DOI 10.31489/2020BMG3/36-42

УДК 62.13.53

Н.К. Жаппар*, В.М. Шайхутдинов, Б.М. Мырзабаев,
К.А. Зейнелов, А.К. Шибаева, Л.Ж. Байрон

Филиал РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, Степногорск, Казахстан
*(*E-mail: nariman_zhappar@mail.ru)*

Выделение и изучение штаммов фосфатмобилизирующих микроорганизмов, перспективных для создания биоудобрения

В статье описан процесс выделения и изучения штаммов фосфатмобилизирующих микроорганизмов. В результате анализа почвы выявлено, что в отобранных 9 образцах содержится достаточное количество общего азота, гумуса и подвижных соединений фосфора для развития микроорганизмов. В итоге выделения фосфатмобилизующих микроорганизмов были отобраны 23 моноизолята. После инкубации колб провели анализы на содержание растворенного фосфора и pH в культуральной жидкости. В результате наибольшее содержание растворенного фосфора получено при инкубации моноизолятов № 9 и 20, которые составили 3,57 г/л и 2,55 г/л соответственно. Кроме того, pH среды у данных моноизолятов показал наименьшие значения: 5,4 и 5,7. Моноизоляты № 9 и 20 зашифрованы как FT1 и FT2. На основе физиолого-биохимических исследований выделенные моноизоляты идентифицированы как *Bacillus megaterium* FT1 и *Bacillus sp.* FT2. В результате изучения фосфатмобилизирующей активности у выделенных штаммов почвенных фосфатмобилизирующих микроорганизмов и коллекционного штамма наибольшую фосфатмобилизирующую активность показал новый штамм *Bacillus megaterium* FT1, который в течение 120 ч растворил 100 % фосфора в среде. Выход растворенного фосфора у штаммов *Bacillus spp.* FT2 и *Serratia plymuthica* Nl1 составил 50,0 5 и 54,2 % в течение 168 ч.

Ключевые слова: биоудобрение, микроорганизм, моноизолят, штамм, идентификация, фосфатмобилизирующая бактерия, почва, урожайность.

Введение

Основные приоритеты, стоящие перед агропромышленным комплексом Республики Казахстан — создание устойчивой системы продовольственной безопасности, развитие агробизнеса, снижение импорта продовольствия и повышение конкурентоспособности отечественной продукции. Одним из путей повышения производительности аграрного сектора сельского хозяйства является повышение урожайности используемых почв путем внесения сбалансированных доз органических удобрений, минеральных компонентов, обогащения почв полезной микрофлорой [1].

Разнообразные климатические условия Казахстана позволяют выращивать почти все культуры умеренного теплового пояса — зерновые, плодовоовощные, масличные, технические.

Повышение эффективности аграрного сектора — сложная и многосторонняя задача. Немаловажная роль должна отводиться разработке и внедрению экологически безопасных систем земледелия, составной частью которых являются плодосменные биологизированные севообороты [2], использование органических и биологических удобрений [3], внедрение ресурсосберегающих технологий культивирования [4], использование биологических средств защиты растений. Биологическое направление в создании препаратов для улучшения плодородия постоянно развивается: появляются новые перспективные организмы для создания на их основе биопрепаратов различного действия.

В сельском хозяйстве как основной отрасли, потребляющей фосфорные соединения, проблемы дефицита доступного фосфора в почве решаются путем регулярного внесения минеральных удобрений. Однако только 10–15 % вносимых фосфорных удобрений ассимилируются растениями, а большая часть их переходит в труднодоступную форму для растений или вымывается с грунтовыми водами. Такого неподвижного необменного фосфора в почве содержится очень много: до 5–6 т в каждом гектаре. Фосфатмобилизирующие бактерии живут в почве, разлагают органические вещества и высвобождают содержащийся в них фосфор, переводя его в растворимые соли фосфорной кислоты. Образуемые в дальнейшем соединения фосфорной кислоты становятся доступными для растений.

Наиболее выгодным и экологически безопасным приемом повышения подвижности фосфора в почве и его доступности растениям является микробиологическая фосфатмобилизация — применение бактериальных препаратов, усиливающих мобилизацию фосфора из труднодоступных соединений почвы в легкодоступные.

В связи с изложенным выше, целью данной работы являлось выделение и идентификация активных штаммов фосфатмобилизирующих микроорганизмов для создания биологического удобрения.

