

МОБІЛІЗАЦІЯ ФОСФОРУ З ОРТОФОСФАТУ КАЛЬЦІЮ ДЕЯКИМИ ҐРУНТОВИМИ БАКТЕРІЯМИ

Із зразків ґрунту Дніпропетровської області виділено та відібрано 12 штамів фосфатмобілізуючих бактерій, для яких діаметр зон розчинення ортофосфату кальцію при вирощуванні на агаризованому елективному середовищі перевищував діаметр колоній не менш ніж у два рази (коефіцієнт розчинення понад 200). Показано, що відібрані штами характеризувались різною швидкістю утворення і діаметром зон розчинення $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ навколо колоній. Встановлено, що додавання карбонату кальцію до агаризованого середовища загалом не впливало негативно на процес розчинення культурами ортофосфату кальцію. Відмічено невідповідність між максимальною концентрацією фосфат-іонів у рідкому елективному середовищі і коефіцієнтом відношення діаметра зони розчинення навколо колонії до діаметра самої колонії за три доби культивування.

Ключові слова: фосфатмобілізуючі бактерії, ортофосфат кальцію, коефіцієнт розчинення, фосфатмобілізуюча активність.

В Україні розробки в напрямку створення мікробіологічних добрив ведуться давно, проте в дуже малих масштабах, які не можуть задовольнити нагальних потреб сільського господарства. Що стосується препаратів, покращуючих фосфорне живлення рослин, то їх існує всього декілька (альбобактерин, поліміксобактерин, фосфоентерин, азогран) [3,10,11]. Відомо, що будь-який препарат бактеріальних добрив необхідно розробляти з урахуванням властивостей ґрунтів, бо ґрунти різних регіонів України відрізняються за механічним складом, хімічними властивостями (концентрацією мікро- та макроелементів, рН, вмістом CaCO_3), та за складом мікрофлори [9]. Конкретно для Придніпровського регіону препаратів на основі фосфатмобілізуючих бактерій не розроблено. Тому надзвичайно актуальним було і залишається виділення із природних джерел та дослідження штамів фосфатмобілізуючих бактерій із метою відбору найбільш активних варіантів для створення бактеріальних добрив. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було дослідити, оцінити і порівняти фосфатмобілізуючу активність штамів ґрунтових бактерій на твердому та у рідкому елективних середовищах.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження були штами бактерій, виділені з ґрунтових зразків у Придніпровському регіоні, які розчиняють ортофосфат кальцію та використовують його як неорганічне джерело фосфору.

Для отримання накопичувальних культур фосфатмобілізуючих бактерій проводили висів із ґрунтової суспензії на тверде поживне середовище Менкіної [8], що містило $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ у концентрації 5,0 г/л [16]. Вибір ортофосфату кальцію у ролі неорганічного джерела фосфору, обумовлений його перевагою над іншими видами фосфатів у чорноземі Придніпровщини [2]. Штами фосфатмобілізуючих бактерій відбирали за наявністю утворення зон розчинення $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ і за розрахунком коефіцієнту розчинення (Е) за формулою $E=S/G \cdot 100$, де S – діаметр зони розчинення ортофосфату кальцію, а G – діаметр колонії [17].

Для оцінки фосфатмобілізуючої активності виділених культур проводили дослідження розчинення ними мінерального фосфату у рідкому елективному середовищі Менкіної з $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Поживне середовище по 50 мл вносили у колби Ерленмейєра та інокулювали суспензією кожної з виділених культур із початковим вмістом клітин – 10^6 - 10^7 /мл. Бактерії культивували при 28 °C на шутелі (200 об/хв). Всі експерименти проводили протягом трьох діб у трьох повторах.

Здатність виділених культур розчиняти ортофосфат кальцію визначали за концентрації фосфору у культуральній рідині, використовуючи колориметричний метод Lowry і Lopez в модифікації Скулачова [6]. Експериментальні дані обробляли статистично [4].

