

УДК 579.64

Студ. Д. С. Сергиевич

Науч. рук. доц. Н. А. Белясова

(кафедра биотехнологии и биоэкологии, БГТУ)

ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ, СПОСОБНЫХ ОСУЩЕСТВЛЯТЬ АКТИВАЦИЮ НИЗКОСОРТНЫХ ФОСФАТНЫХ РУД

Введение. Фосфор – чрезвычайно важный элемент, который входит в состав многих макромолекул, таких как ДНК, РНК, некоторые кофакторы и др. По значению в питании растений он занимает одно из ведущих мест. Коэффициент использования растениями фосфора, получаемого из минеральных удобрений, чрезвычайно низкий – всего 15-20%, в то время как азота – 50% и калия 60-70% [1].

Фосфор в почве может содержаться в составе органических и неорганических соединений. Фосфорорганические соединения составляют 20-52%, а иногда до 96% всего запаса фосфора в почве. Неорганических фосфор входит в структуру первичных минералов или содержится в почве в виде нерастворимых солей Са, Fe и Al, из которых наиболее распространены фосфаты кальция [2].

Известно, что микробные сообщества являются ключевым звеном, определяющим качество почвы из-за их активного участия в динамике органического вещества и процессах разложения различных минералов.

Так среди микроорганизмов населяющих ризосферу известно большое количество бактерий и грибов способных мобилизовать труднорастворимые формы фосфатов. Большинство видов фосфатмобилизующих бактерий благотворно влияют на растения, стимулируя их рост и фотосинтез. Это происходит в силу нескольких причин: выделения микроорганизмами витаминов и фитогормонов, продуцирования ими антибиотиков, ингибирующих развитие патогенов; перевода минеральных элементов в доступную для растений форму.

Результаты и методы. Основной целью работы было получение бактерий, способных осуществлять активацию низкосортных фосфоритов.

Выделение потенциально фосфатмобилизующих бактерий проводили из ризосферы растений, растущих на бедных подзолистых почвах. При этом выделение осуществлялось с применением двух сред, различающихся по составу.

При высеве пробы № 1 использовалась глюкозо-аспарагиновая среда следующего состава: глюкоза – 10 г/л, аспарагин – 0,5 г/л, агар-агар – 20 г/л.

Высев проб № 2, 3 осуществлялся на питательную среду состава: глюкоза – 10 г/л, аммоний серноокислый – 0,5 г/л, дрожжевой экстракт – 0,2 г/л, магний серноокислый шестиводный – 0,4 г/л, агар-агар – 20 г/л.

В качестве единственного источника фосфора использовали фосфатную руду Вятко-Камского месторождения, отмытую от водорастворимых фосфатных примесей.

Все пробы высевали методом Коха на три чашки Петри, чашки культивировали в термостате при 30°C в течении 5-7 суток.

Каждый из выделенных штаммов подвергался не менее чем трехкратной расчистке с получением изолированных колоний. Контроль чистоты культур производили с помощью микроскопирования.

Для первичного отбора фосфат мобилизующих бактерий и оценки их активности, на поверхность плотной среды содержащей фосфат кальция наносили бактериальные «медальоны» размером 3-4мм. Чашки культивировали в течение 4-х суток при 30°C и измеряли диаметр зон просветления и диаметр «медальона». Степень фосфатмобилизующей активности (индекс растворимости фосфата) определяли по отношению диаметра гало и бактериального «медальона» (табл. 1). Все наблюдения повторяли трижды.

Для поиска бактерий способных растворять фосфат из более стойких соединений, чем фосфат кальция проводили анализ количества растворимого фосфата при культивировании отобранных на предыдущем этапе наиболее активных штаммов в жидкой среде, которая содержала фосфориты Марокканского месторождения. Для этого использовалась жидкая среда следующего состава: глюкоза – 6 г/л, аммоний серноокислый – 0,5 г/л, магний серноокислый шестиводный – 0,2 г/л. В качестве источника фосфора добавляли навеску 0,15 г фосфоритов марокканского месторождения.

Анализ высвобожденного из труднодоступных соединений фосфата проводили по интенсивности окраски.