Методы исследования

Объектами исследований служили штаммы свободноживущих фосфатмобилизирующих бактерий, выделенные из посадочных участков ТОО «Biolife» (Акмолинская область, г. Степногорск).

Отбор проб почв проводили в соответствии с ГОСТ 28168–89 [5]. pH почв определяли методом, основанном на вытеснении обменных катионов 1М раствором KCl из почвенного поглощающего комплекса [6], а содержание гумуса в пробах почв — по методике определения качества почвы [7].

Выделение фосфатмобилизующих микроорганизмов проводили на плотной питательной среде NBRIP-BPB и жидкой среде NBRIP [8]. Концентрацию фосфора в растворе определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Biomate 3 (Thermo Ficher Scientific) [9]. Для постановки титра использовали питательную среду NBRIP.

Количественный учет микроорганизмов проводили методом посева по Коху [10]. Величину pH исследуемых растворов определяли с помощью профессионального многоканального pH-метра Mettler Toledo SevenMulti.

Идентификацию бактерий проводили на основании морфологических, культуральных и физиологических признаков, используя «Определитель бактерий Берджи». Результаты исследования были обработаны с использованием критерия Стьюдента.

Результаты

Выделение почвенных фосфатмобилизирующих микроорганизмов проводили из 9 проб, отобранных на посадочных участках ТОО «Biolife». Ниже в таблице приведены данные анализа отобранных проб.

Т а б л и ц а

Результаты анализа проб почвы

Проба №	pH	Влажность, %	Общий N, %	Гумус, % (содержание)	Подвижные соединения P, мг/кг (содержание)
1	7,9	5,4	0,3605	6 (среднее)	113 (повышенное)
2	6,65	2,5	0,1413	2,5 (низкое)	99 (среднее)
3	6,34	2,1	0,1684	2,4 (низкое)	113 (повышенное)
4	6,25	2,4	0,4473	3,4 (низкое)	95 (среднее)
5	6,36	2,4	0,2413	2,7 (низкое)	139 (повышенное)
6	7,79	5,2	0,4315	6,4 (повышенное)	93 (среднее)
7	8,0	4,6	0,3789	5,5 (среднее)	2,8 (очень низкое)
8	6,93	3,8	0,0063	3,2 (низкое)	21 (очень низкое)
9	6,81	4,0	0,2284	3,2 (низкое)	27 (низкое)

Согласно результатам анализа почвы, в отобранных образцах содержится достаточное количество общего азота, гумуса и подвижных соединений фосфора для развития микроорганизмов.

Образцы почвы массой 5 г смешивали с 100 мл стерильного 0,9 % раствора хлорида натрия, встряхивали на шейкере в течение 8 ч. После образцы вносили в жидкую среду NBRIP, содержащую нерастворимый ортофосфат кальция, и инкубировали на шейкере-инкубаторе 72 ч при температуре 28 ºС и 200 об/мин. При данных условиях преимущественно развивались микроорганизмы, способные к растворению неорганических фосфатов и переводу их в доступные формы. Через 72 ч культивирования готовили последовательные десятикратные разведения полученной суспензии микроорганизмов и высевали на плотную питательную среду NBRIP-BPB для выделения колоний микроорганизмов, способных растворять ортофосфат кальция. При растворении ортофосфата кальция происходило образование зон просветления (зон гало) на изначально мутной среде. После культивирования на среде NBRIP-BPB были отобраны 23 моноизолята, вокруг которых образовывались зоны гало.

Отобранные изоляты были пересеяны на среду NBRIP, содержащую нерастворимый ортофосфат кальция, после инкубировали при 28°С и 200 об/мин в течение 72 ч. После инкубации колб провели анализы на содержание растворенного фосфора и pH в культуральной жидкости (рис. 1).

