

## ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ШТАМІВ ГРУНТОВИХ ФОСФАТМОБІЛІЗУЮЧИХ БАКТЕРІЙ

*Дніпропетровський національний університет ім. О. Гончара*

Проведено ідентифікацію двох штамів ґрунтових бактерій, здатних до мобілізації слабкорозчинного трикальційфосфату. На основі аналізу морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних ознак штам Б5 віднесено до виду *Pseudomonas putida*, а Т1 – до виду *Enterobacter dissolvens*.

*Ключові слова:* фосфатмобілізуючі бактерії, фізіолого-біохімічні властивості, ідентифікація.

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

*Днепропетровский национальный университет им. О. Гончара*

## ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ ПОЧВЕННЫХ ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Проведена ідентифікація двох штаммов почвенных бактерій, способных к мобилизации малорастворимого трикальцийфосфата. На основании анализа морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков штамм Б5 отнесен к виду *Pseudomonas putida*, а Т1 – к виду *Enterobacter dissolvens*.

*Ключевые слова:* фосфатмобилизирующие бактерии, физиолого-биохимические свойства, идентификация.

K. V. Lavrentyeva, N. V. Cherevach, A. I. Vinnikov

*O. Gonchar Dnipropetrovsk national university*

## PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SOIL BACTERIA STRAINS SOLUBILIZING TRICALCIUM PHOSPHATE

It was identified of soil strains, mobilizing insoluble tricalcium phosphate. On the basis of morphologic, cultural, physiologic and biochemical properties one of these strains (B5) was related to *Pseudomonas putida* and the other (T1) – to *Enterobacter dissolvens*.

*Keywords:* phosphate-mobilizing bacteria, physiological and biochemical properties, identification.

Проблема фосфору – одна з головних у землеробстві, оскільки він є одним із найважливіших елементів живлення рослин (Гуляев, 2004). У ґрунті фосфор знаходиться у важкодоступних для рослин мінеральних та органічних сполуках (Pradhan, Sukla, 2005). Тому розробка агроприйомів, які сприяють його мобілізації і раціональному використанню, особливо важлива для України. Це обумовлено перш за все дефіцитом для рослин розчинних сполук фосфору в ґрунті, а також малою кількістю в країні сировини для виготовлення фосфорних добрив. Вирішити цю проблему можна за допомогою біопрепаратів на основі фосфатмобілізуючих бактерій (Рой, 2001).

Метою роботи було дослідження морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей штамів фосфатмобілізуючих бактерій, здатних до розчинення слабкорозчинного трикальційфосфату і перспективних для створення біодобрив.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами дослідження слугували штами Т1 та Б5 із колекції культур фосфатмобілізуючих бактерій, здатних до розчинення трикальційфосфату, виділених нами із різних типів ґрунтів Дніпропетровської області. З метою встановлення їх родової та видової належності проводили ідентифікацію за вимогами 8-го та 9-го видань Визначника бактерій Бергі з використанням морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних ознак (Определитель бактерий Берджи, 1997; Краткий определитель бактерий Берги, 1980).

Морфологія. Форму клітин вивчали при мікроскопії фіксованих та пофарбованих препаратів у світловому мікроскопі, переглядаючи добові та 7-добові культури, вирощені на м'ясо-

пептонному агарі (МПА) та елективному середовищі Менкіної (Рой, 2001). Фарбування за Грамом проводили, використовуючи найбільш поширений варіант методу в модифікації Хукера (Практикум по мікробіології, 1976).

**Культуральні ознаки.** Колонії мікроорганізмів описували через три доби інкубації при температурі 28 °С на МПА та на елективному середовищі з  $Ca_3(PO_4)_2$ . Наявність пігменту визначали візуально.

