

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

MĀLA, KERAMIKAS GRANULU UN BAKTĒRIJU  
MIJIEDARBĪBAS PĒTĪJUMI

Bakalaura darbs

Autors: Tatjana Griba

Stud. apl. Nr. tg08024

Darba vadītājs: Dr. biol., doc. Vizma Nikolajeva

Recenzents: Mag. biol. Ļaisana Šakirova

RĪGA 2011

## Saturs

Kopsavilkums .....	4
Ievads.....	6
1. Literatūras apskats .....	7
1.1. Šūnu imobilizācijas metodes .....	7
1.2. Mālu klasifikācija un īpašības .....	8
1.3. Šūnainā keramika jeb keramzīts .....	9
1.4. Adhēzija dabā .....	10
1.5. Adhēzijas process .....	10
1.6. Adhēziju ietekmējošie faktori.....	12
1.7. Adhēzijas izmantošana .....	13
1.7.1. Pesticīdu degradācija .....	13
1.7.2. Smago metālu saistīšana .....	14
2.0. Materiāli un metodes .....	15
2.1. Materiāli .....	15
2.1.1. Mikrobioloģiskās barotnes.....	15
2.1.2. Baktērijas .....	15
2.1.3. Reaģenti .....	15
2.1.4. Palīgmateriāli .....	16
2.1.5. Iekārtas.....	16
2.1.6. Keramikas granulas .....	17
2.1.7. Kosmētiskie māli .....	17
2.1.8. Neapstrādātie Latvijas māli .....	17
2.2. Metodes .....	18
2.2.1. Adhēzijas eksperimenti ar keramikas granulām .....	18
2.2.2. Adhēzijas eksperimenti ar māliem.....	19
2.2.3. pH un elektrovadītspējas mērīšana .....	19
2.2.4. Mālu mikrobioloģiskā sastāva izpēte.....	19
3.0. Rezultāti un diskusija.....	20
Secinājumi .....	29

Pateicības.....	30
Literatūras saraksts.....	31
Pielikumi	

## Kopsavilkums

Darbā tika pētīti gan neapstrādāti pulverveida māli, gan arī no dažāda veida māliem iegūtā šūnainā keramika. Eksperimentos tika noteikta pH, jonu spēka un biomasas koncentrācijas ietekme uz baktēriju adhēziju pie māla un šūnainās keramikas granulām. Noskaidrots, ka adhēzija notiek uz visām pētītajām granulām un māliem, kas iegūti no Liepas, Lodes un Prometeja atradnēm vai iegādāti veikalā, tomēr no pētītajiem šūnainās keramikas materiāliem tikai Lodes granulas ir piemērotas dzīvu šūnu imobilizācijai. Prometeja mālu granulām ūdens vidē piemīt baktericīda iedarbība. Tā ir mazāk izteikta Liepas granulām, bet nepiemīt Lodes granulām. Darbā skaidroti baktericīdās iedarbības iespējamie mehānismi. Adhēzijas rezultāti pierādīja, ka mālu apstrādei ir būtiska ietekme uz adhēziju. Rezultāti liecina, ka no Latvijas māliem iegūtie keramikas materiāli ir daudzveidīgi, un tādēļ tiem ir plašas pielietošanas iespējas biotehnoloģijā.

Atslēgas vārdi: *Pseudomonas putida*, adhēzija, šūnainā keramika, māls.

## Summary

### **The *Pseudomonas putida* interactions with clay and expanded clay**

In this work, untreated clay obtained from different Latvian clay deposits and expanded clay was investigated. Influence of pH, ionic strength and biomass concentration on the bacterial adhesion was studied. The batch experiments were carried out in order to determine the number of viable counts of bacteria (colony forming units – CFU) in the presence and absence of clay granules in the incubation liquid as well as in the suspension recovered from surface of granules after four hours long incubation at 30 °C. It is estimated that adhesion occurs on all of the studied granules and clay, which are received from Liepa, Lode and Prometejs deposits or bought in the shop. The results show that only Lode granules are suitable for immobilization of living cell. Prometejs granules possess bactericidal activity in water medium. This effect is less expressed in Liepa granules but Lode granules don't show such influence at all. Possible mechanisms of the established bactericidal activity are described. The adhesion results show that clay treatment has influence on the bacterial adhesion. The results of the study suggest that Latvian clay and corresponding expanded clay materials are very different and therefore could be used in different fields of the biotechnology.

Key words: *Pseudomonas putida*, adhesion, expanded clay, clay.

## Ievads

Piesārņojums, ko rada cilvēka saimnieciska un rūpnieciska darbība, ir svarīgs jautājums pēdējās desmitgadēs. Augsnes un ūdens ir piesārņošana ar smagiem metāliem, pesticīdiem, rūpnieciskajām ķīmikālijām stipri ietekmē cilvēka un dzīvnieku veselību (Walker et al., 1967; Forstner et al., 1979; Gribbs et al., 1991; Grasman et al., 1998). Smago metālu mobilitāte pazemes vidē nosaka to mijiedarbība ar augsni, grunti, minerāliem un mikroorganismiem (Fowle et al., 2000). Daži pesticīdi, tādi kā hlorbenzols 1,2,4-TCB, nokļūstot augsnē un gruntsūdeņos spēj saglabāt savu aktivitāti vairākus gadu desmitus (Wenderoth et al., 2003). Viens no problēmu atrisināšanas veidiem ir vides attīrīšana izmantojot imobilizētu mikroorganismu metabolisku potenciālu (bioremediācija).

Viens no mikroorganismu imobilizācijas paņēmieniem ir adhēzija. Adhēzijas galvenās priekšrocības ir maksimāla šūnu dzīvotspēja un aktivitāte bioplēves veidošanās dēļ. Mikroorganismu imobilizēšanai izmanto dažādus neorganiskas un organiskas dabas materiālus, kā arī šo nesēju visdažādākās fizikālās formas. Mūsu pētījumi bija saistīti ar Latvijas māliem un no tiem iegūtām šūnainās keramikas granulām.

**Darba mērķis:** Izvēlēties mikroorganismu imobilizācijai piemērotus mālus un šūnainās keramikas materiālus.

### **Darba uzdevumi:**

1. Noskaidrot mikroorganismu daudzumu dabiskos, sausus mālos.
2. Izanalizēt pH, NaCl un baktēriju koncentrācijas ietekmi uz baktēriju adhēziju pie dažādām šūnainās keramikas granulām.
3. Noskaidrot baktēriju adhēzijas spējas pie dabiskiem māliem.

Darbs izstrādāts LU Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcijā no 2010. gada septembra līdz 2011. gada maijam.

# 1. Literatūras apskats

## 1.1. Šūnu imobilizācijas metodes

Vārds „imobilizācija” no latīņu valodas tulkojams kā „nekustīgs”. Mikroorganismu imobilizācija ir skaidrojama kā mikroorganismu kustību apstādināšana, izmantojot atbalsta materiālus. No materiāliem un imobilizācijas metodēm ir atkarīga mikroorganismu dzīves kvalitāte, kas tieši ietekmē procesa efektivitāti, kurā mikroorganismi ir iesaistīti. Pastāv dažādi imobilizācijas veidi. Populārākie no tiem:

- Fizikāla ieslēgšana polimēros (iekapsulēšana)

Ar šķērssaistīšanas un fizikālās saistīšanas metodēm iespējams iegūt lielu šūnu koncentrāciju. Metodes trūkums ir barības vielu difūzijas ierobežojumi atbalsta materiāla dēļ, tāda kā gēla matrica.

- Kovalenta saistīšana pie polimēriem

Kovalentās saistīšanas metode ir kovalenta piesaistīšana pie virsmas, kas nodrošina stabīlu, pastāvīgu adhēziju. Saistošo ķīmikāliju, kuras izmanto šajā metodē, toksiskās dabas dēļ samazinās šūnu dzīvotspēja un biokatalītiskā aktivitāte (Klein and Wagner 1983 un Koziarz, 1998 cit. pēc Robledo-Ortiz et al., 2010)

- Adhēzija uz organisku un neorganisku materiālu virsmām

Adhēzija pie organiskiem un neorganiskiem materiāliem ir dabisks process. Metodes galvenā priekšrocība ir maksimāla šūnu dzīvotspēja un bioķīmiskā aktivitāte bioplēves veidošanās dēļ (pēc adhēzijas) (Robledo-Ortiz et al., 2010).

Imobilizēšanai izmanto visdažādākos materiālus: 1) neorganiskus: dabīgie (Al, Mg, Si) un apstrādātie (aktīvā ogle, keramika, ķieģeļi, stikls) (Zheng et al., 2001; Iwabuchi et al., 2003 Jost et al., 2010; Wang et al., 2010); 2) organiskus: polisaharīdi (agars, agaroze, algināts, celuloze, koksne), olbaltumvielas (kolagēns, želatīns), sintētiskie polimēri (poliakrilamīds, poliuretāns) (Absolom et al., 1983; Tao et al., 2009; Robledo-Ortiz et al., 2010). Pēdējā laikā ļoti populāri kļūst izmantot mālus augsnes bioremediācijā. Uz to norada vesela pētījumu virkne, kuros pārbauda dažādu mikroorganismu adhēzijas efektivitāti pie māliem, salīdzina mālu nesējus ar polimēru nesējiem, ievieto reaktorā, augsnē, ūdenī utt. (Chen et al., 2009;

Barros, et al., 2010; Lima de Oliveira et al. 2010; Wang et al., 2010). Tāda interese par konkrētu materiālu ir skaidrojama. Māli ir dabisks materiāls, kas ir lēts, plaši izplatīts un tiem nav nepieciešama speciāla utilizēšana. Turklāt atkarībā no mālu sastāva var piemeklēt gan porainību, mainot apdegšanas temperatūru, gan pH.

Izvēloties materiālu, nedrīkst aizmirst par to porainību. Pētījumi rāda, ka baktērijas labprāt izvēlas vidēja izmēra poras, jo lielās un dziļās porās barības vielu var nepietikt, savukārt nelielas poras ļauj gan izveidot labvēlīgu mikroklimatu, gan arī ļauj viegli baroties no substrāta. Poru lielums ietekmē arī materiāla svaru. Lielporains materiāls būs vieglāks nekā materiāls ar mazām porām un ūdens attīrīšanas procesā peldēs uz ūdens virsmas, savukārt materiāls ar ļoti mazām porām slīks. Vislabākais variants ir vidējais poru izmērs, jo šajā gadījumā materiāls atrodas tieši ūdenī. Materiāla svaram ir nozīme ūdens attīrīšanas procesā, savukārt augsnes attīrīšanā svars nav tik būtisks.