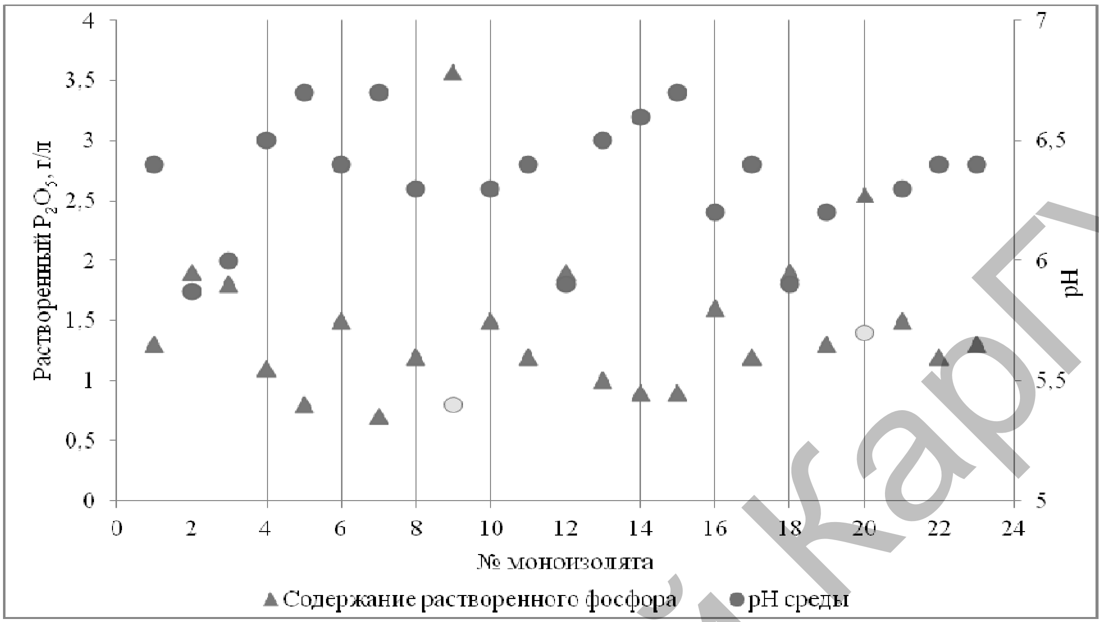


Рисунок 1. Концентрация растворимого фосфора и pH среды после инкубации фосфатмобилизирующих моноизолятов в течение 72 ч

По данным, представленным на рисунке 1, видно, что наибольшее содержание растворенного фосфора получено при инкубации моноизолятов № 9 и 20, которые составили 3,57 г/л и 2,55 г/л соответственно. Кроме того, pH среды у данных моноизолятов показал наименьшие значения: 5,4 и 5,7. Моноизоляты под № 9 и 20 зашифрованы как FT1 и FT2.

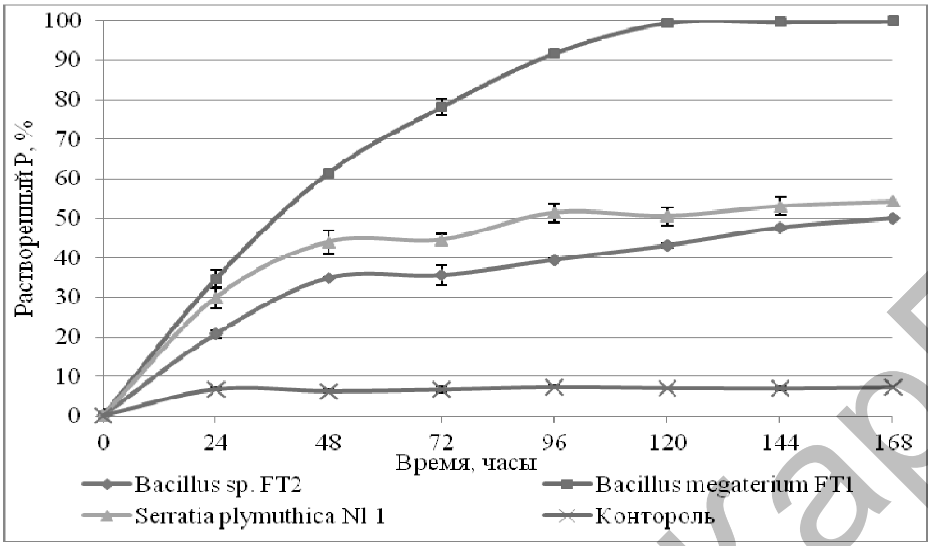
Идентификация данных моноизолятов проведена на основании морфологических, культуральных и физиологических признаков с использованием «Определителя бактерий Берджи».

Моноизолят FT1: Клетки прямые палочковидные с закругленными концами, размером 1,9×0,5 мкм, расположенные одиночно, попарно или в виде цепочки, образуют сферические эндоспоры, клетки подвижные. Через 18 ч роста на мясо-пептонном агаре или картофельно-глюкозном агаре клетки образуют колонии грязно-белого цвета. При культивировании штамма на МПА, картофельном агаре, сусло-агаре в течение 24 ч при 28±1 ºС образуются складчатые колонии, вязкой консистенции, телесного цвета. Не растет в анаэробных условиях, оптимальная температура роста 28–31 ºС, pH 6,8–7,2. Культура ферментирует глюкозу, арабинозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, маннит, сахарозу с образованием кислоты без газа. Гидролизует крахмал, желатин, не гидролизует мочевину.

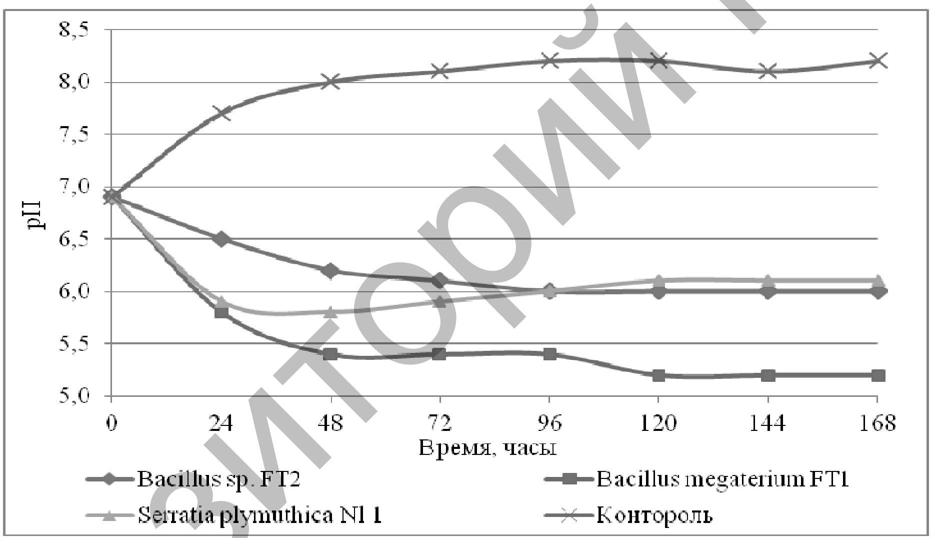
Моноизолят FT2: Грамположительные аэробные спорообразующие палочки, продуцирующие каталазу. На мясо-пептонном агаре, сусло-агаре дают обильный рост. На МПА образует серовато-белые мелкоморщинистые колонии с волнистыми краями, слегка врастающими в агар, вязкой консистенции. Рост в жидкой среде сопровождается помутнением среды, образованием пленки серовато-белого цвета и осадка. Оптимальная температура роста 28–30 ºС. Через 18 ч роста в мазках культуры обнаруживаются прямые палочковидные клетки, размером 2–3×0,6 мкм, расположенные одиночно, попарно или цепочкой. При спорообразовании клетка не раздувается. Споры овальные, размер 0,9×0,6 мкм, расположены в клетке центрально или эксцентрично. Культура ферментирует глюкозу, сахарозу, маннит и мальтозу. Гидролизует крахмал, желатин, не гидролизует мочевину.

На основе физиолого-биохимических исследований выделенные моноизоляты идентифицированы как *Bacillus megaterium* FT1 и *Bacillus sp.* FT2.

Изучение фосфатмобилизирующей активности у выделенных штаммов *Bacillus megaterium* FT1, *Bacillus sp.* FT2 и штамма *Serratia plymuthica* Nl1, взятого из коллекции штаммов микроорганизмов филиала «Национальный центр биотехнологии» в г. Степногорске, проводили на жидкой среде NBRIP, содержащей нерастворимый ортофосфат кальция, в течение 168 ч. Содержание растворенного фосфора определяли каждые 24 ч. Результаты по содержанию растворенного фосфора и данные по pH представлены на рисунке 2.



