УДК 579.64: 631.46

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЧВЕННЫХ ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Н. А. БЕЛЯСОВА, О. С. ИГНАТОВЕЦ, Д. С. СЕРГИЕВИЧ, А. Ф. МИНАКОВСКИЙ

УО «Белорусский государственный технологический университет»,
г. Минск, Беларусь, 220006

В. Н. БОСАК, Т. В. САЧИВКО

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Беларусь, 213407, e-mail: bosak1@tut.by

(Поступила в редакцию 29.03.2018)

Фосфор относится к основным питательным элементам, обеспечивающим благоприятное влияние на рост и развитие растений, ускорение образования репродуктивных органов и созревание растений, формирование высоких и устойчивых урожаев сельскохозяйственных культур с благоприятным качеством товарной продукции. Наибольшую питательную ценность для культурных растений имеют легкоусвояемые соединения фосфора из почвы и удобрений.

Одним из перспективных направлений улучшения фосфорного питания сельскохозяйственных культур является биологическая фосфатмобилизация с помощью почвенных микроорганизмов (бактерий, актиномицетов, мицелиальных грибов), способствующая переводу труднорастворимых соединений фосфора из почвы и удобрений в доступные для высших растений формы.В результате полевых и лабораторных исследований изучены возможности применения почвенной и глюкозо-аммонийной вытяжек для выделения из ризосферной дерново-подзолистой почвы различных регионов Республики Беларусь аборигенных почвенных микроорганизмов, обладающих способностью эффективно переводить труднорастворимые фосфаты из почвы и удобрений в доступные для растений соединения. В исследованиях установлено 140 штаммов фосфатмобилизующих бактерий, 8 штаммов актиномицетов и 8 штаммов мицелиальных грибов, среди которых наибольшая мобилизация фосфора отмечена у двух штаммов бактерий.

Ключевые слова: *фосфор, биологическая фосфатмобилизация, почвенные микроорганизмы, бактерии, актиномицеты, мицелиальные грибы.*

Phosphorus belongs to the main nutrients, which provide a favorable effect on the growth and development of plants, the acceleration of formation of reproductive organs and the maturation of plants, the formation of high and stable crop yields with a favorable quality of marketable products. Easily digestible phosphorus compounds from soil and fertilizers have the highest nutritional value for cultivated plants.

One of the promising directions for improving the phosphorus nutrition of crops is biological phosphate mobilization with the help of soil microorganisms (bacteria, actinomycetes, filamentous fungi), which facilitates the transfer of hardly soluble phosphorus compounds from soil and fertilizers to forms accessible to higher plants. In field and laboratory studies, we examined the possibility of application of soil and glucose-ammonium extracts for the separation from rhizosphere sward-podzolic soils of different regions the Republic of Belarus of native soil microorganisms that have the ability to effectively transfer poorly soluble phosphates from the soil and fertilizers into compounds available for plants. In the research, we have established 140 strains of phosphate-mobilizing bacteria, 8 strains of actinomycetes and 8 strains of mycelial fungi, among which the greatest mobilization of phosphorus was observed in two strains of bacteria.

Key words: *phosphorus, biological phosphate mobilization, soil.*

Введение

Фосфор относится к основным питательным макроэлементам, который входит в состав таких важных макромолекул, как ДНК, РНК, АТР, фосфолипиды и некоторые коферменты. Фосфор, влияет на многие биохимические процессы в растениях. При его недостатке в растениях тормозится синтез белков и углеводов, происходит задержка роста, наблюдается заметное снижение урожая. При достаточном содержании фосфора ускоряется рост и развитие растений, образование репродуктивных органов и созревание растений, увеличивается урожайность и качество сельскохозяйственных культур [1–4].

Дерново-подзолистые почвы, преобладающие в нашей стране, содержат от 0,06 (песчаные) до 0,16 % (суглинистые) валового фосфора. При этом большая его часть представлена в виде труднодоступных органических и минеральных соединений. Сельскохозяйственные культуры используют лишь небольшую часть подвижных почвенных фосфатов, устойчивость и доступность которых зависит от кислотности почвы, активности разных катионов (прежде всего Ca, Mg, Al, Fe), применения удобрений, известкования и ряда других факторов [5–9].