Результати та їх обговорення. Із 97 культур, виділених із зразків ґрунту Дніпропетровської області та відібраних за зонами розчинення ортофосфату кальцію при вирощуванні на ага-
© К.В. Лаврентьєва, Н.В. Черевач, А.І. Вінніков, 2011

ризваному елективному середовищі, відмічено 12 штамів бактерій, для яких ефективність розчинення ортофосфату кальцію перевищувала коефіцієнт розчинення 200. У цьому випадку зона розчинення ортофосфату кальцію не менш ніж у 2 рази перевищувала діаметр колонії. Виділені штами характеризувались різною швидкістю утворення і діаметром зон розчинення $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ навколо колоній (табл. 1).

Таблиця 1

Динаміка розчинення $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ґрунтовими штамами фосфатмобілізуючих бактерій (n=3)

Штами	Коефіцієнт мобілізації $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$		
	1 доба	2 доба	3 доба
B4	–	193,3±6,67	306,7±6,7
KP2	206,7±12	293,3±17,64	377,8±5,9
B6	–	193,3±6,7	311,1±11,1
B7	–	193,9±6,06	293,3±6,7
K1	–	214,8±7,4	326,1±5,7
B8	–	213,3±6,7	295,6±4,4
B5	201,7±1,7	238,7±1,33	338,7±3,5
KP1	170,0±15,3	317,8±9,7	406,4±19,2
KT1	–	196,7±6,0	210,0±5,0
T1	183,3±9,6	393,2±3,85	400,0±3,4
V1	–	230,0±10,0	245,0±5,0
V2	159,3±9,26	197,3±2,7	216,9±2,6

Примітка. «–» – відсутність зони розчинення.

Якщо розташувати досліджені штами у порядку зменшення утворених ними зон розчинення ортофосфату кальцію, то виявляється, що найбільш високу здатність до мобілізації на твердому живильному середовищі Менкіної мали штами KP1, T1 та KP2 (табл. 1). Для них коефіцієнти розчинення ортофосфату кальцію становили відповідно 406,4±19,2; 400,0±3,4 та 377,8±5,9. Причому, для цих культур процес розчинення починався вже з першої доби культивування. Найменшу фосфатмобілізуючу активність проявили штами KT1 і V2, для яких коефіцієнти розчинення ортофосфату кальцію відповідно становили 210,0±5,0 та 216,9±2,6. Встановлено, що для більшості штамів після трьох діб культивування ні діаметр зон, ні діаметр колоній істотно не змінювались.

Виходячи з літературних джерел про те, що високий рівень розчинення фосфатів може не підтримуватися у ґрунтах України, оскільки вони характеризуються високою рН-буферною здатністю і концентрацією Ca^{2+} [9], на наступному етапі роботи нами було досліджено розчинення ортофосфату кальцію відібраними штамами у присутності CaCO_3 . Крім того, в літературі є дані про те, що CaCO_3 пригнічує фосфатмобілізуючу активність бактерій [15].

При додаванні до середовища карбонату кальцію у концентрації 1,0 г/л було отримано такі результати (табл. 2). Встановлено, що додавання карбонату кальцію загалом не впливає негативно на процес розчинення ортофосфату кальцію бактеріями на твердому поживному середовищі, хоча зони розчинення з'являлися в цьому випадку пізніше. Лише у двох штамів V1 і V2 спостерігали повну відсутність фосфатмобілізуючої активності і деяке зниження останньої у штама KT1. Отримані результати підтверджують дані Cunningham (1992), який відмічав навіть позитивну дію солей кальцію на активність розчинення його фосфатів мікроорганізмами [12].

Таким чином, отримані дані вказують на те, що процес розчинення ортофосфату кальцію відбувається не тільки за рахунок підкислення середовища, як вказано в деяких роботах [13,15]. Можливо, тут мають місце й інші механізми.