а



б

а — выход фосфора в раствор; *б* — pH среды

Рисунок 2. Результаты выхода фосфора в раствор и данные по pH среды

Результаты исследований, представленные на рисунке 2*а*, показали, что наибольшая фосфатмобилизирующая активность наблюдается у штамма *Bacillus megaterium* FT1, который в течение 120 ч растворил 100 % фосфора. Выход растворенного фосфора у штаммов *Bacillus sp.* FT2 и *Serratia plymuthica* Nl1 составил 50,0 и 54,2 % соответственно в течение 168 ч. Концентрация растворимого фосфора коррелирует с понижением pH среды в соответствии с рисунком 2*б*. В результате наибольшую активность показали штаммы *Bacillus megaterium* FT1 и *Serratia plymuthica* Nl1, которые были выбраны для дальнейшего создания комплексного органического биоудобрения. На рисунке 3 представлен регрессионный анализ корреляции между pH и содержанием фосфора в культуральной жидкости для всех исследуемых фосфатмобилизирующих штаммов.

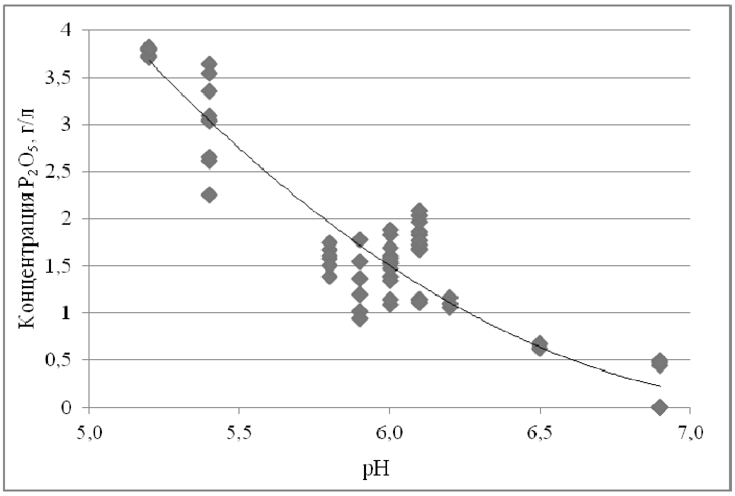


Рисунок 3. Регрессионный анализ корреляции между pH и выходом P для фосфатмобилизирующих штаммов *Bacillus megaterium* FT1, *Bacillus sp.* FT2 и *Serratia plymuthica* Nl1

Таким образом, в мобилизации фосфора значительную роль играет снижение pH среды за счет образования кислоты бактериями. Наибольшее растворение фосфора наблюдалось при значениях pH меньше 6,0.

Заключение

С целью создания органического удобрения, перспективного для выращивания органической продукции и повышения плодородия почвы, были выделены свободноживущие фосфатмобилизирующие бактерии и изучена фосфатмобилизирующая активность.

Проведен подбор штаммов и отобраны 2 штамма фосфатмобилизирующих бактерий *Bacillus megaterium* FT1 и *Serratia plymuthica* Nl1.

В результате изучения фосфатмобилизирующей активности у выделенных штаммов почвенных фосфатмобилизирующих микроорганизмов и коллекционного штамма наибольшую фосфатмобилизирующую активность показал новый штамм *Bacillus megaterium* FT1, который в течение 120 ч растворил 100 % фосфора в среде. Выход растворенного фосфора у штаммов *Bacillus spp.* FT2 и *Serratia plymuthica* Nl1 составил 50,0 5 и 54,2 % в течение 168 ч соответственно.

Данная работа была выполнена в рамках научно-технической программы О.0810 «Создание новых препаратов и инновационных биотехнологий для сельского хозяйства и ветеринарии» на 2018–2020 годы.

Список литературы

1 Послание Президента Республики Казахстан Н. Назарбаева народу Казахстана. «Третья модернизация Казахстана: глобальная конкурентоспособность» от 31 января 2017 года [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://www.akorda.kz/ru/addresses/addresses_of_president/poslanie-prezidenta-respubliki-kazahstan-nnazarbaeva-narodu-kazahstana-31-yanvarya-2017-g (дата обращения 14.04.2020).

2 Crotty F.V. Understanding the Legacy Effect of Previous Forage Crop and Tillage Management on Soil Biology, after Conversion to an Arable Crop Rotation / F.V. Crotty, R. Fychan, R. Sanderson, J.R. Rhymes, F. Bourdin, J. Scullion // Soil Biology and Biochemistry. — 2016. — Vol. 103. — P. 241–252.

3 Sattar A. Perspectives of Potassium Solubilizing Microbes in Sustainable Food Production System: A Review / A. Sattar, M. Naveed, M. Ali, A. Zahir, M.S. Nadeem, M. Yaseen [Electronic resource]. — URL: https://www.researchgate.net/publication/327776810_Perspectives_of_potassium_solubilizing_microbes_in_sustainable_food_production_system_A_review (дата обращения 14.04.2020).

4 Muriu-Ng'ang'a F.W. Socio-Economic Factors Influencing Utilisation of Rain Water Harvesting and Saving Technologies in Tharaka South, Eastern Kenya / F.W. Muriu-Ng'ang'a, M. Mucheru-Muna, F. Waswa, F.S. Mairura // Agricultural Water Management. — 2017. — Vol. 194. — P. 150–159.

5 ГОСТ 28168–89. Почвы. Отбор проб.

6 ГОСТ 26425–85. Почва. Метод определения ионов хлорида в водной вытяжке.

7 Александрова Л.Н. Лабораторно-практические занятия по почвоведению / Л.Н. Александрова, О.А. Найденова. — Л.: Наука, 1986. — 224 с.

8 Yasmin H. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil of weeds of khewra salt range and attock / H. Yasmin, A. Bano // Pakistan Journal of Botany. — 2011. — № 3. — P. 1663–1668.

9 ГОСТ 26211–91. Почвы. Определение подвижных соединений фосфора по методу Аррениуса в модификации ВИУА.

10 Нетрусова А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусова. — М.: Академия, 2005. — 608 с.

Н.К. Жаппар, В.М. Шайхутдинов, Б.М. Мырзабаев,
К.А. Зейнелов, А.К. Шибаева, Л.Ж. Байрон

Биотыңайтқышты жасау үшін перспективті фосфатмобилизациялайтын микроорганизмдер штамдарын бөліп алу және зерттеу

Мақалада фосфатмобилизациялайтын микроорганизмдер штамдарын бөліп алу және зерттеу үдерісі сипатталған. Топырақты талдау нәтижесінде іріктелген 9 үлгілерде микроорганизмдерді дамыту үшін жалпы азоттың, гумустың және фосфордың жылжымалы қосылыстарының жеткілікті мөлшері бар. Фосфатмобилизациялайтын микроорганизмдердің бөлінуі нәтижесінде 23 моноизоляттар іріктелді. Колбаларды инкубацияланғаннан кейін ерітілген фосфордың және культуралды сұйықтықтағы pH құрамына талдау жасалынды. Нәтижесінде ерітілген фосфордың ең көп құрамы № 9 және 20 моноизоляттарды инкубациялау кезінде алынған, олар тиісінше 3,57 г/л және 2,55 г/л құрады. Сондай-ақ, моноизоляттардың қоректік ортасының pH ең аз мәндерін көрсетті: 5,4 және 5,7. № 9 және 20 моноизоляттар FT1 және FT2 ретінде шифрленген. Физиологиялық-биохимиялық зерттеулер негізінде бөлінген моноизоляттар *Bacillus megaterium* FT1 және *Bacillus sp.* FT2 ретінде сәйкестендірілген. Топырақ фосфатмобилизациялайтын микроорганизмдердің бөлінген штамдарында және коллекциялық штамында фосфатмобилизациялайтын белсенділікті зерттеу нәтижесінде ең үлкен фосфатмобилизациялайтын белсенділікті 120 сағат ішінде қоректік ортада 100 % фосфорды еріткен *Bacillus megaterium* FT1 жаңа штамм көрсетті. *Bacillus spp.* FT2 и *Serratia plymuthica* Nl1 штамдарында еріген фосфордың шығуы 168 сағат ішінде 50,0 5 және 54,2 % құрады.

Кілт сөздер: биотыңайтқыш, микроорганизм, моноизолят, штамм, идентификация, фосфатмобилизациялайтын бактерия, топырақ, өнімділік.