## **1.2. Mālu klasifikācija un īpašības**

Māli ir paši izplatītākie nogulumieži, kas veido lielāko daļu Zemes garozas augšējo horizontu (Kuršs u.c., 1997; Kuršs u.c., 1999). Tos apstrādājot plaši lieto dažādām nolūkiem: ražo būvmateriālus, traukus, kosmētiskus līdzekļus, lieto biotehnoloģiskos procesos.

Izņēmums nav arī Latvijas teritorijā, kur gandrīz visu periodu nogulumu satur mālainus iežus. Māli ir sīkdispersi nogulumieži, kuru galvenā sastāvdaļa ir mālu minerāli (Kuršs u.c., 1997; Kuršs u.c., 1999). Mālu minerāli ir hidratizēti lapu struktūrtipa alumosilikāti, no kuriem izplatītākie ir kaolinīts, illīts (hidrovizla), smektīts (montmorilonīts), hlorīts, vermikulīts, zeolīts, kas piešķir māliem virkni specifisku, tikai šiem iežiem raksturīgu īpašību (plasticitāti, lielas adsorbcijas un uzbriešanas spējas u.c.) (Kuršs u.c., 1997; Kuršs u.c., 1999).

Mālu kvalitāti un to izmantošanas iespējas nosaka mineraloģiskais un granulometriskais sastāvs. Ar kaolinītu bagāti māli satur maz kušņu un krāsojošo oksīdu, tiem arī piemīt liela ugunsizturība. Tīrus kaolinīta mālus lieto porcelāna, fajansa, papīra un gumijas rūpniecība. Smektītu māli izceļas ar augstām adsorbcijas spējām, tāpēc tos izmanto naftas produktu, dažādu eļļu, sulu, vīnu u.c. attīrīšanai. Šos mālus lieto arī urbšanas duļķēs. Illīta māli parasti bagāti ar kušņiem un krāsojošiem oksīdiem un izmantojami galvenokārt būvmateriālu rūpniecībā (Kuršs u.c., 1999). Pateicoties savām adsorbcijas, hidratācijas - dehidratācijas spējām zeolītu plaši izmanto lauksaimniecība un citas nozares. Aktīvi izmanto ūdens attīrīšanai, jonu apmaiņas procesos, būvmateriālu ražošanā (Ming et al., 1989; Mumpton 1999 pēc Raviv et al., 2002). Daudzi raksti liecina par zeolīta izmantošanu augsnes attīrīšanā



radioaktīvu atkritumu un smago metālu adsorbīcijai (Kapetanios et al., 1992; Rosen 1996; Chlopecka et al., 1997; Paasikallio, 1998; Krutilina et al., 2000 pēc Raviv et al., 2002). Vermikulīts ir ļoti viegls materiāls, ko apdedzinot paliek porains un ļoti trausls (Raviv et al., 2002).

Latvijā ieguvei piemērotā dziļumā māli atrodas devona, triasa, juras un kvartāra nogulumos, bet rūpnieciska nozīme plašāk ir tikai devona un kvartāra māliem. Abi mālu veidi sastāv galvenokārt no illīta (80-100 %), kaolinīta (līdz 20 %) ar hlorīta (5-10 %) piemaisījumu (Kuršs u.c., 1999).

Nozīmīgas Latvijas devona mālu atradnes ir Liepa (Lodes svīta), Kuprava (Katlēšu svīta) un Tūja (Burtnieku svīta). Atradrnēs dominē sarkanbrūni māli un aleirolīti ar smilšainiem starpslāņiem. Devona māliem ir raksturīgs samērā augsts brīvo dzelzs oksīdu un hidroksīdu saturs, kas piešķir māliem sarkanu krāsu. Savukārt kvartāra māli veidojās ledus laikmeta beigu posmā. Tie atšķirībā no devona māliem ir karbonātiskie, kas satur kalcīta un dolomīta piejaukumus. Sastāvam ir raksturīgs CaO (vidēji 8-9 %) un MgO (3,5 - 4 %). Nozīmīgākās kvartāra atradnes ir Prometeja, Kalnciema, Līvānu, Brocēnu, Nīcgales atradnes.

### **1.3. Šūnainā keramika jeb keramzīts**

Latvijā intensīvi notiek vietēju mālu pētīšana un keramzīta iegūšanas tehnoloģijas uzlabošana. Keramzītu iegūst apdedzinot Latvijas izcelsmes mālus pie augstām temperatūrām. Mālu uzpūšanās uzlabošanai izmanto dažādas piedevas: zāģu skaidas 3-5 masas %, eļļa 1-3 masas %, koksnes pulēšanas putekļi 1-5 masas %, kafijas sausna 3 masas %. Strauji ceļot temperatūru 1000-11500 °C intervālā atkarībā no mālu ķīmiskā sastāva, intensīvi izdalās gāzes. Tā kā apdedzināmais materiāls ir piroplastiskā stāvoklī, ko rada augstas viskozitātes šķidrās fāzes klātbūtne, tad gāzes saglabājas materiāla iekšienē un to uzpūš. Gāzes rodas mālu minerālu un piemaisījumos esošo karbonātu sadalīšanās rezultātā un oglekļa savienojumu klātbūtnē  $Fe_2O_3$  reducējoties par FeO un izdalot CO un skābekli (Bīdermanis et al., 2009). Bīdermanis (2009) raksta, ka mālu uzpūšanās koeficients ir atkarīgs no keramzīta iegūšanas temperatūras režīma, ka arī izmantoto piedevu veida un daudzuma. Piedevas nodrošina nepieciešamo oglekļa daudzumu, kurš veicina  $Fe_2O_3$  reducēšanu par FeO. Vislabāko rezultātu dod piedevas, kuras strauji sadeg attiecīgajā izvēlētajā temperatūrā. No darbā izmantotajām piedevām tā ir eļļa. Uzpūšanas koeficientu arī stipri ietekmē  $Fe_2O_3$  daudzums. Ja tas ir pārāk zems, nepieciešams izmantot  $Fe_2O_3$  saturošas piedevas.

## 1.4. Adhēzija dabā

Mikrobioloģiskā adhēzija ir sākotnējs solis kolonizācijai un bioplēves veidošanai. Bioplēves sastāv no mikroorganismiem un ekstracelulāriem materiāliem.

Bioplēves var būt bīstamas gan cilvēkiem, gan industriāliem procesiem. Tās var izsaukt infekcijas, saistītas ar medicīniskiem implantiem, saistībā ar saimnieka šūnām, dentālo kariesu, pārtikas bojāšanos, paaugstinātu metāla koroziju, biofilmas veidošanos uz kuģu korpusiem un citus. Mikrobioloģiskā adhēzija var būt arī izdevīga, piemēram, bīstamu ķīmikāliju degradācijā augsnē un ūdenī, gāzes attīrīšanai, lauksaimniecībā gumiņbaktēriju izmantošanai rīzofērā, biopolimēru (celuloze) degradācijā, bioflokulācijā ogļu daļiņu šķīrošanai (Kapellos et al., 2007; Hori et al., 2009).

Bioplēves ir ārkārtīgi svarīgas mikroorganismiem, jo sadarbojoties baktērijas spēj ne tikai izveidot sev labvēlīgu mikroklimatu, bet arī pasargāties no apkārtējās vides ietekmes. Kompleksie mikroorganismu konsorcijs piešķir īpašas priekšrocības, kādu nav vienuļām baktērijām. Piemēram, mikroorganismu biofilmas var izturēt bīdes spēku, barības trūkumu, pH izmaiņas un ķīmisko vielu ietekmi. Baktērijām biofilmā ir labākas izdzīvošanas iespējas, īpaši stresa periodā, jo tās ir aizsargātas matricas ietvaros un var izmantot kopienas sadarbības priekšrocības (Jefferson 2004; Bhinu 2005; Singh et al., 2006).

Viena no tādām priekšrocībām ir kvorumā sajūtas signalizācija (QS). QS ir no šūnas uz šūnu signalizējoša sistēma, kas darbojas ar difūzu autoinduktoru (AI) signālmolekulu, kas regulē šūnu procesus atkarībā no mikroorganismu populācijas blīvuma (Ruiz et al., 2008). QS ļauj baktērijām koordinētu savu uzvedību. Tā kā vides apstākļi bieži strauji mainās, baktērijām nepieciešams ātri reaģēt, lai izdzīvot. Šīs atbildes ietver pielāgošanos barības vielu daudzumam, cīņu pret mikroorganismiem-konkurentiem un izvairīšanos no toksiskiem savienojumiem, potenciāli bīstamiem baktērijām. Patogēnām baktērijām ir svarīgi, inficējot saimnieka organismu, koordinēt savu virulenci, lai izvairītos no imūnreakcijas atbildes, lai varētu izveidot veiksmīgu infekcijas izplatīšanu (Bonnie 2006).

## 1.5. Adhēzijas process

Adhēzijas procesu izskaidro DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) teorija, kuras pamatprincipi ir aprakstīti zemāk.

No mikroorganismiem baktērijas ir galvenie biofilmas komponenti, 0,5-2 μm lieli, kuri ir novietoti tuvu viens otram. Baktēriju adhēziju skaidro ar DLVO teorijas palīdzību, kura

skaidro koloidālu daļiņu saistīšanos ar virsmu. Izejot no šīs teorijas, kopējas saistības starp virsmu un daļiņām ir van der Valsa un Kulona spēku mijiedarbības summa. No brīža, kad van der Valsa piesaistošs spēks ir dominants virsmas tuvumā, daļiņas nevar atdalīt no virsmas ar Brauna kustību, tāpēc adhēzija ir neatgriezeniska. Pirmais solis šūnu adhēzijai ir kad baktēriju šūna nonāk pie virsmas ar savu vai Brauna kustību un pielīp pie virsmas, un tas ir atgriezenisks process. Nākamajā solī baktēriju šūna izmanto nanošķiedras, tādas kā pili un flagellas, vai producē eksopolimēru substanci (EPS) (1. attēls.), kas var tikt cauri enerģētiskām barjerām, kas pastāv starp virsmu un baktēriju mazo izmēru dēļ, un sasaistīt šūnu un virsmu (Poortinga et al., 2002; Hori et al., 2010; Zoueki et al., 2010).



1. attēls. Bioplēves veidošanās – sukcesijas piemērs (Lawrence et al., 1995).

Figure 1. Biofilm forming process (Lawrence et al., 1995).

Baktēriju virsma ir strukturāli un ķīmiski heterogēna. Gramnegatīvajām baktērijām ārējā membrāna sastāv no lipīdu dubultslāņa, kas satur lipopolisaharīdu (LPS). Vairums ārējās membrānas proteīnu ir nevienmērīgi izvietoti membrānā, un daudzi no tiem veido šūnu piedēkļus.