При дослідженні фосфатмобілізуючої активності виділених культур у рідкому елективному середовищі з ортофосфатом кальцію, встановлено, що при культивуванні протягом 3 діб бактерії накопичували від 0,97 ± 0,15 до 20,2 ± 0,75 ммоль фосфат-іонів (рис. 1). Наймен-

шу активність проявляли штами КТ1, V1 та V2. Для цих культур середня концентрація фосфат-іонів за три доби культивування не перевищувала 4,2 ммоль. Найбільш активними були бактерії B5 та T1. Середні концентрації фосфат-іонів в їх культуральних рідинах відповідно склали $13,4 \pm 0,53$ та $20,2 \pm 0,75$ ммоль.

Таблиця 2

**Динаміка розчинення $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ґрунтовими штамами
фосфатмобілізуючих бактерій у присутності CaCO_3 (n=3)**

Штами	Коефіцієнт мобілізації $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$		
	1 доба	2 доба	3 доба
B4	–	$211,1 \pm 6,42$	$303,7 \pm 3,7$
KP2	–	$300,0 \pm 11,55$	$373,3 \pm 6,7$
B6	–	$213,3 \pm 13,3$	$314,8 \pm 14,8$
B7	–	$218,1 \pm 13,46$	$295,6 \pm 11,8$
K1	–	$222,2 \pm 12,8$	$324,4 \pm 2,65$
B8	–	$200,0 \pm 11,6$	$291,1 \pm 4,4$
B5	–	$239,3 \pm 4,0$	$333,3 \pm 4,81$
KP1	$180,0 \pm 11,6$	$310,4 \pm 5,8$	$406,0 \pm 10,7$
КТ1	–	–	$200,0 \pm 2,9$
T1	–	$346,7 \pm 8,8$	$400,0 \pm 7,7$
V1	–	–	–
V2	–	–	–

Примітка. «–» – відсутність зони розчинення.

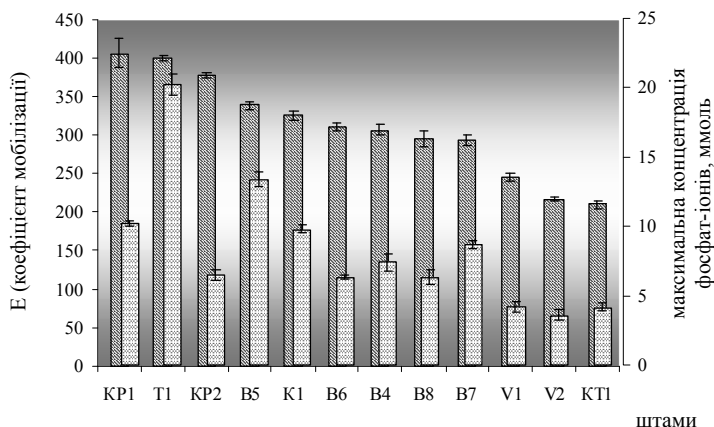


Рис. 1. Зв'язок між максимальною концентрацією фосфат-іонів у середовищі і коефіцієнтом відношення діаметра зони розчинення навколо колонії до діаметра самої колонії за 3-и доби культивування (n=3)

▨ – максимальна концентрація фосфат-іонів, ммоль; ▩ – коефіцієнт відношення діаметра зони розчинення навколо колонії до діаметра колонії.

За даними інших авторів найбільш активні штами у середовищі із ортофосфатом кальцію незалежно від терміну культивування накопичували таку кількість водорозчинного фосфору: *Pseudomonas fluorescens* – 400 мкг/мл, *P. striata* – 156 мкг/мл [14], що становить відповідно 12,9 і 5,03 ммоль фосфат-іонів; *Enterobacter intermedium* – 250 мкг/мл [12], що відповідає 8,06 ммоль фосфат-іонів; *Achromobacter album* – 835 мкг/мл [10], що складає 26,9 ммоль фосфат-іонів. Порівняння отриманих результатів із даними цих авторів показало, що накопичення в культуральному середовищі фосфат-іонів при розчиненні $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ нашими штамами відбувалось інтенсивніше, ніж більшістю вищевказаних Гр бактерій.

