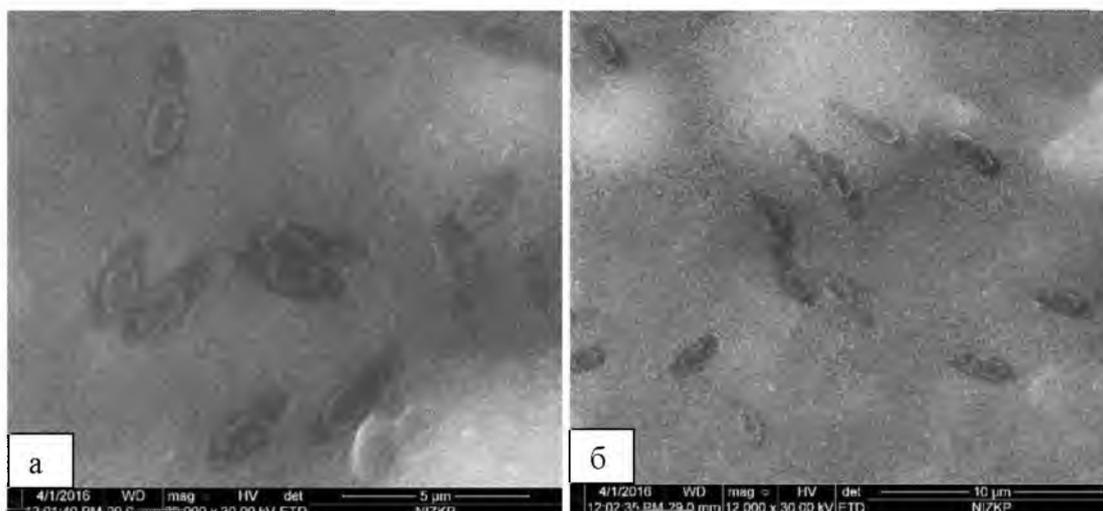


Рис. 4. Стадии формирования спор бактерий *Bacillus subtilis*  
Fig. 4. Stages of formation of spores of bacteria *Bacillus subtilis*

### Заключение

Для рассматриваемой задачи важным является установленный в данной работе факт наличия в бентоните спор бактерий *Bacillus subtilis*, способных при наличии воды в этой глине, прорасти, делиться, формировать колонии. В этих процессах идет активный синтез высокомолекулярных органических соединений (белков, РНК), матрикса. Он ведет к увеличению концентрации углерода в образце бентонита, так как в состав клеток микроорганизмов входит 50% углерода от массы сухого вещества [Емцев, Мишустин, 2014]. При недостатке питания наблюдается процесс спорообразования. Этот жизненный цикл микроорганизмов завершается существенным увеличением в бентоните концентрации углерода и незначительным изменением в нём концентрации других химических элементов, в том числе тех, которые являются источниками обменных катионов и влияют на адсорбционные и коллоидные свойства бентонита. Увеличение концентрации углерода в бентоните, на три десятка процентов, обусловленное синтезом микроорганизмами высокомолекулярных органических соединений (см. табл.), способно существенно изменить его потребительские свойства, используемые в различных областях.

Гидроизоляционные маты, шнуры и прочие слои бентонита в рабочем состоянии всегда имеют одну поверхность, смоченную водой. В ней будет десятилетиями происходить прорастивание спор, размножение бактерий и снижение со временем гидроизоляционных свойств, определяемых набухаемостью глины, примесями к воде и её температурой. Аналогичный процесс снижения набухаемости и потребительских свойств будет протекать в буровых растворах, где дисперсионной средой является вода.

Медицинские и косметические препараты, созданные для использования высоких адсорбционных свойств бентонита, при взаимодействии с водой, могут вызвать прорастивание спор и рост бактерий *Bacillus subtilis*, которые способны подавлять патогенные микроорганизмы. Это может обеспечить дополнительный лечебный эффект препаратов, содержащих бентонит.

### Список литературы References

1. Акимбаева А.М., Ергожин Е.Е. 2007. Оценка структурных и сорбционных характеристик активированного бентонита. Коллоидный журнал, 69 (4): 437–443.  
Akimbaeva A.M., Ergozhin E.E. 2007. Assessment structural and the sobtsionnykh of characteristics of the activated bentonite. Kolloidnyi Zhurnal [Colloid Journal], 69 (4): 437–443. (in Russian)
2. Акимхан А.М. 2013. Адсорбция полиакриловой кислоты и полиакриламида на монтмориллоните. Журнал физической химии, 87 (11): 1898–1903.