Для этого колонии наиболее активных фосфатмобилизующих бактерий инокулировали в жидкую среду (50мл) в 250мл колбах Эрленмейера и инкубировали в течении 4-х дней при 30 °С в шейкере-инкубаторе «ES-20» при 140 об/мин. После инкубирования культуральную жидкость очищали от бактериальных клеток и взвеси центрифугированием «minispin» при 10000 об/мин в течении 10 мин. Неинокулированная жидкая питательная среда с фосфоритом служила в качестве контроля. Растворенный фосфор определяли в фугате культуральной жидкости с добавлением смешанного реактива (молибдата

аммония растворенного в соляной кислоте смешанной с 0,5%-ным раствором малахитового зеленого в соотношении 1:1) и 1%-ным раствором Tween 20 в количестве 0,2 мл для стабилизации окраски. Насыщенность зеленого цвета измерялась с помощью спектрофотометра «Metertech SP-880» при 645 нм по прошествии 20 мин после смешения всех реактивов.

Результаты и обсуждения. В ходе высева почвенных проб было получено в общей сложности: 37 бактериальных штаммов, 3 штамма актиномицетов и 1 штамм дрожжей. В ходе проведенных экспериментов фосфатмобилизационную активность определили только у бактерий.

Во всех случаях при выделении главным элективным фактором являлось отсутствие в питательной среде водорастворимых фосфатов.

После проведения первичного отбора оказалось, что выраженной фосфат мобилизующей активностью обладают 6 штаммов бактерий (индекс растворимости фосфата более 1,5), еще 7 штаммов показали более низкую фосфат мобилизующую активность с индексом растворимости фосфата от 1,2 до 1,5 (табл. 1).

Таблица 1 – Активность перевода нерастворимых соединений фосфора выделенными микроорганизмами чашечным методом

Штамм	Диаметр «медальона», d_m мм	Диаметр гало, d_r мм	Индекс растворимости фосфата, d_r/d_m
ВП.6	8	13	1,6
НВП.1.V	4	11	2,7
НВП.2.XIV	5	8	1,6
НВП.2.XVII	4	14	3,5
НВП.2.XXI	6	10	1,7
НВП.2.XXII	5	8	1,6

Отобранные на первом этапе бактериальные штаммы, обладающие фосфатмобилизационной активностью, использовали для определения возможности мобилизации труднорастворимых фосфатных соединений в жидкой среде содержащей фосфориты Марокканского месторождения.

Оценку фосфатмобилизационной активности выделенных бактерий проводили по интенсивности зеленой окраски при помощи спектрофотометрического метода. Результаты опыта приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Активность перевода нерастворимых соединений фосфора выделенными микроорганизмами в жидкой среде

Штамм	Оптическая плотность, А					
	1 день		3 день		5 день	
	Проба	Контроль	проба	контроль	проба	контроль
ВП.6	0,069	0,064	0,168	0,084	3,310	0,189
НВП.1.V	0,067	0,068	0,151	0,095	2,720	0,329
НВП.2.XIV	0,052	0,055	0,118	0,109	1,880	0,371
НВП.2.XVI	0,045	0,046	0,097	0,106	2,032	0,309
НВП.2.XXI	0,057	0,062	0,091	0,089	1,630	0,209
НВП.2.XXI	0,048	0,052	0,089	0,081	1,740	0,249

Из данных представленных в таблицах 1 и 2 видно, что активность бактериальных штаммов в жидкой среде и на плотной различна. Так штамм, показавший наибольшую фосфатмобилизующую активность (НВП.2.XVII) после культивирования на жидкой среде показал лишь третий результат. Причина, возможно, кроется в различной способности кислот, продуцируемых бактериями, связывать катионы металлов, образующие с фосфатами нерастворимые соединения.

В пользу этой теории говорит подкисление отобранными штаммами среды после 5 дней культивирования, а также различия в составе соединений используемых для проверки активности мобилизации фосфата.

В результате работы отработан метод выделения и первичного скрининга фосфатмобилизующих микроорганизмов, снижающих рН среды обитания и вызывающих высвобождения фосфата в жидких и плотных средах. Также отобраны бштаммов бактерий (ВП.6, НВП.1.V, НВП.2.XIV, НВП.2.XVII, НВП.2.XXI, НВП.2.XXII), активно мобилизующих нерастворимые фосфатные соединения, входящие в состав фосфоритов различного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пуронен, С. В. Выделение активных культур фосфатмобилизующих микроорганизмов из ризосферы / С.В. Пуронен, А.М. Жусупова, О.А. Тен // Биотехнология. Теория и практика. – 2012- № 3 - с. 77-82.

2. Звягинцев, Д. Г. Почва и микроорганизмы. - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1987. — 256 с.