LPS ir galvenais ārējās membrānas komponents gramnegatīvajām baktērijām. LPS nodrošina baktēriju šūnas strukturālo veselumu un aizsargā membrānas no ķīmiskām vielām. LPS arī palielina negatīvo lādiņu un palīdz stabilizēt kopējo membrānas struktūru. LPS ietekmē baktēriju sākotnējo adhēziju pie virsmām (Stewart et al., 2006; Hori et al., 2010).

Pili un flagellas ir tipiskie šūnu piedēkļi, kuru garums ir no simtiem nanometriem līdz dažiem mikrometriem. Pie šūnu piedēkļiem pieder arī fimbrijas, kas veido garas šķiedrainas struktūras, kuru diametrs ir no dažiem nanometriem līdz desmitiem nanometriem. EPS ir kapsulu polimēri - cieši saistīti pie šūnām; gļotas - necieši saistītas un šķīstošas ūdens vidē. Bioplēves struktūra ir atkarīga no EPS producēšanas, kas nodrošina bioplēves strukturālo atbalstu. EPS satur 50-90 % no biofilmas organiskā oglekļa un ir bioplēves matricas galvenais

materiāls. Eksopolimēri sastāv no polisaharīdiem, proteīniem, nukleīnskābēm, lipīdiem un citām makromolekulām. EPS matrica, kas tur mikroorganismus kopā bioplēvē, ir atbildīga par adhēziju (Tsuneda et al., 2004; Hori et al., 2010). Neskatoties uz acīmredzamu eksopolimēru piedalīšanos adhēzijas procesā, zinātniece Gomez-Suarez (2002) konstatēja, ka adhēzijā uz cietām virsmām EPS neproducējošas *Pseudomonas aeruginosa* SG81R1 bija labākas nekā EPS producējošas *P. aeruginosa* SG81. Pat šodien EPS loma adhēzijā uz cietām virsmām ir izpētīta tikai daļēji, eksopolimēru heterogēnās dabas dēļ (Tsuneda et al., 2004).

## 1.6. Adhēziju ietekmējošie faktori

Efektīva adhēzija ir veiksmīgas bioremediācijas garantija. Lai to panāktu, nepieciešams pievērst uzmanību dažādiem faktoriem. Pētījumā par baktēriju imobilizāciju uz agaves-polimēru kompozītiem tika pārbaudīti vissvarīgākie faktori, kas ietekmē adhēziju (Robledo-Ortiz et al., 2010). Eksperimentam tika izvēlēta *Pseudomonas putida*, kuras uzvedība arī tika novērtēta. Tika pārbaudīti sekojošie parametri:

- Jonu spēks

Pētījumā tika noskaidrots, ka gadījumā, ja baktēriju virsmai un materiāla virsmai ir vienāds lādiņš, adhēzija nenotiek, jo starp daļiņām darbojas atgrūšanās spēki. Lai panāktu adhēziju, ir nepieciešams palielināt saistošā šķidrums koncentrāciju (piemēram, NaCl), kas sekmēs daļiņu pievilksanos (sviestmaizes princips).

- Kontakta laiks un temperatūra

Noskaidroja arī to, ka kontakta laiks ir tieši saistīts ar temperatūru. Robledo-Ortiz et al. (2010) raksta, ka efektīvāka *Pseudomonas putida* adhēzija pie kompozītiem tika novērota 40°C ar kontakta laiku 5 h nekā 25°C ar kontakta laiku 5 h. No tā izriet, ka, jo augstāka temperatūra, jo mazāks kontakta laiks, un jo zemāka temperatūra, jo lielāks ilgāks kontakta laiks. Tas notiek tāpēc, ka paaugstinot temperatūru, paātrinās daļiņu kustība, un tas nozīmē, ka baktēriju piesaistīšanās pie virsmas arī notiek ātrāk.

- pH

Ar pH var mainīt baktēriju virsmas lādiņu, zinot izoelektrisko punktu vērtību. Izelektriskais punkts ir tāda pH vērtība, kad lādiņš ir neitrāls. Pazeminot pH vērtību, lādiņš būs pozitīvs, savukārt paaugstinot šo vērtību, lādiņš būs negatīvs. Eksperimentā tika pierādīts, ka pH <4 un >9 stipri pasliktina *P. putida* adhēziju pie kompozītiem, jo tādas pH vērtības inhibē šūnu augšanu un ārpusšūnu polimēru veidošanu, kas ir nepieciešams bioplēves veidošanai. Tika noskaidrots, ka pH ne tikai ietekmē pašu mikroorganismu adhēziju pie virsmas, bet arī

ietekmē baktēriju spēju piesaistīt metālus. Zheng et al. (2001) raksta, ka baktērijas *Bacillus subtilis* un *Mycobacterium phlei* spēja saistīt metālus Ca(II) un Mn(II), eksperimenta gaitā bija labāka pie pH 10 nekā pie pH 6.

- Biomasas daudzums (koncentrācija)

Baktēriju daudzums arī ietekmē adhēzijas laiku. Jo lielāks baktēriju daudzums, jo mazāks laiks ir nepieciešams baktēriju piesaistīšanai pie virsmas (Jacobs et al., 2007; Robledo-Ortiz et al., 2010).

## 1.7. Adhēzijas izmantošana

### 1.7.1. Pesticīdu degradācija

Bioremediācija mūsdienās ir ļoti populāra. Arvien vairāk un vairāk bakteriālo adhēziju izmanto vides attīrīšanai. Ļoti veiksmīgi notiek bioremediācija, piemēram, augsnes attīrīšana ar mikroorganismiem, izmantojot minerālus un minerālu kompozītus. Vērtīgi rezultāti tika iegūti augsnes atbrīvošanā no pesticīda izoproturona (IPU). Pētījuma gaitā augsnē tika atklāta dabiska mikrobioloģiska kopiena, kas veic izoproturona mineralizāciju. Pētījums pierādīja, ka šie mikroorganismi var veikt IPU mineralizāciju arī citās augsnēs. Šo mikroorganismu ienešana konkrētā augsnē notika ar keramzīta palīdzību (Grundmann et al., 2007). Līdzīgi no piesārņotas ar 1,2,4-trihlorbenzolu augsnes tika izolēta mikrobioloģiska kopiena, kura spēj mineralizēt 1,2,4-TCB. Tika noskaidrots, ka aktīvie mikroorganismi ir *Bordetella* sp. Izolētie organismi tika imobilizēti ar mālu granulu palīdzību un ievietoti piesārņotajā augsnē, kā rezultātā tika novērota efektīvāka 1,2,4-TCB mineralizācija (Wang et al., 2010). Veiksmīgi bija arī dažādu hlorfenolu, īpaši pentahlorfenolu (PCP) degradācijas eksperimenti, izmantojot imobilizētas *Comamonas testosteroni* (baktērijas tika izolētas no notekūdeņu attīrīšanas iekārtām). Pētījumā mikroorganismi tika imobilizēti uz organominerāla kompleksa (OMC), kas tika sagatavots no humīnskābes (organiskā daļa) un ceolīta (neorganiskā daļa). Abas kompleksa daļas ir dabiskas izcelsmes, un tādēļ tās droši var izmantot vidē. PCP biodegradācija tika pētīta trīs augsnēs – melnzemē, fluvisolā un regosolā. Darbā gaitā augsnes paraugus sterilizēja un pievienoja PCP un baktēriju izolātu, pēc tam augsnēs ievietoja arī OMC. Paraugi tika sagatavoti kā ar OMC, tā arī bez OMC, salīdzināšanai. Rezultāti parādīja, ka imobilizācijas efektivitāte ir atkarīga no humīnskābes koncentrācijas, PCP koncentrācijas un organiskā oglekļa satura augsnē. Tika konstatēts arī tas, ka organominerāla komplekss kopā ar *Comamonas testosteroni* paaugstina PCP degradāciju un šo metodi var izmantot augsnes attīrīšanā (Dercová et al., 2007).

### 1.7.2. Smago metālu saistīšana

Mikroorganismi ļauj ne tikai attīrīt vidi no pesticīdiem, bet arī no smagajiem metāliem. Eksperimenti pierādīja, ka baktērijām piemīt spēja saistīt metālus (White et al., 1995; Kretschmer et al., 2004; Kang et al., 2007; Yee et al., 2004 cit. pēc Chen et al., 2009) un ka tās var kalpot kā veidnes mineralizācijai (Beveridge, 1989; Ferris et al., 1986 cit. pēc Chen et al., 2009). Pat pēc nāves baktēriju šūnapvalki var palikt augsnē ilgstoši, jo autolītiskie fermenti, atbildīgie par apvalku sadalīšanu, ir inaktivēti ar smagajiem metāliem (Ferris et al., 1988 cit. pēc Chen et al., 2009). Lai paaugstinātu baktēriju spēju saistīt metālus, zinātnieki izdomā arvien jaunas metodes. Viena no tām ir mikroorganismu imobilizācija. Šajā virzienā tika veikti un turpinās pētījumi. Viens no tādiem pētījumiem tika veikts, lai noteiktu *Pseudomonas putida* CZ1, mālu un to kompozītu spēju akumulēt varu un cinku. Dažādas baktēriju un mālu (getīts, kaolinīts, smektīts un manganīts) kompozīcijas tika ievietotas šķīdumos ar atšķirīgām Cu un Zn koncentrācijām (0.025 mM un 0.5 mM). Eksperiments parādīja, ka māliem piemīt augsta afinitāte saistīt Cu un nedaudz zemāka afinitāte saistīt Zn salīdzinoši ar baktērijām. Analīze apstiprināja, ka lielākā daļa Zn no šķīduma tika saistīta ar kompleksu *P. putida* CZ1 + kompozīti. Šie rezultāti liecina, ka baktērijām ir liela nozīme smago metālu mobilitātē apkārtējā vidē (Chen et al., 2009). Līdzīgu eksperimentu ir daudz, pat agrākie pētījumi pierāda mikroorganismu īpašās spējas saistīt un reducēt metālus. Piemēram, citrātus izmantojošus celmus, tādus kā *Pseudomonas aeruginosa* un *P. putida* izolēja, jo tie spēj atbrīvot neorganisko fosfātu saturošu vidi no Cd, Zn, Cu, Fe, Co un Ni. Šiem mikroorganismiem ir potenciāls metālu citrāta atkritumu apstrādē (Thomas et al., 2000 pēc Gadd 2000). Sulfātus reducējošas baktērijas, kas tika izolētas no urāna raktuves sārņiem, pierādīja, ka spēj sorbēt Al (Hard et al., 1999 pēc Gadd 2000). Daudzi hipertermofili mikroorganismi var reducēt Fe (III), Mn (IV) un citus metālus pie 100 ° C, kā arī reducēt U(VI) līdz U(IV) uraninītam, Tc(VII) līdz Tc(IV). Šo organismu reducējošās īpašības var izmantot ar metāliem piesārņota ūdens attīrīšanā (Kashefi et al., 2000 pēc Gadd 2000).