N.K. Zhappar, V.M. Shaikhutdinov, B.M. Myrzabayev,
K.A. Zeinelov, A.K. Shibayeva, L. Zh. Bairon

Isolation and study of promising strains of phosphate-mobilizing microorganisms for the creation of biofertilizer

The article describes the process of isolation and study of strains of phosphate-mobilizing microorganisms. As a result of soil analysis, the selected 9 samples contain a sufficient amount of total nitrogen, humus and mobile phosphorus compounds for the development of microorganisms. As a result of the isolation of phosphate-mobilizing microorganisms, 23 mono-isolates were selected. After incubation of the flasks, analyzes for the content of dissolved phosphorus and pH in the culture media were carried out. As a result, the highest content of dissolved phosphorus was obtained by incubation of monoisolates No. 9 and 20, which were 3.57 g/l and 2.55 g/l, respectively. Also, the pH of the medium in these monoisolates showed the lowest values: 5.4 and 5.7, respectively. Monoisolates No. 9 and 20 are named FT1 and FT2, respectively. Based on physiological and biochemical studies, isolated monoisolates were identified as *Bacillus megaterium* FT1 and *Bacillus* sp. FT2. As a result of studying phosphate-mobilizing activity in the isolated strains of soil phosphate mobilizing microorganisms and the collection strain, the new strain of *B. megaterium* FT1 showed the highest phosphate mobilizing activity, where 100 % of phosphorus in the medium were dissolved within 120 hours. The yield of dissolved phosphorus in the medium with the strains of *Bacillus* spp. FT2 and *Serratia plymuthica* Nl1 were 50.0 5 and 54.2 %, respectively, for 168 hours.

Keywords: biofertilizer, microorganism, monoisolate, strain, identification, phosphate-mobilizing bacterium, soil, productivity.

References

1 Poslanie Prezidenta Respubliki Kazakhstan N. Nazarbaeva narodu Kazakhstana. «Tretia modernizatsiia Kazakhstana: hlobalnaia konkurentosposobnost» ot 31 yanvaria 2017 hoda [Message from the President of the Republic of Kazakhstan N. Nazarbayev to the people of Kazakhstan. «The Third Modernization of Kazakhstan: Global Competitiveness» dated January 31,

2017]. *www.akorda.kz* Retrieved from: http://www.akorda.kz/ru/addresses/addresses_of_president/poslanie-prezidenta-respubliki-kazahstan-nnazarbaeva-narodu-kazahstana-31-yanvarya-2017-g [in Russian].

2 Crotty, F.V., Fychan, R., Sanderson, R., Rhymes, J.R., Bourdin, F., & Scullion J. (2016). Understanding the Legacy Effect of Previous Forage Crop and Tillage Management on Soil Biology, after Conversion to an Arable Crop Rotation. *Soil Biology and Biochemistry, 103,* 241–252.

3 Sattar, A., Naveed, M., Ali, M., Zahir, A., Nadeem, M.S., & Yaseen, M. Perspectives of Potassium Solubilizing Microbes in Sustainable Food Production System: A Review. *www.researchgate.net* Revrieved from https://www.researchgate.net/publication/327776810_Perspectives_of_potassium_solubilizing_microbes_in_sustainable_food_production_system_A_review.

4 Muriu-Ng'ang'a, F.W., Mucheru-Muna, M., Waswa, F. & Mairura, F.S. (2017). Socio-Economic Factors Influencing Utilisation of Rain Water Harvesting and Saving Technologies in Tharaka South, Eastern Kenya. *Agricultural Water Management, 194,* 150–159.

5 *HOST 28168–89. Pochvy. Otbor prob [State standard 28168–89. Soil. Sampling]* [in Russian].

6 *HOST 26425–85. Pochva. Metod opredeleniia ionov khlorida v vodnoi vytiazhke [State Standard 26425–85. The soil. Method for the determination of chloride ions in an aqueous extract]* [in Russian].

7 Aleksandrova, L.N., & Najdenova, O.A. (1986). *Laboratorno-prakticheskie zaniatiia po pochvovedeniiu [Laboratory and practical classes in soil science]*. Leningrad: Nauka [in Russian].

8 Yasmin, H., & Bano, A. (2011). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil of weeds of khewra salt range and attock. *Pakistan Journal of Botany, 3,* 1663–1668.

9 *HOST 26211–91. Pochvy. Opredelenie podvizhnykh soedinenii fosfora po metodu Arreniusa v modifikatsii VIUA [State standard 26211–91. Soils. Determination of mobile compounds of phosphorus by Arrhenius method modified by VIUA]* [in Russian].

10 Netrusova, A.I. (2005). *Praktikum po mikrobiolohii [Microbiology Practicum]*. Moscow: Akademiia [in Russian].