**Фізіолого-біохімічні ознаки.** Проведено вивчення 55 фізіолого-біохімічних ознак відібраних штамів. Здатність синтезувати каталазу, ліпазу, лецитиназу, утворювати індол, аміак, рости при температурах 37 °С, 41 °С, 4 °С, рости на агарі з сахарозою (мукоїдний ріст), накопичувати β-гідроксиполібутират, гідролізувати казеїн та крохмаль, утворювати ацетилметилкарбінол (ФП-тест) досліджували за загальноприйнятими методами (Практикум по мікробіології, 1976). Здатність синтезувати пігменти (піоціанін та піовердин), ферменти – уреазу, дезоксирибонуклеазу, гідролізувати желатин, використовувати різні речовини як джерела вуглецю, утворювати сірководень на TSI-агарі та редуруючі речовини із сахарози, відновлювати нітрати до нітритів, розщеплювати глюкозу в аеробних та анаеробних умовах (О/Ф тест), знижувати рН менше ніж 4,2 у середовищі з глюкозою (проба з метиловим червоним), утворювати β-галактозидазу (ОНПГ-тест) вивчали за Герхардтом (Методы общей бактериологии, 1984). Крім того, вивчали здатність синтезувати аргініндегідролазу, лізиндекарбоксилазу, фенілаланіндезаміназу, оксидазу, орнітиндекарбоксилазу (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1980); використовувати валін, аланін, аргінін, тартрат, малонат, оксалат, сукцинат, ацетат, малат, фумарат, рости на агарі Симонса з цитратом (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1980, Справочник по микробиологическим ..., 1982).

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Морфологія.** Клітини обох штамів незалежно від часу культивування фарбувалися за Грамом негативно, були рухомими, не утворювали спор.

Мікроскопія 24-годинних культур, вирощених на МПА, показала, що клітини штаму Б5 мали вигляд прямих середніх за розміром паличок із округлими кінцями, розташованих поодинокі, штаму Т1 – тонких прямих поодиноких паличок.

**Культуральні ознаки.** Форму та властивості колоній вивчали на елективному середовищі з  $Ca_3(PO_4)_2$  та на МПА. При вирощуванні на МПА штами утворювали округлі колонії розміром 2-3 мм з гладенькою блискучою поверхнею, рівним краєм. Колонії штаму Т1 мали жовтуватобілий колір, а колонії штаму Б5 характеризувалися наявністю жовто-зеленого флуоресцюючого пігменту. При вирощуванні на елективному середовищі штаму Т1 утворював непрозорі глянцевої колонії діаметром 1-1,5 мм, тістоподібної консистенції з рівним краєм, а штаму Б5 – точкові, прозорі глянцевої колонії водянистої, рідкої консистенції з рівним краєм.

**Фізіолого-біохімічні ознаки.** Значна частина ознак була ідентичною для обох штамів (табл. 1–5). Вони добре росли на МПА при температурах 28 °С і 37 °С та при 28 °С на середовищі із цитратом Симонса, утворювали аміак, відновлювали нітрат, синтезували каталазу та

Таблиця 1

**Фізіолого-біохімічні ознаки фосфатмобілізуючих бактерій**

Тест-культура	Мукоїдний ріст	Пігмент	Флуоресценція	Піоціанін	Піовердин	Необхідність органічних факторів росту	Використання нітрату як джерела азоту	Денітрифікація	Відновлюючі речовини із сахарози	Утворення індолу	Утворення аміаку	Утворення $H_2S$ на TSI-агарі	Проба з метиловим червоним	Фогеса-Проскауера тест	Цитрат Симонса	Відновлення нітрату	Ріст при температурі 37 °С	Ріст при температурі 41 °С	Ріст при температурі 4 °С	Накопичення β-гідроксиполібутирату
Т1	+	-				-		-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Б5	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-

Примітка. «+» – позитивна реакція, «-» – негативна реакція.