## 2.0. Materiāli un metodes

### 2.1. Materiāli

#### 2.1.1. Mikrobioloģiskās barotnes

Universāla baktēriju barotne – Plate count agar (PCA, BioMerieux, Francija).

Sastāvs:

- 1) triptons - 5 g/L
- 2) rauga ekstrakts – 2,5 g/L
- 3) dekstroze – 1g/L
- 4) agars – 9 g/L.

Pagatavo: 17,5 g/ L dest. H<sub>2</sub>O, autoklāvē pie 1 atm. (121 °C) 20 min.

Iesala ekstrakta agars

- 1) Iesala ekstrakts (d=1,028)
- 2) Agars 2 %

Autoklāvē pie 1 atm. (121°C) 20 min.

R2A (baktēriju barotnes) sastāvs (Biolife, Itālija):

- 1) Rauga ekstrakts - 0,5 g/L
- 2) Proteozes peptons N3- 0,5 g/L
- 3) Kazaminoskābes – 0,5 g/L
- 4) Dekstroze - 0,5 g/L
- 5) Šķīstošā ciete – 0,5 g/L
- 6) Nātrija piruvāts – 0,3 g/L
- 7) Kālija difosfāts – 0,3 g/L
- 8) Magnija sulfāts - 0,05 g/L
- 9) Agars – 15,0 g/L

Pagatavo: šķīdina 18,15 g/L, autoklāvē pie 1 atm. (121°C) 20 min.

#### 2.1.2. Baktērijas

*Pseudomonas putida* LMKK 650

#### 2.1.3. Reaģenti

- 1) destilēts ūdens
- 2) PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

- 3) NaCl
- 4) Etilspirts
- 5) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 6) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

#### **2.1.4. Palīgmateriāli**

Vienreizējās lietošanas materiāli:

- 1) Petri plates, 9 cm diametrā
- 2) Ependorfa mēģenes, 1.5 ml
- 3) Pipešu uzgali
- 4) Centrifugēšanas mēģenes, 50 ml, „Falcon” (BD, Lielbritānija)

Daudzreizējas lietošanas materiāli:

- 1) Pipetes (200 un 1000 µl) „Finnpipette”
- 2) Špatele
- 3) Mikrobioloģiska cilpiņa
- 4) Spirta lampiņa
- 5) Stikla pudeles ar uzskrūvējamu vāku – 100 ml, 500 ml
- 6) Priekšmetstikliņi
- 7) Segstikliņi

#### **2.1.5. Iekārtas**

Elektriskais maisītājs „Mikro-spin” (Biosan, Latvija)

Autoklāvs „Sanyo MLS – 3781L” (Japāna)

Termostats „Binder KB 53” (Vācija)

Centrifūga „Eppendorf 5804R” (Japāna)

Spektrofotometrs „Amersham Biosciences Ultrospect 3100 pro” (Vācija)

pH metrs „Adrona AD 1405” (Latvija)

Mikroskops „Leica BME” (Vācija)

Elektroniskie svāri „Kern 440-33N” (Adrona, Latvija)

Kratītājs

Elektrovadītspējas mērītājs PWT HI98308 (Hanna Instruments, Maurīcija)



### 2.1.6. Keramikas granulas

Darbā tika izmantotas prof. V. Švinkas vadībā RTU Silikātu materiālu institūtā pagatavotās un raksturotās keramikas granulas (1. tab.).

1. tabula  
Šūnainās keramikas granulu raksturojums

Table 1

The characteristic of expanded clay granules

Granulas*	Diametrs, cm	Masa, g	Tilpummasa, g/cm <sup>3</sup>
Liepa 1150	1.3	1.5	1.30
Liepa 1200	1.4	1.5	1.05
Liepa 1175	1.2	1.2	1.57
Prometejs 1100	1.2	1.2	1.44
Prometejs 1150	1.2	0.5	0.45
Lode 1100	0.6	0.2	1.55

\* mālu atradnes nosaukums un granulu apdedzināšanas temperatūra, °C.

### 2.1.7. Kosmētiskie māli

Darbā tika izmantoti komerciālie kosmētiskie māli, nopirkti veikalā „Drogas”:

- 1) Baltie kosmētiskie māli „Nature DNC” (Krievija). Sastāvā pamatkomponents: kaolīns
- 2) Melnie kosmētiskie māli „Nature DNC” (Krievija). Sastāvā pamatkomponents: baltais kaolīns
- 3) Zilie kosmētiskie māli „Nature DNC” (Krievija). Sastāvā pamatkomponents: montmorilonīts
- 4) Rozā kosmētiskie māli „Nature DNC” (Krievija). Sastāvā pamatkomponents: hestorīts

### 2.1.8. Neapstrādātie Latvijas māli

Liepas „pelēkie”, Devona māli

Lielauces „pelēkie”, Kvartāra māli

Liepas „sarkanie”, Devona māli

Sausus mālus saņēmām no RTU Silikātu materiālu institūta.

## 2.2. Metodes

### 2.2.1. Adhēzijas eksperimenti ar keramikas granulām

Adhēzijas eksperimenti tika veikti 100 ml tilpuma stikla pudelēs (Simax, Čehija). Pudelēs tika iesvērts pa 15 g keramikas granulu, un granulas kopā ar traukiem tika nosterilizētas autoklāvā ar karstu tvaiku, 121 °C 15 min.

Uzsākot eksperimentu, granulas pudelēs tika aplietas ar 50 ml sterila destilēta ūdens. Atsevišķi tika sagatavota baktēriju *P. putida* suspensija un pievienota aplietajām granulām līdz OD<sub>540</sub> 0.05-0.06 (*Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences*). Lai noteiktu baktēriju koncentrāciju, t.i., kolonijas veidojošo vienību (kvv) daudzumu mililitrā, tika gatavota baktēriju suspensijas 10-kārtīgu atšķaidījumu sērija (no 1:10 līdz 1:10<sup>7</sup>) un no katra atšķaidījuma pa 0.1 ml uzsēts uz Petri traukiem ar PCA barotni. Pēc divu dienu ilgas inkubācijas 20±2 °C tika saskaitītas uz Petri traukiem izaugušās *P. putida* kolonijas un aprēķināts kvv daudzums mililitrā.

Sagatavotās pudeles tika inkubētas termostatā (Binder KB 53, Vācija) 30 °C temperatūrā, divas reizes stundā sakratot. Vienu un četras stundas pēc inkubācijas sākuma tika ņemti paraugi baktēriju koncentrācijas noteikšanai un izsēti uz PCA barotnes. Pēc četru stundu ilgušās inkubācijas šķidrums tika noliets no granulām, granulas tika divas reizes noskalotas ar PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) un pēc tam nelielā PBS tilpumā ar piestiņu sterili noberztas, lai atdalītu adsorbētās mikroorganismu šūnas. Arī šajā suspensijā tika noteikta baktēriju kvv koncentrācija, izsējot uz barotnes pa 0.1 ml no atšķaidījumu sērijas.

Lai noteiktu NaCl ietekmi uz adhēziju, eksperimentam tika sagatavoti paraugi, kur granulas „Liepa 1150” ūdens vietā tika aplietas ar ūdeni un ar dažādas koncentrācijas NaCl šķīdumiem: 200 mM, 100 mM, 50 mM, 10 mM, ar vienādu baktēriju šūnu blīvumu, kā arī attiecīgās kontroles – suspensijas bez granulām.

Lai noteiktu pH ietekmi uz adhēziju, tika izmantotas granulas “Lode 1100” un 100 mM Na fosfāta buferšķīdumi ar pH 5, 6, 7 un 8.

Lai noteiktu baktēriju koncentrācijas ietekmi uz adhēziju, darbam tika izvēlēta šūnainā keramika „Liepa 1175” un sagatavoti 4 paraugi ar atšķirīgām baktēriju šūnu koncentrācijām un attiecīgās kontroles (baktēriju suspensijas bez granulām). Vislielākais baktēriju suspensijas OD<sub>540</sub> bija 1,452 un vismazākais OD<sub>540</sub> 0,023.

### 2.2.2. Adhēzijas eksperimenti ar māliem

Adhēzijas eksperimenti tika veikti 100 ml tilpuma stikla pudelēs (Simax, Čehija). Pudelēs tika iesvērts pa 15 g četri veidi kosmētikas pulverveida mālu un Latvijas neapstrādāto mālu. Māli kopā ar traukiem tika nosterilizēti autoklāvā ar karstu tvaiku, 121 °C 15 min.

Uzsākot eksperimentu, māli pudelēs tika aplieti ar 50 ml sterila destilēta ūdens. Atsevišķi tika sagatavota baktēriju *P. putida* suspensija un pievienota aplietajām granulām līdz OD<sub>540</sub> 0.05-0.06. Lai noteiktu baktēriju koncentrāciju, tika gatavota baktēriju suspensijas 10-kārtīgu atšķaidījumu sērija (no 1:10 līdz 1:10<sup>7</sup>) un no katra atšķaidījuma pa 0.1 ml uzsēts uz Petri traukiem ar PCA barotni. Pēc divu dienu ilgas inkubācijas 20±2 °C tika saskaitītas uz Petri traukiem izaugušās *P. putida* kolonijas un aprēķināts kvv daudzums mililitrā

Sagatavotās pudeles tika inkubētas termostatā 30 °C temperatūrā, divas reizes stundā sakratot. Vienu un četras stundas pēc inkubācijas sākuma tika ņemti paraugi baktēriju koncentrācijas noteikšanai un izsēti uz PCA barotnes. Pēc četrus stundu ilgušās inkubācijas šķidrums tika noliets no māliem, māli tika divas reizes noskaloti ar destilētu H<sub>2</sub>O (pudelēs ielēja tik daudz dest. H<sub>2</sub>O, cik nolēja, sakratīja, inkubēja 5 min, tālāk nolēja inkubācijas šķidrumu). Trešā reizē pievienotais H<sub>2</sub>O daudzums jau palika pudelē, tas tika sakratīts, inkubēts 5 min un tad suspensijā tika noteikta baktēriju kvv koncentrācija, izsējot uz barotnes pa 0.1 ml no atšķaidījumu sērijas.

### 2.2.3. pH un elektrovadītspējas mērīšana

Eksperimentos tika pārbaudīts pH līmenis. Mērījumi tika veikti pirms inkubācijas, pēc vienas un četrus stundu inkubācijas, izmantojot pH-metru AD-1405 (Adrona, Latvija).

Kontroles variantos bez baktērijām pēc vienas, četrus un 48 stundu ilgas inkubācijas tika mērīta elektrovadītspēja ar PWT HI98308 (*Hanna Instruments*, Maurīcija). Kontrolei un paraugu atšķaidīšanai izmantotā ūdens elektrovadītspēja bija 0.4 mS/m.