- Akimkhan A.M. 2013. Adsorption of the poly(acrylic acid) and polyacrylamide on montmorillonite. *Zhurnal Fizicheskoi Khimii* [Russian Journal of Physical Chemistry A: Focus on Chemistry], 87 (11): 1898–1903. (in Russian)
3. Арансон И.С. 2013. Активные коллоиды. *Успехи физических наук*, 183 (1): 87–101.  
Aranson I.S. 2013. The fissile colloids. *Uspekhi fizicheskikh nauk* [Advances in Physical Sciences], 183 (1): 87–101. (in Russian)
4. Везенцев А.И., Королькова С.В., Буханов В.Д. 2010. Текстурные характеристики и сорбционные свойства природной и магний-замещенной монтмориллонит содержащей глины. *Научные ведомости БелГУ. Естественные науки*, 11 (9): 119–123.  
Vezentsev A.I., Korol'kova S.V., Bukhanov V.D. 2010. Textural characteristics and getter properties natural and a magnesium – the containing clay replaced montmorillonite. *Nauchnye vedomosti BelGU. Estestvennye nauki* [Belgorod State University Scientific Bulletin. Natural sciences], 11 (9): 119–123. (in Russian)
5. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. 2014. *Микробиология*. Москва, 432.  
Emtsev V.T., Mishustin E.N. 2014. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. Moscow, 432. (in Russian)
6. Кононенко С.А. 2009. Технологические основы модифицирования бентонита Тарасовского месторождения для формовочных смесей. Дис. ... канд. тех. наук. Новочеркасск, 114.  
Kononenko S.A. 2009. *Tekhnologicheskie osnovy modifitsirovaniya bentonita Tarasovskogo mestorozhdeniya dlya formovochnykh smesey* [Technological bases of modifying of bentonite of the Tarasovsky field for forming mixes]. Diss. ... cand. tech. sciences. Novocherkassk, 114. (in Russian)
7. Кормош Е.Б., Алябьева Т.М., Погорелова А.Г. 2011. Химико-минералогические аспекты возможности использования глин белгородской области в разработке сорбентов для очистки сточных вод. *Фундаментальные исследования*, (8): 131–136.  
Kormosh E.B., Alyab'eva T.M., Pogorelova A.G. 2011. Chemical and mineralogical aspects of a possibility of use of clays of the Belgorod region in development of sorbents for a sewage disposal. *Fundamentalnye issledovaniya* [Fundamental research], (8): 131–136. (in Russian)
8. Крупин С.В., Трофимова Ф.А. 2010. Коллоидно-химические основы создания глинистых суспензий для промышленного дела. Казань, 411.  
Krupin S.V., Trofimova F.A. 2010. *Kolloidno-khimicheskie osnovy sozdaniya glinistykh suspenziy dlya promyshlennogo dela* [Colloid and chemical bases of creation of clay suspensions for the production business]. Kazan, 411. (in Russian)
9. Майкл Т. Кубал. 2012. Гидроизоляция зданий и конструкций: справочник строителя. Москва, Техносфера, 592.  
Maykl T. Kubal. 2012. *Gidroizolyatsiya zdaniy i konstruksiy: spravochnik stroitelya* [Waterproofing of buildings and designs: reference book of the builder]. Moscow, Tehnosfera, 592. (in Russian)
10. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. 2011. Что такое биопленка? *Практическая медицина. Педиатрия*, 5 (53): 7–10.  
Mal'tsev S.V., Mansurova G.Sh. 2011. What is a biofilm? *Prakticheskaya meditsina. Pediatriya* [Applied medicine. Pediatrics], 5 (53): 7–10. (in Russian)
11. Исследовательская группа ИнфоМайн. 2010. Обзор рынка бентонитовой глины и глинопорошка в СНГ. Москва, 190.  
Issledovatel'skaya gruppa InfoMayn 2010. *Obzor rynka bentonitovoy gliny i glinoporoshka v SNG* [The review of the market of bentonite clay and a dry mud in the CIS]. Moscow, 190. (in Russian)
12. Овчаренко Ф.Д. 1961. Гидрофильность глин и глинистых минералов. Киев, 275.  
Ovcharenko F.D. 1961. *Gidrofil'nost' glin i glinistykh mineralov* [Hydrophylic nature of clays and clay minerals]. Kiev, 275. (in Russian)
13. Семененко М.П. 2008. Фармакология и применение бентонитов в ветеринарии. Автореф. дис. ... докт. вет. наук. Краснодар, 48.  
Semenenko M.P. 2008. *Farmakologiya i primeneniye bentonitov v veterinarii: avtoref* [Pharmacology and use of bentonites in a veterinary medicine]. Abstract. diss. ... doct. vet. sciences. Krasnodar, 48. (in Russian)