Результати порівняння отриманих даних відносно здатності розчинення ортофосфату кальцію виділеними штамами на твердому і у рідкому живильних середовищах із наведеними в літературі виявилися досить суперечливими.

Так в роботах Павлової (1984) і Seshadri (2000) встановлено, що не всі культури, які утворюють значні зони мобілізації фосфору на твердому середовищі, ефективно розчиняють фосфат у рідкому [7,17]. В роботі ж І.М. Малиновської [5], навпаки, встановлено тісний кореляційний зв'язок між питомою фосфатмобілізуючою активністю в рідкому живильному середовищі і відношенням розміру зони розчинення до розміру колоній.

Отримані нами дані підтверджують результати Павлової (1984) і Seshadri (2000), так як у досліджених нами 12-ти культур відмічали невідповідність між максимальною концентрацією фосфат-іонів у середовищі і коефіцієнтом відношення діаметра зони розчинення навколо колонії до діаметра самої колонії за три доби культивування (рис. 1). З графіку видно, що не завжди культури, які утворюють значні зони розчинення ортофосфату кальцію на твердому живильному середовищі, мають високі значення концентрацій фосфат-іонів у рідкому середовищі.

На нашу думку, така невідповідність може бути пов'язана із кількістю поглиненого клітиною фосфору. Тим більше, що в літературі описані випадки, коли при підкисленні середовища фосфат-іони в ньому не накопичуються, а відбувається активне поглинання фосфору зростаючою культурою [1].

Виходячи з вищезазначеного, можна зробити висновок, що дослідники при доборі штамів фосфатмобілізуючих бактерій для створення біодобрив враховують не всі параметри мобілізації фосфору з його слабोरозчинних сполук. Необхідно мати на увазі той факт, що окремі види мікроорганізмів можуть активно накопичувати фосфор у своїх клітинах, що пов'язано з їх фізіолого-біохімічними особливостями. Тому, для того, щоб отримати ефективний біопрепарат, треба обов'язково досліджувати динаміку мобілізації слабोरозчинних сполук фосфору мікроорганізмами, тобто визначати концентрацію фосфору у трьох фракціях: внутрішньоклітинній, у культуральній рідині та в залишку ортофосфату кальцію.

Е.В. Лаврентьева, Н.В. Черевач, А.И. Винников

*Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина*

МОБИЛИЗАЦИЯ ФОСФОРА ИЗ ОРТОФОСФАТА КАЛЬЦИЯ НЕКОТОРЫМИ ПОЧВЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Резюме

Из почвенных образцов Днепропетровской области выделено и отобрано 12 штаммов фосфатмобилизирующих бактерий, для которых диаметр зон растворения ортофосфата кальция при культивировании на плотной элективной среде превышал диаметр колоний по меньшей мере в два раза (коэффициент растворения выше 200). Показано, что отобранные штаммы характеризовались разной скоростью образования и диаметром зон растворения $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ вокруг колоний. Установлено, что внесение в среду карбоната кальция практически не влияло на процесс растворения культурами ортофосфата кальция. Отмечено несоответствие между максимальной концентрацией фосфат-ионов в жидкой элективной среде и коэффициентом отношения диаметра зоны растворения вокруг колонии к диаметру самой колонии в течение 3 дней культивирования.

Ключевые слова: фосфатмобилизирующие бактерии, ортофосфат кальция, коэффициент растворения, фосфатмобилизирующая активность.

K.V.Lavrent'yeva, N.V.Cherevach, A.I.Vinnikov

Oles Gonchar Dnepropetrovsk National University

PHOSPHORUS MOBILIZATION FROM CALCIUM ORTHOPHOSPHATE BY SOME SOIL BACTERIA

S u m m a r y

Twelve bacterial strains were extracted from Dnepropetrovsk region soils according to their ability to dissolve $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. All strains have zones of dissolution of elective solid medium twice as large as the colony diameter. It was shown that the selected strains have different features of dissolution of calcium orthophosphate in the medium. Addition of calcium carbonate to the medium does not affect negatively the dissolution of calcium

orthophosphate by the investigated bacterial strains. Mismatching of maximal concentration of phosphate ions in liquid medium and a ratio between the diameter of dissolution zone and diameter of colony coefficient for three days of cultivation was shown.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у w o r d s: phosphate-solubilizing bacteria, calcium orthophosphate, solubilization efficiency, phosphate-solubilizing activity.

К е у a u t h o r ' s a d d r e s s: *Лаврент'єва К.І.*, Oles Gonchar Dnipropetrovsk National University; 72 Gagarin St., Dnipropetrovsk, 49050, Ukraine.

1. Андреева Н.А., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. Неорганические полифосфаты и фосфогидролазы *Halobacterium salinarum* // Микробиология. – 2000. – 69, № 4. – С. 499–505.
2. Гуляев Б.И., Патыка В.Ф. Фосфор как энергетическая основа процессов фотосинтеза, роста и развития растений // Агроекологічний журнал. – 2004. – № 2. – С. 3–9.
3. Курдиш І.К. Азогран – гранульований бактеріальний препарат нового покоління для рослинництва // Наука та інновації. – 2009. – 5, № 2. – С. 50–52.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. – Москва: Высш. шк., 1990. – 352 с.
5. Малиновская И.М. Агроекологические основы микробиологической трансформации биогенных элементов почвы: Автореф. дис. ... д-ра с/х наук. – К., 2003. – 34 с.
6. Никулина Н.А. Обзор методов определения фосфора по образованию молибденовой сини. – М.: Колос, 1978. – 49 с.
7. Павлова В.Ф. Мобилизация фосфатов алюминия и железа почвенными микроорганизмами: Автореф. дис. ... канд.биол.наук. – Ленинград, 1984. – 17 с.
8. Рой А.А., Булашенко Л.В., Курдиш І.К. Новые штаммы бацилл, минерализующие органические соединения фосфора // Микробиологічний журнал. – 2001. – 63, № 4. – С. 9–14.
9. Русский чернозем. 100 лет после Докучаева. / Под ред. Добровольского Г.В., Самойловой Е.М., Розова Н.Н. – М.: Наука, 1983. – 304 с.
10. Токмакова Л.Н. Штаммы *Bacillus polymyxa* и *Achromobacter album* – основа для создания бактериальных препаратов // Микробиологічний журнал. – 1997. – 59, № 4. – С. 131–138.
11. Чайковская Л.А., Мельничук Т.Н., Смутьская О.Л., Баранская М.И. Биопрепарат фосфоэнтерин – возможности и перспективы // Материалы международной конференции «Radostim 2007. Гуминовые кислоты и фитогормоны в растениеводстве» (Киев, 12-16 июня 2007г.): Тез. докл. – Киев, 2007. – С. 27–30.
12. Cunningham J.E., Kuyack C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii* // Applied and Environmental Microbiology. – 1992. – 58, N 5. – P. 1451–1458.
13. Goldstein A.H. Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility // Symp. “First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization: Developments in Plant and Soil Science”: Proc. (Salamanca, Spain, 16-19 July, 2002) – Salamanca, 2002. – P. 91–96.
14. Jeon J.-S., Lee S.-S., Kim H.-Y., Ahn T.-S., Song H.-G. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms // The Journal of Microbiology. – 2003. – 41, N 4. – P. 271–276.
15. Kim K.Y., Hwangbo H., Park R.D., Seong K.Y., Kim Y.W., Park B.K., Krishnan H.B. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedius* // Current Microbiology. – 2003. – 47, N 2. – P. 87–92.
16. Kim Y.H., Bae B., Choung Y.K. Optimization of biological phosphorus removal from contaminated sediments with phosphate-solubilizing microorganisms // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2005. – 99, N 1. – P. 23–29.
17. Seshadri S., Muthukumarasamy R., Lakshminarasimhan C., Ignasimuthu S. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans* // Current science. – 2000. – 79, N 5. – P. 565–567.

Отримано 20.09.2010