орнітиндекарбоксілазу, як джерело вуглецю використовували етанол, ацетат, малат, сукцинат, fumarat; утворювали кислоту з глюкози, арабінози, ксилози та галактози, а штам Т1 катаболізував ці вуглеводи ще й з утворенням газу. Штами не росли при температурі 4 °С на МПА, не утворювали індолу та сірководню на TSI-агарі, не накопичували β-гідроксиполібутирату, не здійснювали денітрифікації, як джерело вуглецю не використовували тартрату та оксалату, не гідролізували крохмалю, не синтезували ферментів: фенілаланіндезамінази та ліпази. Тести – гідроліз желатини, казеїну та проба з метиловим червоним – були негативними для обох штамів.

Друга частина ознак штамів відрізнялась: ріст на МПА при температурі 41 °С спостерігався в штамі Т1. На відміну від нього Б5 проявляв оксидазну, дезоксирибонуклеазну активності та утворював відновлюючі речовини із сахарози. Штам Т1 був позитивним, а Б5 – негативним за такими ознаками: використання сахарози, рафінози, дульцитоли, інозитоли, сорбітолу, α-метил-Д-глюкозиду, саліцину, лактози, мальтози, трегалози, манітолу як джерело вуглецю, синтез лецитинази, ФП-тест, О/Ф-тест, ОНПГ-тест. Штам Т1 утворював уреазу та аргініндегідролазу, а Б5 – лізиндекарбоксілазу та аргініндегідролазу. Для штаму Б5 були поставлені додаткові тести. Він утворював півердин, як джерело вуглецю використовував L-валін, L-аргінін, β-аланін, не потребував органічних факторів росту та не утворював піціанін.

Таблиця 2

**Синтез ферментів досліджуваними штамми бактерій**

Тест-культура	Оксидаза	Каталаза	Уреаза	Фенілаланіндезаміназа	Лізиндекарбоксілаза	Аргініндигідролаза	Орнітиндекарбоксілаза	Гідроліз желатини	Дезоксирибонуклеаза	Ліпаза	Лецитиназа	ОНПГ-тест	О/Ф-тест	Гідроліз крохмалю	Гідроліз казеїну
Т1	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Б5	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-

Примітка. «+» – позитивна реакція; «-» – негативна реакція.

Таблиця 3

**Використання органічних кислот як єдиного джерела вуглецю**

Тест-культура	Органічні кислоти						
	Тартрат	Малонат	Ацетат	Оксалат	Малат	Сукцинат	Фумарат
Т1	-	+	+	-	+	+	+
Б5	-	+	+	-	+	+	+

Примітка. «+» – позитивна реакція; «-» – негативна реакція.

Аналіз морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних ознак досліджених культур показав, що штам Т1 може бути віднесений до роду *Enterobacter*, виду *dissolvens* на підставі таких характеристик: він був факультативним анаеробом; активно рухався при вирощуванні в МПБ; в аеробних та анаеробних умовах катаболізував глюкозу та інші вуглеводи з утворенням кислоти і газу; давав позитивну реакцію на ацетилметилкарбінол; не синтезував оксидазу, дезоксирибонуклеазу, лізиндекарбоксілазу, фенілаланіндезаміназу ліпазу; утворював аргініндегідролазу, орнітиндекарбоксілазу, сірководень та індол. Штам Б5, який утворював флуоресціюючий пігмент; в аеробних умовах розщеплював глюкозу, арабінозу, ксилозу, манітол; активно рухався при вирощуванні в МПБ; характеризувався дихальним метаболізмом; синтезував аргініндегідролазу, оксидазу; не накопичував полі-β-гідроксиполібутирату, не здійснював денітрифікацію, не давав росту на МПА при температурі 41 °С, віднесено до роду *Pseudomonas*, виду *putida*.