Наибольшую ценность для питания растений представляют подвижные, т. е. растворимые соединения фосфора. К этой группе относятся различные формы почвенных фосфатов, участвующих в динамическом равновесии между твердыми фазами почвы и ее раствором, т. е. в процессах взаимоперехода фосфора из твердых фаз в раствор. Степень доступности для растений подвижных фосфатов зависит от химических, физико-химических, физических свойств данного типа почвы, сезонной динамики ее водного, воздушного и теплового режимов, биологической активности почв, биологических особенностей произрастающих растений и прочих факторов [2, 7].

Повышение доступности труднорастворимых фосфатов почвы для растений может обеспечить биологическая фосфатмобилизация за счет почвенной микрофлоры, а также при использование бактериальных удобрений на основе фосфатмобилизующих бактерий [10–22].

Однако почвенных запасов доступных соединений фосфора не всегда достаточно для сбалансированного питания растений. Классическим методом повышения концентрации легкодоступного водораствормого фосфора в зоне ризосферы сельскохозяйственных растений является внесение фосфорных удобрений в виде растворимых солей ортофосфорной кислоты. Однако данные удобрения имеют высокую себестоимость, которая обусловлена использованием импортного сырья, а также больших количеств серной или азотной кислоты при их переработке [1–4, 7].

Внесение недорогих низкосортных фосфоритов не может обеспечить фосфором сельскохозяйственные растения, т. к. фосфаты в них находятся в труднорастворимых соединениях. Наиболее выгодным и экологически безопасным приемом активации низкосортных фосфоритов является применение микроорганизмов, способных высвобождать фосфаты из низкосортных фосфоритов в почвенный раствор в пределах ризосферной зоны сельскохозяйственных культур. Большинство видов фосфатмобилизующих бактерий благотворно влияют на рост и развитие растения. Это происходит в силу нескольких причин: выделение микроорганизмами витаминов и фитогормонов, продукция ими антибиотиков, ингибирующих развитие патогенов; перевод минеральных элементов в доступную для растений форму [10–22].

Таким образом, исследование биоразнообразия почвенных бактерий и влияния их на эффективность применения дешевых минеральных удобрений могут привести к существенному снижению затрат на покупку удобрений, экологизацию сельского хозяйства, а также увеличению урожайности различных сельскохозяйственных культур. При этом необходимо получение всесторонней информации об условиях и скорости высвобождения фосфатов, механизмах активации низкосортных фосфоритов, конкурентоспособности применяемых микроорганизмов, а также о факторах, обеспечивающих преимущественное развитие аборигенных фосфатмобилизующих микроорганизмов в почве.

Цель исследования – выделить и провести оценку аборигенных почвенных фосфатмобилизующих микроорганизмов.

Основная часть

Исследования по изучению фосфатмобилизующих почвенных микроорганизмов проводили в модельных полевых и лабораторных опытах в УО «Белорусский государственный технологический университет» в 2015–2017 гг.

В исследовании использованы штаммы микроорганизмов, обладающие способностью эффективно переводить почвенные фосфаты в доступные для растений соединения. Штаммы микроорганизмов были выделены из ризосферы сельскохозяйственных растений, произрастающих на дерново-подзолистых почвах в пяти контрольных точках (Кобринский район – образец № 1, Минский район – образцы № 2 и 3, Молодечненский район – образцы № 4 и 5) (табл. 1).

Таблица 1. **Характеристика исследуемых фосфатмобилизующих микроорганизмов**

Штамм	Морфологические и физиолого-биохимические признаки
Xantomonas sp. ВП.6	Грамотрицательные неспорообразующие, подвижные палочки, обладающие слабой каталазной и оксидазной активностью, образующие пигментированные (оранжевые) колонии.
Pseudomonas sp. НВП.2.XVII	Грамотрицательные, подвижные, неспорообразующие палочки, обладающие оксидазной и каталазной активностью.
Penicillium sp. G1.1	Мицелиальные почвенные грибы
Aspergilus sp. G2.T	Мицелиальные почвенные грибы

Для выделения почвенных микроорганизмов реализовывали два подхода: первый заключался в создании элективных условий, обусловленных отсутствием в питательной среде водорастворимых фосфатов, для чего в качестве единственного источника фосфора использовали фосфатную руду Вятско-Камского месторождения, отмытую от водорастворимых фосфатных примесей и GAA среду;

второй заключался в использовании в качестве среды для выделения – почвенной вытяжки с добавлением в нее фосфатной руды.

Использование почвенной вытяжки обусловлено тем, что она целиком отвечает потребностям почвенных микроорганизмов в содержании питательных веществ.

Результат сравнения подходов к выделению почвенных фосфатмобилизующих микроорганизмов представлен в табл. 2.

Таблица 2. **Эффективность выделения фосфатмобилизующих микроорганизмов при использовании различных подходов**

Проба почвы	Выделено штаммов микроорганизмов			
	почвенная вытяжка		глюкозо-аммонийная вытяжка	
	бактерии	мицелиальные грибы	бактерии	мицелиальные грибы
Образец № 1	23	2	16	–
Образец № 2	18	1	15	1
Образец № 3	22	2	23	1
Образец № 4	6	–	5	1
Образец № 5	6	–	6	–

На основе полученных данных сравнения альтернативных подходов к выделению почвенных фосфатмобилизующих микроорганизмов, можно сделать вывод о том, что глюкозо-аммонийная среда может быть использована в качестве замены почвенной вытяжки при выделении почвенных микроорганизмов.

В ходе исследования выделено и расчищено: 140 штаммов бактерий, 8 штаммов актиномицетов и 8 штаммов почвенных мицелиальных грибов.

На следующем этапе необходимо было произвести отбор и характеристику выделенных микроорганизмов. Важнейшим критерием отбора являлась способность к мобилизации фосфата из различных нерастворимых соединений.

Образование «прозрачных гало» вокруг колоний фосфатмобилизующих микроорганизмов является общепринятым критерием, для быстрого отбора фосфатмобилизующих микроорганизмов и проведения предварительной оценки их активности.

В ходе проведения эксперимента оказалось, что использование почвенной вытяжки затрудняет последующее выявление наличия «прозрачных гало» вокруг колоний. Кроме того, при пересеве колоний, выделенных микроорганизмов на почвенной вытяжке, на синтетическую глюкозо-аммонийную среду, некоторые культуры не образовывали колоний или демонстрировали замедленный рост, что обусловлено возможным наличием в почвенной вытяжке факторов роста и водорастворимого фосфата. Поэтому от ее использования в дальнейшем пришлось отказаться.

На рисунке видны «прозрачные гало», образующиеся вокруг колоний фосфатмобилизующих бактерий (ФМБ) на GAA среде, содержащей фосфат кальция в качестве единственного источника фосфора.

Рис. Зоны просветления образованные вокруг фосфатмобилизующих бактерий

Таким образом, из 140 выделенных ранее штаммов почвенных бактерий мы отобрали 65 изолятов, обладающих способностью к мобилизации фосфата. Практически все выделенные мицелиальные грибы (6 из 8 штаммов) обладали способностью мобилизовать фосфат из фосфата кальция.

Интересным оказался тот факт, что абсолютное большинство 39 из 65 отобранных штаммов оказались выделенными в элективных условиях, при использовании GAA среды. Более того лишь 16 из 65 штаммов выделены из проб почв, вовлеченных в сельскохозяйственный оборот. Для того чтобы в дальнейшем сузить круг используемых в исследовании культур и отобрать наиболее активные фосфатмобилизующие микроорганизмы, мы сочли возможным воспользоваться значением индекса растворимости фосфата (отношении диаметра зоны просветления к диаметру колонии микроорганизма). Для этого основываясь на значении индекса, отобранные изоляты, разделили на две группы: к первой группе относятся микроорганизмы, которые показали индекс растворимости фосфата более 1,5, таких оказалось 6 штаммов бактерий и 3 штамма мицелиальных грибов; остальные относятся ко второй группе, у них индекс растворимости фосфата < 1,5.

Наибольший интерес для дальнейших исследований представляли микроорганизмы, относящиеся к первой группе.

В табл. 3 представлены результаты оценки фосфатмобилизующей активности, микроорганизмов, относящихся к первой группе, т.е. показавших наибольший индекс растворимости фосфата.

Таблица 3. **Фосфатмобилизующая активность микроорганизмов**

Штамм	Диаметр «медальона», $d_м$ мм	Диаметр «гало», $d_г$ мм	Индекс растворимости фосфата, $d_г/d_м$
НВП.2.XVII	4	14	3,5±0,9
НВП.1.V	4	11	2,7±0,7
ВП.6	7	12	1,7±0,6
НВП.2.XXI	6	10	1,7±1,0
НВП.2.XIV	5	8	1,6±0,9
НВП.2.XXII	5	8	1,6±1,0
G1.1	6	16	2,7±0,9
G2.T	5	12	2,4±0,8
G4.F	6	12	1,5±0,8

Из табл. 3 видно, что наибольшей активностью обладают бактериальные штаммы НВП.2.XVII, НВП.1.V, ВП.6, НВП.2.XXI с индексом растворимости фосфата от 3,5 до 1,7. При этом выделенные мицелиальные грибы показали индекс растворимости фосфата в том же диапазоне, что и бактериальные штаммы. Примечательно, что при внесении в состав плотной среды фосфоритов, не наблюдалось появление зон просветления даже при культивировании наиболее активных микроорганизмов более 10 суток. Возможно, это связанно с присутствием в составе фосфоритов большого количества примесей, не поддающихся микробной трансформации, но придающих питательной среде мутность. Так как образование зон просветления вокруг колоний микроорганизмов не является единственно верным признаком, позволяющим отобрать активные фосфатмобилизующие штаммы микроорганизмов и произвести оценку активности выделенных штаммов микроорганизмов по отношению к низкосортным фосфоритам, нами осуществлен подбор более информативного метода, позволяющего достоверно определить в динамике количество высвобождаемого фосфата из низкосортных фосфоритов под воздействием выделенных микроорганизмов.

Подобранный метод заключается в культивировании фосфатмобилизующих бактерий в присутствии сырья, содержащего труднорастворимые фосфориты, и последующем определении количества накопленного растворимого фосфата в культуральной жидкости.

В первый день культивирования количество растворенного фосфата приблизительно совпадает с таковым в контрольном образце. При дальнейшем инкубировании посевов происходит накопление растворимого фосфата в пробах инокулированых исследуемыми микроорганизмами в гораздо большем количестве, чем в контрольном образце. Рост количества фосфата в контроле можно объяснить протеканием в нем естественных физико-химических процессов, связанных с частичной диссоциацией различных труднорастворимых и примесных растворимых соединений фосфора. При культивировании выделенных бактерий штаммов ВП.6, НВП.2.XVII и НВП.1.V, а также мицелиальных грибов штамма G 1.1 по прошествии 3-х суток культивирования удается достоверно определить различие количества растворенного фосфора в пробе, содержащей исследуемые микроорганизмы и контроле. Благодаря этому свойству удалось отобрать наиболее перспективные фосфатмобилизующие штаммы почвенных микроорганизмов для дальнейших исследований. Для снижения погрешности, связанной с необходимостью разбавления проб при измерении высоких концентраций фосфата, и снижения затрат времени при проведении эксперимента дальнейшие исследования проводили только при инкубирования посевов с фосфоритом в течение 3-х суток.

При сравнении двух методов заметно некоторое несоответствие полученных результатов: при исследовании динамики накопления растворимого фосфата в жидкой среде наиболее активным штаммом оказался штамм ВП.6, показавший лишь четвертый результат при проверке активности на плотной GAA среде с использованием фосфата кальция. Вместе с тем штамм, показавший наибольший индекс растворимости фосфата (НВП.2.XVII), после культивирования на жидкой среде оказался лишь третий. Причина может быть связана с различной доступностью для мобилизации соединений, являющимися источниками нерастворимого фосфата.

На основе данных, представленных выше, для дальнейших исследований, связанных с изучением влияния различных компонентов питательной среды на рост и мобилизацию фосфата, в качестве тест-культур выбраны штаммы бактерии ВП.6 и НВП.2.XVII, отличающиеся высокой активностью в жидкой среде.

Заключение

Одним из перспективных направлений улучшения фосфорного питания растений является использование аборигенных фосфатмобилизующих микроорганизмов (бактерии, актиномицеты, мицелиальные грибы), обеспечивающих биологическую мобилизацию труднодоступных почвенных фосфатов, а также активацию низкосортных фосфоритов.

В результате исследований из ризосферной дерново-подзолистой почвы, отобранной в разных регионах Республики Беларусь, с использованием почвенной и глюкозо-аммонийной вытяжек выделено 140 штаммов аборигенных фосфатмобилизующих бактерий, 8 штаммов актиномицетов и 8 штаммов мицелиальных грибов, среди которых наибольшая мобилизация фосфора отмечена у штаммов бактерии ВП.6 и НВП.2.XVII.

ЛИТЕРАТУРА

1. Босак, В. Н. Оптимизация питания растений / В. Н. Босак. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. – 203 с.

2. Вильдфлуш, И. Р. Фосфор в почвах и земледелии Беларуси / И. Р. Вильдфлуш, А. Р. Цыганов, В. В. Лапа. – Минск: Хата, 1999. – 196 с.

3. Козловская, И. П. Производственные технологии в агрономии / И. П. Козловская, В. Н. Босак. – М.: Инфра–М, 2016. – 336 с.

4. Справочник агронома / И. Р. Вильдфлуш [и др.]. – Горки: БГСХА, 2017. – 315 с.

5. Агроэкономическая эффективность применения минеральных удобрений и Фитостимофоса при возделывании сельскохозяйственных культур / В. Н. Босак [и др.] // Вестник БГСХА. – 2011. – № 1. – С. 76–79.

6. Биологическая активность дерново-подзолистой супесчаной почвы в зависимости от обеспеченности подвижным фосфором / Н. А. Михайловская [и др.] // Почвоведение и агрохимия. – 2011. – № 1. – С. 243–252.

7. Кулаковская, Т. Н. Оптимизация агрохимической системы почвенного питания растений / Т. Н. Кулаковская. – М.: Агропромиздат, 1990. – 219 с.

8. Рекомендации по оптимизации фосфорного и калийного статуса пахотных почв в зависимости от уровня интенсификации земледелия по областям и районам Беларуси / И. М. Богдевич [и др.]; Ин-т почвоведения и агрохимии. – Минск, 2008. – 28 с.

9. Bosak, V. Changes of potassium and phosphorus content of Podzoluvisol in long-term experiment on fertilizer application / V. Bosak, A. Smeyanovich // Archives of Agronomy and Soil Science. – 2003. –Vol. 49. – P. 101–103.

10. Новые штаммы фосфатмобилизующих бактерий, продуцирующих ауксин, перспективных для сельскохозяйственной биотехнологии / Л. Кузьмина [и др.] // Известия Уфимского НЦ РАН. – 2015. – №1 – С. 40–46.

11. Применение диазотрофных и фосфатмобилизующих бактериальных препаратов при возделывании основных сельскохозяйственных культур / Т. Ф. Персикова [и др.]. – Горки: БГСХА, 2003. – 28 с.

12. 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.

13. Способ оптимизации фосфатного режима почвы при возделывании сельскохозяйственных культур / В. Н. Босак, Г. В. Сафронова, З. М. Алещенкова, О. Н. Минюк // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2016. – Т. 8. – С. 148–162.

14. Трансформация водонерастворимых почвенных фосфатов микроорганизмами / Г. В. Сафронова, З. М. Алещенкова, Н. В. Мельникова, Е. В. Васина // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – Минск: Беларуская навука, 2011. – С. 192–210.

15. Benitez-Nelson, C. R. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems / C. R. Benitez-Nelson // Earth-Science Reviews. – 2000. – Vol. 51. – P. 109–135.

16. Bosak, V. Einfluss der Mineral- und Bakteriendünger auf die Phosphordynamik im Podzoluvisol / V. Bosak, T. Sachyuka // Mitteilungen Agrarwissenschaften. – 2017. – Nr. 31. – S. 68–71.

17. Deepshikha, T. Phosphate solubilising microorganisms: role in phosphorus nutrition of crop plants / T. Deepshikha, K. Rajesh, S. Vineet. // Agricultural Review. – 2014. – Vol. 35. – P. 159–171.

18. Harris, J. N. Laboratory tests can predict beneficial effects of phosphate solubilising bacteria on plants / J. N. Harris, P. B. New, P. M. Martin // Soil Biology and Biochemistry. – 2006. – Vol. 38. – P. 1521–1526.

19. Kolowith, L. C. Composition and cycling of marine organic phosphorus / L. C. Kolowith, E. D. Ingall, R. Benner // Limnology and Oceanography. – 2001. – Vol. 46. – P. 309–320.

20. Mehrvarz, S. Effect of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield components of *Hordeum vulgare* L. / S. Mehrvarz, M. R. Chaichi, H.A. Alikhani // American-Eurasian Journal Agricultural & Environmental Science. – 2008. – Vol. 3. – P. 822–828.

21. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils / S. B. Sharma [et al.] // Springer Plus. – 2013. – №2. – P. 587–601.

22. Solubilization of inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere / H. J. Son [et al.] // Bioresource Technology. – 2006. – Vol. 97. – P. 204–210.