### 2.2.4. Mālu mikrobioloģiskā sastāva izpēte

Eksperimentā tika pārbaudīts mikroorganismu daudzums Latvijas neapstrādātajos mālos un veikalā „Drogas” nopirktajos kosmētiskajos mālos. Tika pētīti melnie, baltie, rozā, zilie kosmētiskie māli, kā arī Liepas „pelēkie”, Lielauces „pelēkie” un Liepas „sarkanie” māli. Pulverveida mālus (15 g) iebēra kolbā, ielēja 90 ml H<sub>2</sub>O, uzlika uz kratītāja un inkubēja 1h istabas temperatūrā, pēc tam gatavoja 10-kārtīgu atšķaidījumu sēriju (no 1:10 līdz 1:10<sup>7</sup>) un

no katra atšķaidījuma pa 0.1 ml uzsēja uz Petri traukiem ar R2A barotni un iesala agara barotni.

### 2.2.5. Datu statistiskā apstrāde

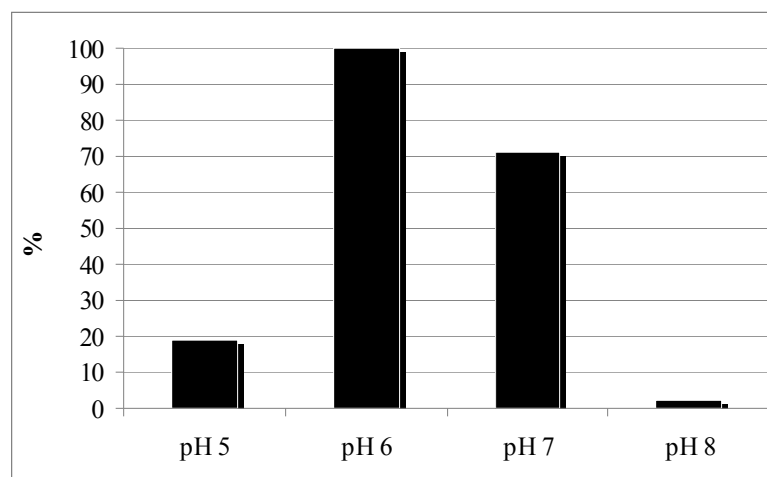
Eksperimenti veikti 1-3 atkārtojumos. Dati analizēti Microsoft Office Excel datorprogrammā. Statistiskā ticamība pārbaudīta ar Stjūdenta koeficientu. Par nozīmīgi atšķirīgām pieņemtās vērtības, kuru  $p$  ir mazāks par 0,05.

## 3.0. Rezultāti un diskusija

### 3.1. Baktēriju adhēzija pie keramikas granulām

Pētījumiem tika izvēlēta *P. putida* (5. pielikums), gramnegatīva nūjiņveida baktērija, kas ir pazīstama bioremediācijā ar savu spēju saistīt smagos metālus, degradēt pesticīdus, naftas produktus un citas organiskās vielas (Ward et al., 2006; Zoueki et al., 2010).

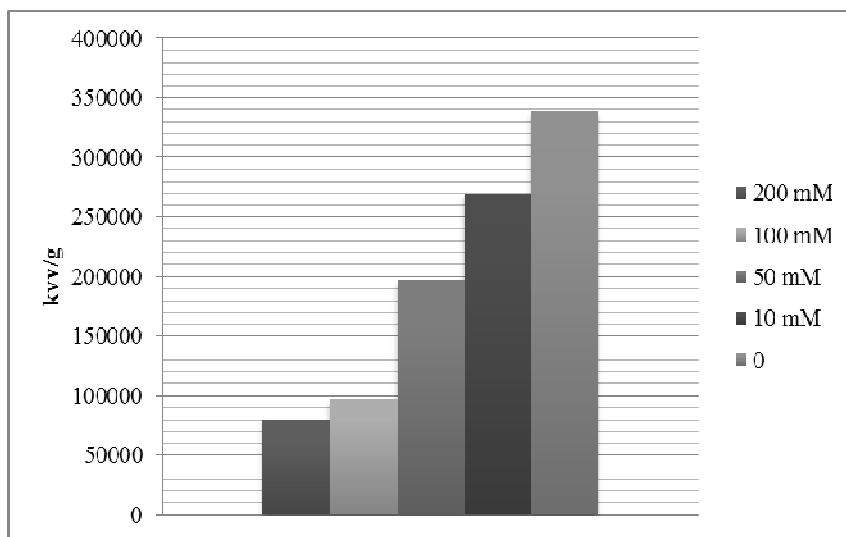
Tika pārbaudīta dažādu vides faktoru ietekme uz *P. putida* adhēziju pie šūnainās keramikas granulām. 2. attēlā redzams, ka adhēziju stipri ietekmē vides pH. Optimālais pH baktērijām ir 6. pH līmenis virs 7 *P. putida* nav piemērots, kā arī pH zem 6.



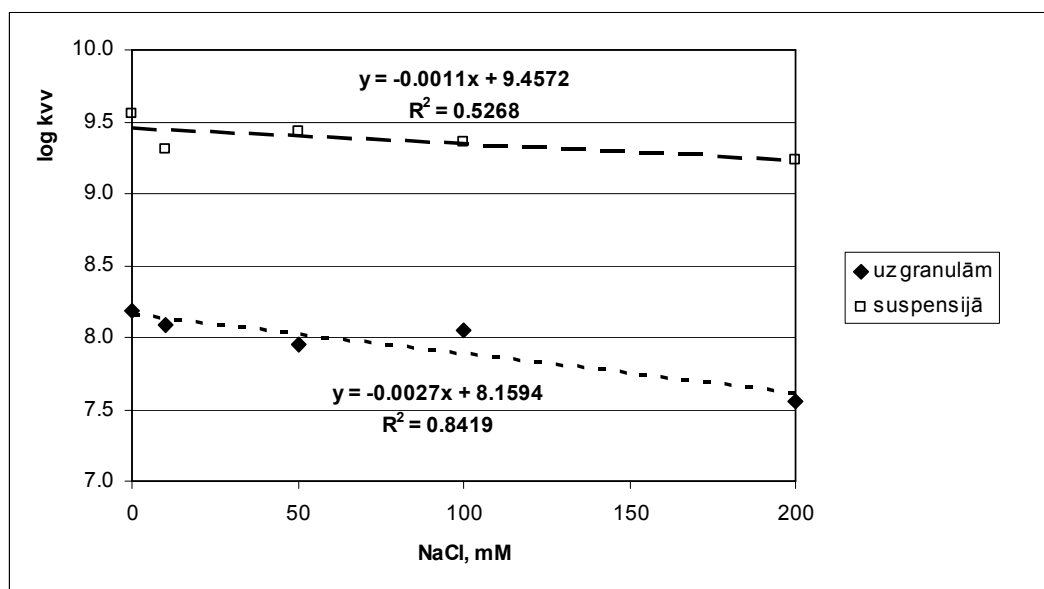
2. attēls. Baktēriju *P. putida* daudzums (%) uz „Lode 1100” granulām atkarībā no vides pH (100 mM Na fosfāta buferī).

Figure 2. Amount of *P. putida* (%) on „Lode 1100” granules in dependence of medium pH (100 mM Na phosphate buffer).

Eksperimentos tika pārbaudīta jonu spēka ietekme uz adhēzijas procesu. J. R. Robledo-Ortiz (2010) raksta, ka, palielinot saistošo šķīdumu daudzumu (mūsu gadījumā NaCl), palielinās arī adhēzija. Mūsu iegūtie rezultāti rāda (3. attēls), ka vislabākā adhēzija ir tieši paraugos bez NaCl. Palielinoties NaCl koncentrācijai, nedaudz samazinās dzīvotspējīgo baktēriju daudzums suspensijā, bet ievērojami samazinās uz granulām adhezēto baktēriju daudzums (4. attēls).



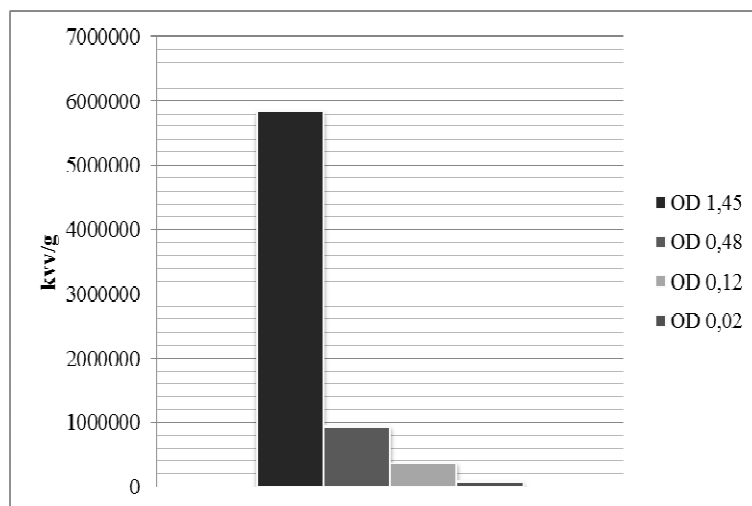
3. attēls. *P. putida* kvv/g izmaiņas atkarībā no NaCl koncentrācijas.  
Figure 3. The *P. putida* quantity changes according to NaCl concentration.



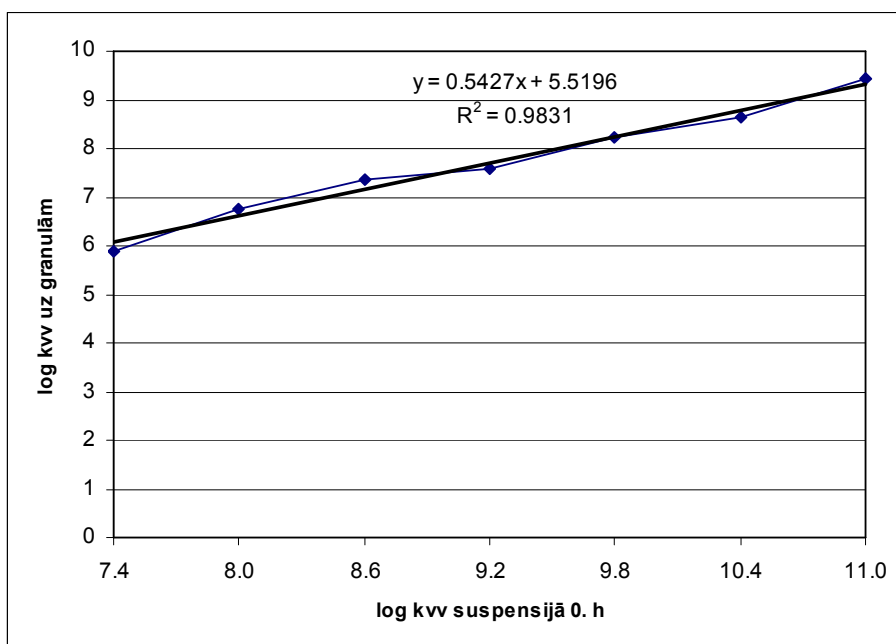
4. attēls. *P. putida* kvv daudzums suspensijā un uz granulām atkarībā no NaCl koncentrācijas vidē.  
Figure 4. Concentration of *P. putida* in the suspension and on the granules in dependence of the concentration of NaCl in the medium.

Pētījumos tika pārbaudīta baktēriju koncentrācijas ietekme uz adhēziju. Daudzos pētījumos rakstīts, ka biomasas koncentrācija stipri ietekmē adhēzijas procesu un ka, palielinot biomasu,

pieaug uz materiāla adsorbēto baktēriju šūnu skaits (Jacobs et al., 2007; Robledo-Ortiz et al., 2010). Mūsu eksperiments to apstiprināja. Par to liecina 5. attēls, kur ir redzams, ka vislielākais adsorbēto *P. putida* šūnu skaits ir suspensijai ar vislielāko blīvumu (OD 1,45). Novērojama cieša korelācija starp granulām pievienoto baktēriju koncentrāciju un baktēriju daudzumu uz granulām (6. attēls).



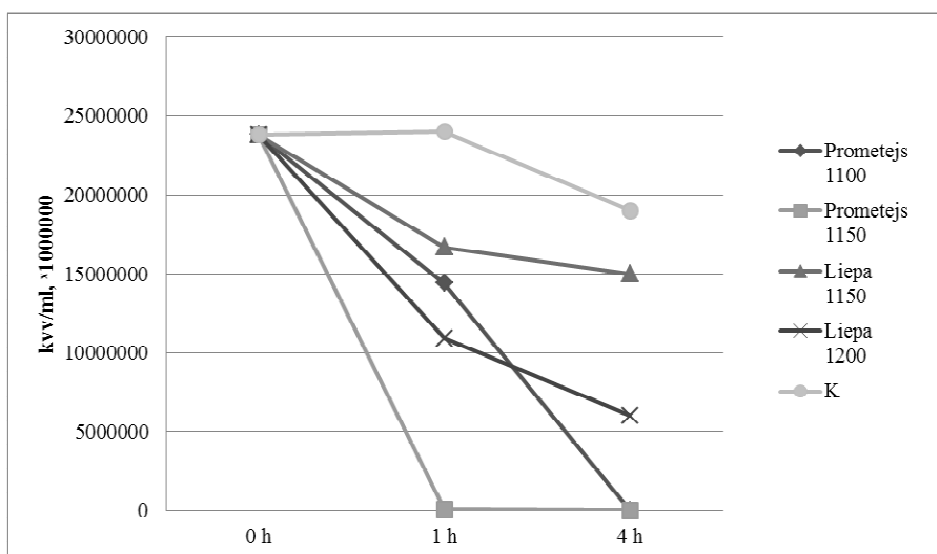
5. attēls. Adhēzijas efektivitāte atkarībā no baktēriju koncentrācijas.  
Figure 5. The efficiency of adhesion according to bacteria concentration.



6. attēls. Korelācija starp granulām pievienoto baktēriju koncentrāciju un baktēriju daudzumu uz granulām pēc 4 h ilgas inkubācijas.  
Figure 6. Correlation between initial bacterial concentration and amount of bacteria on the granules after 4 h incubation.

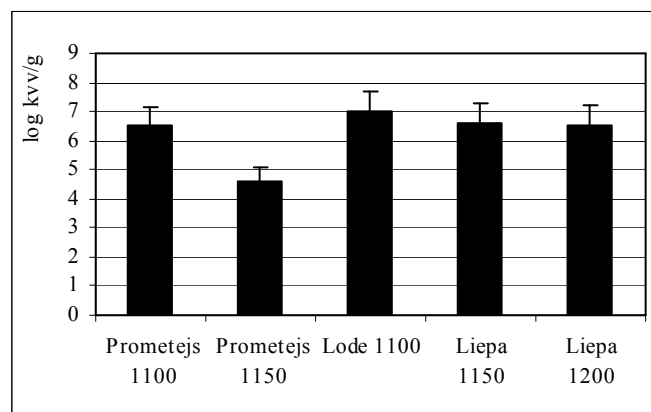
Veicot adhēzijas eksperimentus ar keramikas granulām, tika noskaidrots, ka dažādas granulas atšķirīgi ietekmē baktēriju adhēziju un dzīvotspēju. Dzīvotspēja ir atkarīga no granulu veida (sastāva, apstrādes temperatūras u.c. īpašībām) (7. attēls) un imobilizēšanas vides temperatūras. Granulu veids ietekmē arī uz keramikas granulām adsorbēto baktēriju daudzumu (8. attēls).

7. attēlā redzams, ka visos eksperimenta variantos baktēriju koncentrācija suspensijā ar laiku samazinās. Vislēnāk tas notiek kontrolē (ūdenī), bet visātrāk – vidē ar Prometeja granulām. Mūsu iegūtie dati par baktēriju daudzumu uz granulām (8. attēls) norāda, ka baktērijas tiešām ir adsorbējušās uz visām pētītajām granulām. Uz tām atrodas no 39 tūkstošiem (Prometejs 1150) līdz 10 miljoniem (Liepa 1100) baktēriju uz vienu gramu granulu masas, tomēr tas sastāda ne vairāk par 10 % no baktēriju kopskaita. Līdz ar to dzīvotspējīgo jeb kolonijas veidojošo baktēriju kopskaits atspoguļo to pašu 7. attēlā redzamo ainu, kas raksturo baktēriju kvv koncentrāciju suspensijā. Acīmredzot granulas izraisa baktēriju bojāeju. Tas notiek arī zemākā temperatūrā (20 °C) (Nikolajeva u.c. 2011), tikai ievērojami lēnāk.



7. attēls Baktēriju *P. putida* kolonijas veidojošo vienību (kvv) koncentrācijas izmaiņas suspensijā četrus stundas laikā 30 °C vidē ar dažādām keramikas granulām.

Figure 7. The bacteria *P. putida* concentration changes in suspension during four hours 30°C with different ceramic granules.

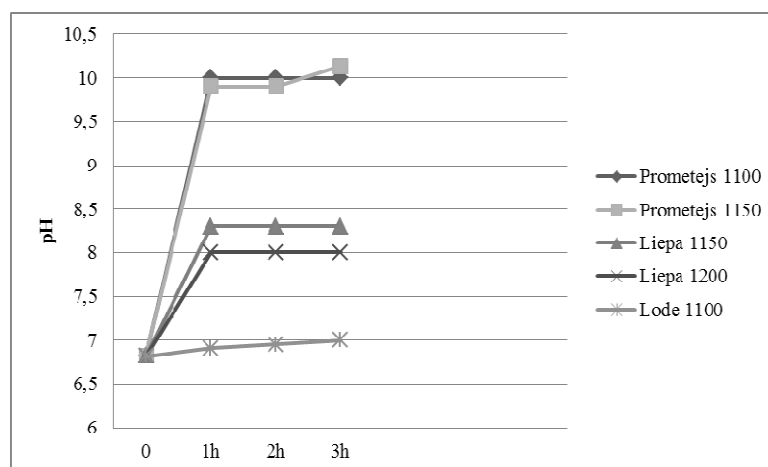


8. attēls. Uz keramikas granulām adsorbēto *P. putida* daudzums 30 °C, log kvv uz vienu gramu granulu ±S.D.

Figure 8. The quantity of adsorbed *P. putida* at 30 °C, log CFU/g ±S.D.

No Prometeja māliem iegūtās keramikas granulas iznīcina baktērijas ievērojami ātrāk nekā Liepas mālu granulas (7. attēls), turklāt parādās likumsakarība, ka, paaugstinoties granulu apdedzināšanas temperatūrai (par 50 °C), palielinās baktericīdais efekts. Tas attiecas gan uz Prometeja, gan arī uz Liepas mālu granulām.

Baktericīdā efekta izcelsmi mēģinājām noskaidrot, nosakot šķidrumu pH un elektrovadītspēju. Kā redzams 9. attēlā, jau pēc vienu stundu ilgas atrašanās sterilā ūdenī (30 °C) Prometeja mālu granulas ir paaugstinājušas tā pH no 6,8 līdz 10,0, Liepas mālu granulas – līdz pH 8,0-8,3, bet šķidrumā ar Lodes granulām pH paaugstinājies tikai par 0,2 un sasniedzis 7,0. Nolejot šo sārmaino ūdeni un uzlejot jaunu, Prometeja un Liepas mālu granulas arī atkārtoti pacēla ūdens pH līdz iepriekšminētajām vērtībām, un tāds pH saglabājās vismaz 20 stundas. Tik sārmaina vide neapšaubāmi izraisa *P. putida* un daudzu citu mikroorganismu pakāpenisku bojāeju.