Таблиця 4

## Використання вуглеводів як єдиного джерела вуглецю

Тест-культура	Вуглеводи									
	Глюкоза	Схароза	Рафіноза	Лактоза	Мальтоза	Трегалоза	Галактоза	Арабіноза	Ксилоза	$\alpha$ -метил-Д-глюкозид
T1	к, г	к, г	к, г	к, г	к, г	к, г	к, г	к, г	к, г	к, г
B5	к	–	–	–	–	–	к	к	к	–

Примітка. «+» – позитивна реакція; «–» – негативна реакція; «г» – газоутворення; «к» – кислотоутворення

З літературних джерел відомо, що фосфатмобілізуючі бактерії зустрічаються серед багатьох систематичних груп. Серед грамнегативних бактерій, здатних до розчинення неорганічних фосфатів, описані бактерії родів *Achromobacter* (Токмакова, 1997), *Azotobacter*, *Erwinia* (Ivanova, Bojinova, Nedialkova, 2006), *Xanthobacter*, *Kluyvera* (*Phosphate solubilizing microorganisms ...*, 2000), *Acetobacter*, *Arthrobacter* (*Phosphate solubilizing bacteria ...*, 2006), *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (Storkanova, 1999). Але найбільшу фосфатмобілізуючу активність по відношенню до трикальційфосфату встановлено у бактерій родів *Pseudomonas* (Сидоренко, 2002, *Pseudomonas ceracia ...*, 1999) та *Enterobacter* (Мікробні препарати ..., 2004, Пархоменко, 2003).

Таблиця 5

## Використання спиртів в якості єдиного джерела вуглецю

Тест-культура	Спирти						
	Дульцитол	І-інозитол	Гліцерол	Сорбітол	Манітол	Етанол	Саліцин
T1	к, г	к, г	–	к, г	к, г	к, г	к, г
B5	–	–	–	–	–	к	–

Примітка. «+» – позитивна реакція; «–» – негативна реакція; «г» – газоутворення; «к» – кислотоутворення

У попередніх дослідках нами встановлено, що досліджені штами *Pseudomonas putida* за 5 днів, а *Enterobacter dissolvens* за 1 добу культивування розчиняли відповідно 66 % та 57 % трикальційфосфату при його початковій концентрації в середовищі 5 г/л. Ці показники є досить високими, щоб розглядати досліджені штами як перспективні для створення біодобрив.

## ВИСНОВКИ

У результаті ретельного моніторингу штамів – представників ґрунтової мікрофлори, виділено та відібрано найбільш активні культури, здатні до мобілізації слабкорозчинного трикальційфосфату. На основі аналізу морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних ознак штам B5 віднесено до виду *Pseudomonas putida*, а T1 – до виду *Enterobacter dissolvens*.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Гуляев Б. И. Фосфор как энергетическая основа процессов фотосинтеза, роста и развития растений / Б. И. Гуляев, В. Ф. Патыка // Агроекол. журн. – 2004. – № 2. – С. 3-9.
- Краткий определитель бактерий Берги // Под ред. Хоулта Дж. – М.: Мир, 1980. – 495 с.
- Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Ф. Герхарда и др. – М.: Мир, 1984. – Т. 3. – 264 с.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии / Д. Г. Звягинцев, И. В. Асеева,

И. П. Бабьева, Т. Г. Мирчинк. – М.: МГУ, 1980. – 224 с.

**Мікробні препарати** – важливий компонент біологізації вирощування ярої пшениці / В. П. Патица, Є. П. Копилов, Т. І. Патица, Ю. О. Черницький, С. П. Надкерничий // Агрокол. журн. – 2004. – №4. – С. 3-7.

**Определитель бактерий Берджи**: В 2 т. // Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – 432 с.

**Пархоменко Т. Ю.** Особенности применения биопрепаратов при выращивании томатов // Агрокол. журн. – 2003. – №2. – С. 47-51.

**Практикум по микробиологии** // Под ред. Н. С. Егорова. – М.: МГУ, 1976. – 307 с.

**Рой А. А.** Новые штаммы бацилл, минерализующие органические соединения фосфора / А. А. Рой, Л. В. Булаченко, И. К. Кудриш // Микробиол. журн. – 2001. – 63, № 4. – С. 9-14.

**Сидоренко О. Д.** Исследование возможности применения бакпрепарата Бактосем при возделывании льна-долгунца / О. Д. Сидоренко, С. Л. Белопухов // