

УДК 579.64:631.46

И.Э. Смирнова\*, А.К. Саданов,  
С.А. Айткельдиева, А.Ж. Султанова, А.А. Сабденова

Институт микробиологии и вирусологии, Республика Казахстан, г. Алматы

\*E-mail: iesmirnova@mail.ru

### Подбор среды культивирования для фосфатмобилизирующих бактерий

Проведен подбор среды культивирования для вновь выделенных фосфатмобилизирующих бактерий – отдельных штаммов и ассоциаций. Подбор осуществлялся по модифицированной методике Сэги среди основных и специальных питательных сред, рекомендованных для культивирования фосфатмобилизирующих микроорганизмов: РПБ, среда Муромцева и NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium). В качестве контроля использовалась чистая жидкая среда Муромцева без инокулята. Фосфатмобилизирующую активность бактерий оценивали количественно по диаметру зон гало без вычета диаметра лунки и выражали в мм. Максимальное накопление биомассы отмечали при культивировании бактерий на среде РПБ, максимальная активность к мобилизации фосфатов отмечена при культивировании на среде NBRIP. Для промышленного производства биомассы фосфатмобилизирующих бактерий рекомендована среда NBRIP.

**Ключевые слова:** фосфатмобилизирующие бактерии, активность, питательная среда.

I.E. Smirnova, A.K. Sadanov, S.A. Aitkeldiyeva, A.Zh. Sultanov, A.A. Sabdenova

#### Selection of culture medium for phosphate solubilizing bacteria

Culture medium for the newly isolated phosphatemobilizing bacteria – individual strains and associations – has been selected. Selection was carried out on the modified Szegimethod among recommended for the cultivation of phosphatemobilizing microorganisms basic and special culture media such as FPB, Muromtsev medium and NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium). Pure liquid Muromtsev medium without inoculum has been used as a control. Phosphatemobilizing bacterial activity was quantified by the diameter of the halo regions without deducting diameter wells and expressed in mm. Maximum biomass accumulation observed when cultivated bacteria on FPB, the maximum activity for the mobilization of phosphates marked when cultivated on NBRIP. NBRIP is recommended for the industrial production of biomass phosphate mobilizing bacteria.

**Key words:** phosphate mobilizing bacteria, activity, culture medium.

И.Э. Смирнова, А.К. Саданов, С.А. Айткельдиева, А.Ж. Султанова, А.А. Сабденова

#### Фосфатмобилиздеуші бактериялар үшін бақылау орталарын таңдау

Жаңадан бөлінген фосфатмобилиздеуші бактериялар – бөлек штамдар мен ассоциациялар үшін қоректік орта іріктелген. Іріктеу жұмыстары фосфатмобилиздеуші микроорганизмдерді өсіру үшін ұсынылған негізгі және арнаулы БПС, Муромцев ортасы және NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) секілді қоректік орталардың арасында өзгертілген Сэги әдіс-темесі бойынша жүргізілді. Бақылау ретінде инокуляты қосылмаған таза сұйық Муромцев ортасы қолданылды. Бактериялардың фосфатмобилиздеу белсенділігін сандық әдісімен шұңқырдың диаметрін алмай, гало аймақтың диаметрі бойынша белгіленіп, мм-де көрсетілді. Биомасса өсуінің ең жоғары көрсеткіштері бактерияларды БПС ортасында өсіргенде байқалды, ал бактериялардың фосфатты мобилизациялауға ең жоғары белсенділігі NBRIP ортасында өсіргенде белгіленді. Фосфатмобилиздеуші бактериялар биомассасын өнеркәсіптік өндірісте шығару үшін NBRIP ортасы ұсынылды.

**Түйін сөздер:** фосфатмобилиздеуші бактериялар, белсенділік, қоректік орта.

Фосфор является одним из важнейших минеральных элементов в жизни растений, которые способны его поглощать только в неорганической форме, преимущественно в виде фосфат-анионов [1]. Несмотря на высокое содержание общего фосфора в почве, его биодоступность является лимитирующим фактором роста, развития и продуктивности растений, это явление называется многими авторами как «фосфорный парадокс» [2, 3]. Так, концентрация доступного для растений фосфора в почвенном растворе составляет около 1 мМ и редко достигает 10 мМ [4]. В сельском хозяйстве как основной отрасли, потребляющей фосфорные соединения, проблема дефицита доступного фосфора в почве решается путем регулярного внесения минеральных удобрений. Однако только 10-15% вносимых фосфорных удобрений ассимилируется растениями, а большая часть их переходит в труднодоступную для растений форму или вымывается с грунтовыми водами [5]. Альтернативой чрезмерного использования фосфорных удобрений для повышения урожайности сельскохозяйственных культур является мобилизация фосфатов из нерастворимых соединений за счет использования фосфатмобилизирующих микроорганизмов, способных переводить нерастворимые фосфаты из удобрений, почвы в растворимую форму. Существует большое количество исследований, посвященных проблеме повышения доступности труднорастворимых фосфатов путем использования фосфатмобилизирующих микроорганизмов и созданию на их основе биопрепаратов для сельского хозяйства [6-11]. Однако на казахстанском рынке отечественных препаратов не представлено. Поэтому разработка биопрепаратов на основе штаммов фосфатмобилизирующих бактерий, приспособленных к почвенно-климатическим условиям Республики, является актуальной задачей.

Для обеспечения экономической целесообразности разработки новых биопрепаратов на основе фосфатмобилизирующих микроорганизмов необходима относительная простота и малая энергоемкость технологического процесса их производства, то есть получение высокого выхода биомассы микроорганизмов с единицы субстрата. С этой целью необходимо провести исследования по подбору питательных сред для культивирования фосфатмобилизирующих бактерий, на которых возможно получение максимального выхода биомассы бактерий сочетаясь с их высокой фосфатмобилизую-

щей активностью. Это и послужило задачей данного исследования.

## Материалы и методы

Объектами исследований служили новые штаммы фосфатмобилизирующих бактерий, выделенные из почв южных областей Казахстана в 2012 году. Для исследований были отобраны 4 наиболее перспективных штамма: Б1, К2, Саp1, Саp2 и две ассоциации, одна из которых – природная, другая – искусственно созданная. Природная микробная ассоциация включает три штамма: Саp 1, Саp 2 и Саp 3. Штамм Саp 3 присутствует в ассоциации бактерий, но не выделяется в отдельную монокультуру. Для создания искусственной ассоциации все исследуемые штаммы фосфатмобилизирующих бактерий смешивали в пропорции объемов 1:1.

Молекулярно-генетическое исследование и секвенирование фрагментов нуклеотидной последовательности 16S-РНК показало, что штаммы относятся к родам *Bacterium*, *Arthrobacteri* *Bacillus*.

После хранения культур в коллекции лаборатории, их восстановление и активацию роста проводили на среде жидкой Муромцева на качалке (180 об/мин) при температуре 25-27<sup>0</sup> С в течение 3 суток. В качестве сред культивирования использовали следующие стандартные среды, рекомендованные для выращивания фосфатмобилизирующих бактерий:

1. РПБ – готовая форма;

2. Среда Муромцева:

глюкоза – 10 г/л

аспарагин – 1 г/л

Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> – 5г/л

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,2 г/л,

MgSO<sub>4</sub> – 0,2 г/л

кукурузный экстракт – 0,02 г/л

pH среды – 6,8;

3. Среда NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium), ранее не используемая в наших исследованиях, применяемая для культивирования фосфатмобилизирующих бактерий в ведущих странах мира [12].

Способность штаммов к мобилизации неорганических фосфатов оценивали на твердой среде Муромцева по модифицированной нами методике Сэги [13]. Выращивание бактерий проводили на жидких средах в колбах на качалке при 180 об/мин и температуре 25<sup>0</sup>С в течение 5 суток. Далее готовилась среда Муромце-

ва с внесением агар-агара в количестве 20 г/л. В чашки Петри разливали агаризованную среду и после застывания в агаре пробивали лунки, куда вносили равное количество суспензии бактерий, выращенных на разных средах с одинаковым титром клеток. После этого чашки Петри ставили в термостат при 280°С и выдерживали до появления четких зон гало вокруг лунок (приблизительно 2-3 суток). В качестве контроля использовали чистую среду того же состава (рисунок 1).

Фосфатмобилизирующую активность бактерий оценивали количественно по диаметру зон гало без вычета диаметра лунки и выражали в мм.

### Результаты и их обсуждение

Полученные результаты приведены в таблице 1.

Из данных таблицы 1 видно, что штаммы и ассоциации бактерий накапливали на используемых средах высокую биомассу.

**Таблица 1** – Накопление биомассы фосфатмобилизирующими штаммами при росте на различных средах культивирования

Штаммы	Биомасса, ед. ОП		
	Среда NBRIP	Среда РПБ	Среда Муромцева
Сар 1	0,80	1,24	0,47
Сар 2	0,60	1,24	0,42
Б1	0,64	1,41	0,80
К2	0,67	1,23	0,36
Природная ассоциация	0,63	1,27	0,44
Искусственная ассоциация	0,92	1,3	0,82

Показано, что максимум накопления биомассы у всех штаммов отмечали при выращивании на среде РПБ. На среде NBRIP накопление биомассы было несколько ниже, наименьшее накопление биомассы отмечали на среде Муромцева.

Так, для штаммов Сар1 и Сар 2 на среде РПБ биомасса составляло 1,24 ед. ОП, на среде NBRIP – 0,80 и 0,60 ед. ОП и на среде Муромцева – 0,47 и 0,42 ед. ОП, соответственно. Биомасса искусственной ассоциации на среде РПБ составляла 1,3 ед.ОП, на средах NBRIP и Муромцева – 0,92 и 0,82 ед. ОП, соответственно.

Данный способ дает возможность провести сравнение штаммов по активности мобилизации нерастворимых фосфатов в растворимые формы и провести быстрый и точный скрининг высокоактивных форм.

Результаты исследования фосфатмобилизирующей активности штаммов бактерий, выращенных на разных средах, полученные модифицированным луночным методом, представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 следует, что наибольшую активность мобилизации фосфатов отмечали при росте штаммов на среде NBRIP. Несколько

меньшая активность отмечена при росте на среде РПБ. Показано, что на среде РПБ накопление биомассы было наиболее высоким. Так, наибольшую активность фосфатмобилизации отмечали у штаммов Сар2 и Б1 на среде NBRIP, при этом диаметры зоны гало составлял 29,3 и 25,3 мм, на среде РПБ диаметры зоны гало были 19,3 и 23,2 мм, соответственно.

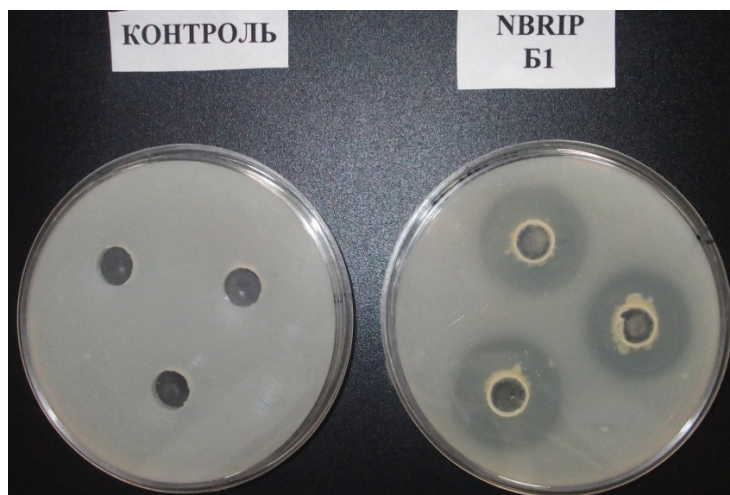
Установлено, что у некоторых штаммов (Сар1, К2) при росте на среде РПБ фосфатмобилизирующей активности не выявлено (рисунок 2.1).

При изучении роста ассоциаций на исследуемых средах установлено, что активность мобилизации фосфатов у обеих ассоциаций была выше на среде Муромцева, чем на среде РПБ. Однако, максимум активности отмечали у природной ассоциации при росте на среде NBRIP.

Таким образом, проведено исследование по подбору оптимальной среды культивирования фосфатмобилизирующих бактерий. Установлено, что максимальное накопление биомассы отмечали при культивировании чистых штаммов и ассоциаций бактерий на среде РПБ. Максимальную активность к мобилизации фосфатов отмечали при выращивании штаммов на сре-

де NBRIP. Поскольку для производства биопрепаратов на основе фосфатмобилизирующих бактерий необходим высокий выход биомассы

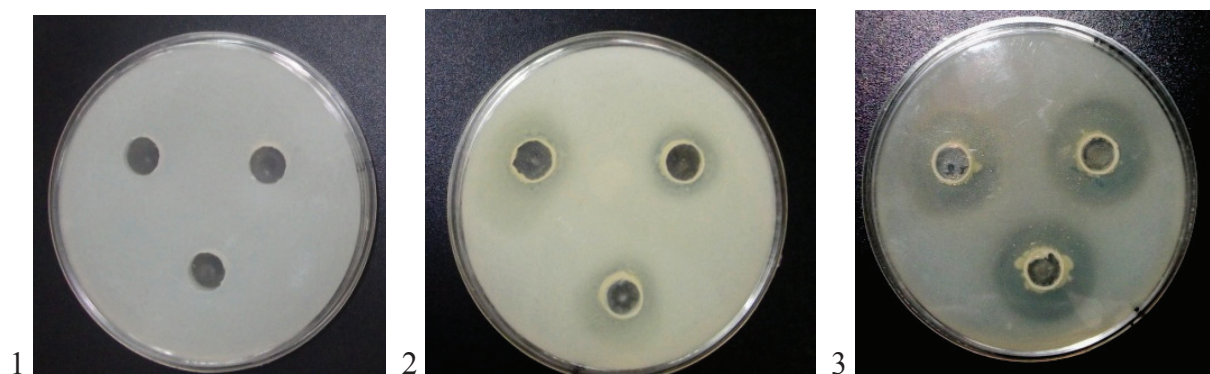
бактерий с высокой фосфатмобилизирующей активностью, то для промышленного выращивания можно рекомендовать среду NBRIP.



**Рисунок 1** – Зоны растворения фосфатов (гало) фосфатмобилизирующими бактериями штамма Б1

**Таблица 2** – Фосфатмобилизирующая активность чистых штаммов и ассоциаций бактерий, выращенных на разных средах

Штаммы	Диаметр зоны гало, мм	
	Среда NBRIP	Среда РПБ
Сар 1	24,7	17,3
Сар 2	29,3	19,3
Б1	25,3	23,2
К2	22,1	18,0
Природная ассоциация	33,3	24,7
Искусственная ассоциация	25,3	23,3



1 – среда РПБ; 2 – среда Муромцева; 3 – среда NBRIP

**Рисунок 2** – Зоны растворения фосфатов (гало) фосфатмобилизирующими бактериями штамм К2



## Литература

- 1 Lambers H., Shane M.W., Cramer M.D., Pearse S.J., Veneklaas E.J. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits // *Ann. Bot.* – 2006. – Vol. 98. – P. 693-713.
- 2 Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London, Academic Press. – 1995. – 889p.
- 3 Lambers H., Chapin F.S., Pons T.L. Plant Physiological Ecology. Second Edition. Springer. – 2008. – 604 p.
- 4 Bielecki R.L. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. // *Ann. Rev.PlantPhysiol.* – 1973. – Vol.24. – P. 225–252.
- 5 Дунайцев И.А. Выделение фосфатсольбилизирующих микроорганизмов и изучение возможности их использования в промышленности и сельском хозяйстве: автореф. ... дисс. канд. биол. наук: 03.02.03;03.01.06. – Оболенск: Наука, 2010. – 29 с.
- 6 Thakuria D., Talukdar N.C., Goswami C., Hazarika S., Boro R.C., Khan M.R. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam // *Curr. Sci.* – 2004. – Vol. 86. – P.978-685.
- 7 Mehrvarz S., Chaichi M.R., Alikhani H.A. Effects of Phosphate Solubilizing Microorganisms and Phosphorus Chemical Fertilizer on Yield and Yield Components of Barely (*Hordeum vulgare L.*) // *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* – 2008. – Vol. 3(6). – P. 822-828.
- 8 Pérez-García A., Romero D., de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological application of *Bacillus* in agriculture // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 22. – P. 1-7.
- 9 Yasmin H., Bano A. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil of weeds of khewra salt range and attock // *Pakistan Journal of Botany.* – 2011. – №3. – P. 1663-1668.
- 10 Khan A.A., Jilani G., Akhtar M.S., Naqvi S., Rasheed M. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production // *J. Agric. Biol. Sci.* 2009. – Vol.1(1). – P. 48-58.
- 11 Vahed H.S., Shahinroksar P., Heydarnezhad F. Performance of phosphate solubilizing bacteria for improving growth and yield of rice (*Oryza Sativa L.*) in the presence of phosphorus fertilizer // *Int. J. Agri. Crop Sci.* – 2012. – Vol. 4(17). – P. 1228-1232.
- 12 Nautiyal C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms // *FEMS Microbiol Lett.* – 1999. – Vol. 170(1). – P. 265-270.
- 13 Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. – М.: Колос, 1983. – 162 с.

## References

- 1 Lambers H., Shane M.W., Cramer M.D., Pearse S.J., Veneklaas E.J. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits // *Ann. Bot.* – 2006. – Vol. 98. – P. 693-713.
- 2 Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London, Academic Press. – 1995. – 889 p.
- 3 Lambers H., Chapin F.S., Pons T.L. Plant Physiological Ecology. Second Edition. Springer. – 2008. – 604 p.
- 4 Bielecki R.L. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. // *Ann. Rev.PlantPhysiol.* – 1973. – Vol.24. – P. 225–252.
- 5 Dunajcev I.A. Vydelenie fosfatsoljubilizirujushih mikroorganizmov i izuchenie vozmozhnosti ih ispol'zovanija v promyshlennosti i sel'skom hozjajstve: avtoref. ... diss. kand. biol. nauk: 03.02.03;03.01.06. – Obolensk: Nauka, 2010. – 29 p.
- 6 Thakuria D., Talukdar N.C., Goswami C., Hazarika S., Boro R.C., Khan M.R. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam // *Curr. Sci.* – 2004. – Vol. 86. – P.978-685.
- 7 Mehrvarz S., Chaichi M.R., Alikhani H.A. Effects of Phosphate Solubilizing Microorganisms and Phosphorus Chemical Fertilizer on Yield and Yield Components of Barely (*Hordeum vulgare L.*) // *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* – 2008. – Vol. 3(6). – P. 822-828.
- 8 Pérez-García A., Romero D., de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological application of *Bacillus* in agriculture // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 22. – P. 1-7.
- 9 Yasmin H., Bano A. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil of weeds of khewra salt range and attock // *Pakistan Journal of Botany.* – 2011. – №3. – P.1663-1668.
- 10 Khan A.A., Jilani G., Akhtar M.S., Naqvi S., Rasheed M. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production // *J. Agric. Biol. Sci.* 2009. – Vol.1(1). – P. 48-58.
- 11 Vahed H.S., Shahinroksar P., Heydarnezhad F. Performance of phosphate solubilizing bacteria for improving growth and yield of rice (*Oryza Sativa L.*) in the presence of phosphorus fertilizer // *Int. J. Agri. Crop Sci.* – 2012. – Vol. 4(17). – P. 1228-1232.
- 12 Nautiyal C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms // *FEMS Microbiol Lett.* – 1999. – Vol. 170(1). – P. 265-270.
- 13 Sjeji J. Metody pochvennoj mikrobiologii. – 1983. – М.: Kolos. – 162 p.