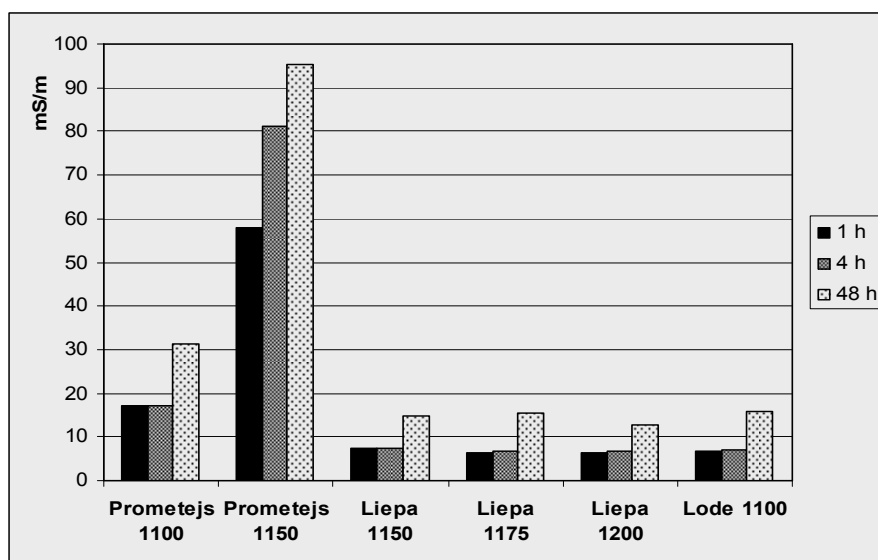


9. attēls. pH izmaiņas ūdenī ar keramikas granulām

Figure 9. pH changes in aqueous medium with ceramic granules



Lai iegūtu priekšstatu par jonu koncentrāciju granulu vidē, noteicām šķidrums elektrovadītspēju (10. attēls). Kā zināms, elektrovadītspēja raksturo ūdenī izšķīdušos jonus, taču tā neizsaka jonu precīzu koncentrāciju, jo ir atkarīga arī no jonu īpašībām, tai skaitā valences (Helfferich, 1995). Konstatējām, ka ir novērojama sakarība starp pH un elektrovadītspēju. Prometeja granulas ne tikai palielināja pH, bet palielināja arī ūdens vides elektrovadītspēju. Tādējādi varam secināt, ka eksperimentā izmantotās Lodes mālu granulas ir piemērotas mikroorganismu imobilizēšanai, bet Prometeja un Liepas mālu granulas šim mērķim nav izmantojamas. Var pētīt iespējas pielietot šādu keramikas granulu baktericīdās īpašības. Baktericīdu efektu skaidro Bīdermanis (2009), kurš raksta, ka veicot ķīmisko analīzi Prometejā mālos tika konstatēts augsts  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  saturs. Tehnoloģiskā procesā, temperatūras ietekmē  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  reducējoties par  $\text{FeO}$  un izdalot  $\text{CO}$  un skābekli. Liela  $\text{FeO}$  koncentrācija ir tas faktors, kas ietekmē baktēriju dzīvotspēju. Konstatēts, ka organiskās piedevas nodrošina nepieciešamo oglekļa daudzumu, kurš veicina  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  reducēšanu (Bīdermanis et al., 2009). No tā izriet, ka piedevas nomaiņa var uzlabot adhēzijas rezultātu.



10. attēls. Elektrovadītspēja ūdens vidē ar dažādām šūnainās keramikas granulām pēc vienas, četru un 48 stundu ilgas inkubācijas 30 °C. Izmantotā ūdens elektrovadītspēja 0.4 mS/m.

Figure 10. Electrical conductivity of water with different ceramic granules after one, four and forty four hours incubation.

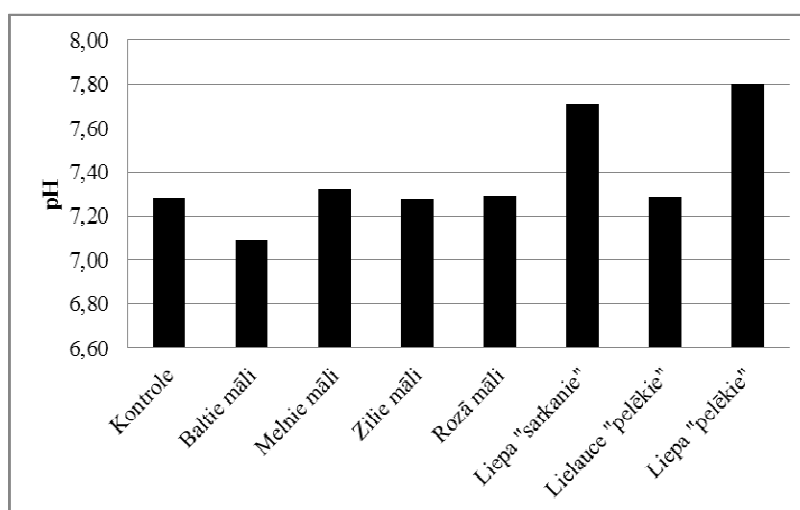
### 3.2. Baktēriju adhēzija pie māliem

Atkarībā no mālu īpašībām tos var pielietot dažādās nozarēs. Eksperimentos Latvijas izcelsmes māli (1.-3. pielikums) tika salīdzināti ar kosmētiskiem māliem no Krievijas (4. pielikums). Tika salīdzinātas pH izmaiņas vidē un *P. putida* adhēzijas efektivitāte.

Mūsu rezultāti rāda, ka baktērijas labāk adhezējas pie Latvijas izcelsmes māliem (12. attēls). Maksimāla adhēzija uz tiem ir 10 miljoni baktēriju uz gramu, savukārt baktēriju šūnu adsorbcija uz kosmētiskiem māliem (12. attēls) ir zemāka, maksimālā vērtība ir 60 tūkstoši baktēriju uz gramu. Salīdzinot kosmētiskos mālus ar Latvijas izcelsmes māliem (6.-7. pielikums), var redzēt, ka *P. putida* adhēzija pie Latvijas neapstrādātiem māliem Liepas „sarkanie” un Lielauces „pelēkie” ir gandrīz tāda pati kā pie rozā kosmētiskiem māliem, savukārt uz Liepas „pelēkajiem” ir tikai nedaudz lielāka adhēzija nekā uz zilajiem kosmētikas māliem.

Māli izmainīja ūdens vides pH. Mālu suspensijas pH bija robežās no pH 7,1 līdz 7,3 kosmētiskajiem māliem un no pH 7,3 līdz 7,8 Liepas un Lielauces māliem (11. attēls). Kā redzams, kosmētisko mālu pH vērtības ir tuvas šūnu fizioloģiskajai videi. To pašu var teikt arī par Liepas „pelēkajiem” māliem, bet Liepas „sarkanie” un Lielauces „pelēkie” māli padara vide ievērojami bāziskāku.

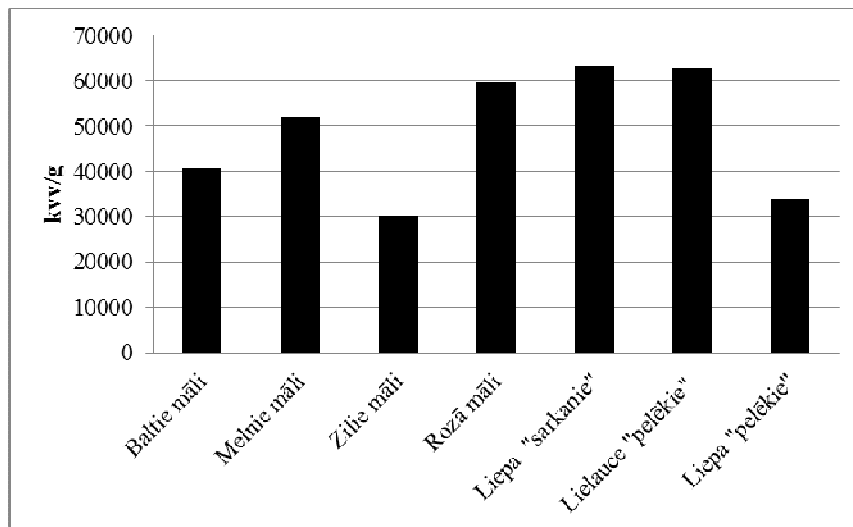
Salīdzinot 11. un 12. attēlu, nav novērojama tieša sakarība starp mālu pH un baktēriju adhēziju uz tiem. Acīmredzot noteiktā pH vērtību intervālā (vismaz līdz pH 8) adhēziju stiprāk ietekmē citas mālu īpašības.



11. attēls. pH *P. putida* suspensijā ar dažādiem mālu veidiem pēc 4 h inkubācijas.

Attēlotas vidējās pH vērtības, iegūtas no diviem eksperimentiem.

Figure 11. pH changes in *P. putida* suspension with different types of clay.

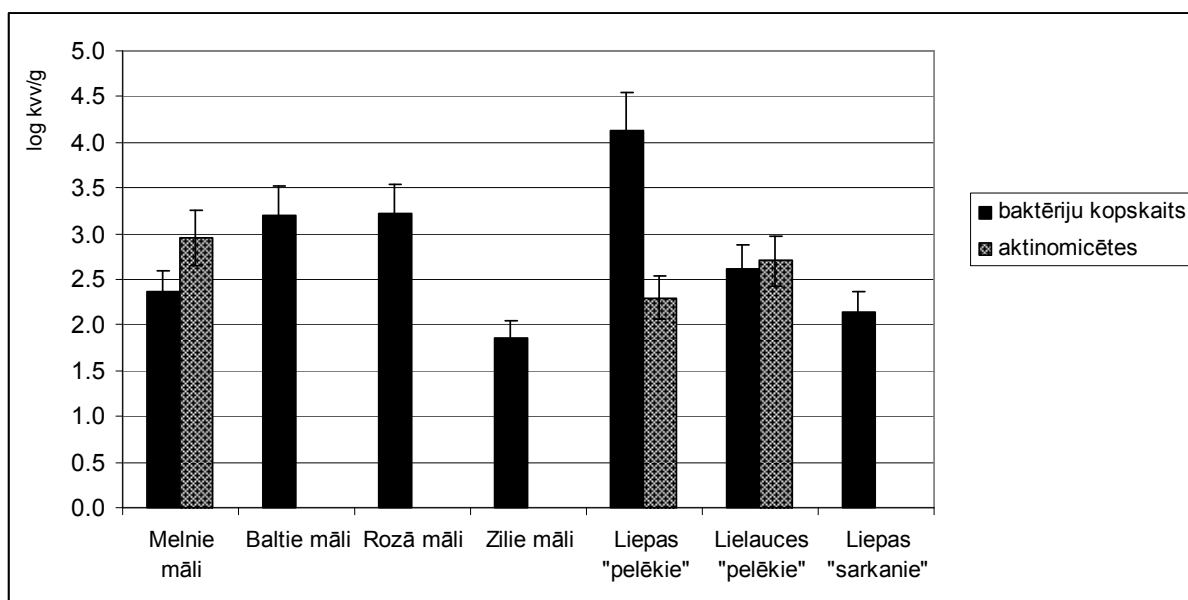


12. attēls. Uz māliem adhezēto *P. putida* daudzums 30 °C, kvv/g. Atspoguļotas vidējās vērtības, iegūtas no diviem eksperimentiem.

Figure 12. The *P. putida* quantity adsorbed onto clay, CFU/g.

### 3.3. Dabisku mālu mikrobioloģiskais sastāvs

Eksperimenti parādīja, ka visi māli satur dažādu sugu baktērijas, bet neviens nesatur sēnes. Var teikt, ka sēņu bija mazāk par 60 kvv/g, kas bija izmantotās metodes jutības robeža. Vislielākais mikroorganismu daudzums ir uz Liepas „pelēkajiem” neapstrādātajiem māliem, savukārt vismazākais mikroorganismu daudzums ir uz zilajiem kosmētiskajiem māliem (13. attēls), kas apstiprina to, ka ziliem māliem iespējams piemīt neliela antimikrobiāla iedarbība, kā bija rakstīts uz paciņas etiķetes. No Latvijas māliem vismazāk mikroorganismu satur Liepas „sarkanie” māli. Protams, liela nozīme ir arī mālu iegūšanas, apstrādes, transportēšanas un uzglabāšanas apstākļiem, un mūsu gadījumā diemžēl tie nebija izsekojami. Jāatzīmē arī aktinomicēšu ievērojamais daudzums melnajos mālos un abos „pelēko” mālu veidos. Mūsu pētījumā redzams, ka Latvijas izcelsmes mālu mikrobioloģiskais sastāvs ir līdzīgs kosmētikā pielietojamu mālu mikrobioloģiskajam sastāvam.



13. attēls. Baktēriju daudzums Latvijas neapstrādātajos mālos un komerciālajos kosmētiskajos mālos.

Figure 13. Quantity of bacteria in Latvian raw clay and in cosmetic clay.

## Secinājumi

1. *P. putida* adhēzija pie keramikas granulām ir atkarīga no vides pH, NaCl koncentrācijas un baktēriju koncentrācijas vidē.
2. Vislielākā baktēriju adhēzija novērojama pie pH 6,0.
3. Novērota negatīva korelācija starp baktēriju adhēziju un NaCl koncentrāciju vidē.
4. Konstatēta pozitīva korelācija starp granulām pievienoto baktēriju koncentrāciju un baktēriju daudzumu uz granulām pēc inkubācijas.
5. No Liepas, Lodes un Prometeja atradnēm iegūtajām šūnainās keramikas granulām ir atšķirīgas izmantošanas iespējas biotehnoloģijā.
6. Baktēriju adhēzija notiek uz visām pētītajām granulām, tomēr tikai Lodes šūnainās keramikas granulas ir piemērotas dzīvu šūnu imobilizācijai.
7. Prometeja mālu granulām ūdens vidē piemīt baktericīda iedarbība. Tā ir mazāk izteikta Liepas mālu granulām, bet nepiemīt Lodes mālu granulām.
8. Dažādas izcelsmes neapstrādāti, sausi māli satur no 70 līdz  $1 \times 10^3$  baktēriju kvv/g, bet nesatur sēnes.

## **Pateicības**

Pateicos Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrai par iespēju izstrādāt bakalaura darbu. Vēlos izteikt pateicību bakalaura darba vadītājai Vizmai Nikolajevai un kolēģei Zaigai Petriņai. Pētījumi veikti Valsts pētījumu programmas Nr. 2010.10-4/VPP-5 „Vietējo resursu (zemes dzīļu, meža, pārtikas un transporta) ilgtspējīga izmantošana – jauni produkti un tehnoloģijas (NatRes)” projekta „Jaunu tehnoloģiju izstrādāšana inovatīvu produktu radīšanai no Latvijas zemes dzīļu resursiem (Zemes dzīles)” ietvaros.

## Literatūras saraksts

1. Absolom D. R., Lamberti F. V., Policova Z., Zingg W., Van Oss C. J., Neumann A. W., 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 90-97.
2. Barros A. R., Cavalcante de Amorim E. L., Marques-Reis C., Shida G. M., Silva E. L., 2010. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy* 35: 3379-3388.
3. Bhinu V.S., 2005. Insight into biofilm-associated microbial life. *Journal of Molecular Microbiology & Biotechnology* 10: 15-21.
4. Bonnie L., Bassler L., Losick R., 2006. Bacterially Speaking. *Cell* 125: 237-246.
5. Bīdermanis L., Švinka V., Švinka R., Timma I., Lindiņa L., Cimmers A. Mālu izejvielu novērtējums šūnainās keramikas iegūšanai // RTU zinātniskie raksti. 1. sēr., Materiālzinātne un lietišķā ķīmija . - 19. sēj. (2009), 93.-99. lpp.
6. Chen X., Hu S., Shen C., Dou C., Shi J., Chen Y., 2009. Interaction of *Pseudomonas putida* CZ1 with clays and ability of the composite to immobilize copper and zinc from solution. *Bioresource Technology* 100: 330–337.
7. Dercová K., Sejáková Z., Skokanová M., Barančíková G., Makovníková J., 2007. Bioremediation of soil contaminated with pentachlorophenol (PCP) using humic acids bound on zeolite. *Chemosphere* 66: 783–790.
8. Forstner U., Wittmann G.T., 1979. Metal pollution in the aquatic environment. Second ed. Springer-Verlag KG, Berlin.
9. Fowle D.A., Fein, J.B., Martin, A.M., 2000. Experimental study of uranyl adsorption onto *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Technol.* 34: 3737–3741.
10. Gadd G. M., 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 271–279.
11. Gómez-Suárez C., Pasma J., Van der Borden A. J., Wingender J., Flemming H. C., Busscher H. J., Van der Mei H. C., 2002. Influence of extracellular polymeric substances on deposition and redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology* 148: 1161-1169.
12. Grasman K.A., Scanlon P.F., Fox G.A., 1998. Reproductive and physiological effects of environmental contaminants in fish-eating birds of the Great Lakes: a review of historical trends. *Environ. Monit. Assess.* 53: 117–143.
13. Gribbs P.E., Pascope P.L., Bryan G.W., 1991. Tributyltin-induced imposex in stenoglossan gastropods - pathological effects on the female reproductive system. *Comp. Biochem. Phys.* 100: 231–235.

14. Grundmann S., Fuß R., Schmid M., Laschinger M., Ruth B., Schulin R., Munch J. C., Schroll R., 2007. Application of microbial hot spots enhances pesticide degradation in soils. *Chemosphere* 68: 511–517.
15. Helfferich F., 1995. *Ion Exchange*. Toronto, Courier Dover Publications, 624 p.
16. Hori K., Matsumoto S., 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* 48: 424–434.
17. Iwabuchi N., Sunairi M., Anzai H., Morisaki H., Nakajima M., 2003. Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*. *Colloids and Surfaces* 30: 51-60.
18. Jacobs A., Lafolie F., Herry J.M., Debroux M., 2007. Kinetic adhesion of bacterial cells to sand: Cell surface properties and adhesion rate. *Colloids and Surfaces* 59: 35–45.
19. Jefferson K.K., 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* 236: 163-173.
20. Jost D., Winter J., Gallert C., 2010. Distribution of aerobic motile and non-motile bacteria within the capillary fringe of silica sand. *Water Research* 44: 1279–1287.
21. Kapellos G. E., Alexiou T. S., Payatakes A. C., 2007. Hierarchical Simulator of biofilm growth and dynamics in granular porous materials. *Advances in Water Resources* 30: 1648–1667.
22. Kuršs V., Stinkule A., 1997. *Latvijas derīgie izrakteņi*. Māli. Rīga: Latvijas Universitāte, 200 lpp.
23. Kuršs V., Stinkule A., 1999. *Derīgie izrakteņi*. Rīga: Latvijas Universitāte, 112 lpp.
24. Lima de Oliveira L., Costa R. B., Okada D. Y., Vich D. V., Silveira-Duarte I.C., Silva E. L., Ambncio Varesche M. B., 2010. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in fluidized bedreactor by microbial consortia in different support materials. *Bioresource Technology* 101: 5112–5122.
25. Nikolajeva V., Petriņa Z., Griba T., 2011. Keramikas granulu un baktēriju mijiedarbības pētījumi. Grāmatā: Ģeogrāfijas, ģeoloģijas, vides zinātne. Referātu tēzes: zin. raksti. Latvijas Universitāte, Rīga, 342.-344. lpp.
26. Poortinga A.T., Bos R., Norde W., Buscher H. J., 2002. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Sciences Reports* 47: 1-32.
27. Raviv M., Wallach R., Siber A., Bar - Tal A., 2002. Substrates and Their Analysis. pp. 25-102, Chapter 2 in: Savvas, D. and H. Passam (eds.), *Hydroponic production of vegetables and ornamentals*. Embryo Publications, Greece.



28. Robledo-Ortiz J.R., Ramirez-Arreola D.E., Gomez C., Gonzalez-Reynoso O., Gonzalez-Nunez R., 2010. Bacterial immobilization by adhesion onto agave-fiber/polymer foamed composites. *Bioresource Technology* 101: 1293–1299.
29. Ruiz L. M., Valenzuela S., Castro M., Gonzalez A., Frezza M., Soulère L., Rohwerder T., Queneau Y., Doutheau A., Sand W., Jerez C. A., Guiliani N., 2008. AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. *Hydrometallurgy* 94: 133–137.
30. Singh R., Paul D., Jain R.K., 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* 14: 389-397.
31. Stewart I., Schluter P. J. Shaw G. R., 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 5:7.
32. Tao X. P., Lu G. N., Liu J. P., Li T., Yang L. N., 2009. Rapid degradation of phenanthrene by using *Sphingomonas* sp.GY2B immobilized in calcium alginate gel beads. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6: 2470-2480.
33. Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Hirata A., 2004. Significance of cell electrokinetic properties determined by soft-particle analysis in bacterial adhesion onto a solid surface. *Journal of Colloid and Interface Science* 279: 410–417.
34. Wang F., Dörfler U., Schmid M., Fischer D., Kinzel L., Scherb H., Munch J.C., Jiang X., 2010. Homogeneous inoculation vs. microbial hot spots of isolated strain and microbial community: What is the most promising approach in remediating 1,2,4-TCB contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 331-336.
35. Ward PG, Goff M, Donner M, Kaminsky W, O'Connor K. E., 2006. A two step chemo-biotechnological conversion of polystyrene to a biodegradable thermoplastic. *Environmental Science and Technology* 40: 2433-7.
36. Wenderoth D.F., Rosenbrock P., Abraham W.R., Pieper, D.H., Höfle M.G., 2003. Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater. *Microbial Ecology* 46: 161-176.
37. Zheng X., Arps P. J., Smith R. W., 2001. Adhesion of two bacteria onto dolomite and apatite: their effect on dolomite depression in anionic flotation. *Int. J. Miner. Process* 62: 159–172
38. Zoueki C. W., Ghoshalb S., Tufenkji N., 2010. Bacterial adhesion to hydrocarbons: Role of asphaltenes and resins. *Colloids and Surfaces* 79: 219–226.

Pielikumi

1. pielikums  
Šūnainā keramika



2. pielikums  
Šūnainā keramika



3. pielikums  
Šūnainā keramika



4. pielikums  
Kosmētiskie māli



5. pielikums  
Baktēriju *P. putida* kolonijas uz PCA barotnes



6. pielikums  
Latvijas māli





7. pielikums  
Latvijas māli



*Lielaucē "pelēkie"*

Bakalaura darbs „Māla, keramikas granulu un baktēriju mijiedarbības pētījumi” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Tatjana Griba

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. biol., doc. Vizma Nikolajeva

Recenzents:

Mag. biol. Ļaisana Šakirova

Darbs iesniegts Zooloģijas un dzīvnieku ekoloģijas katedrā

Metodiķe: Dzintra Zaļā

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē 17.06.2011.

Komisijas sekretāre: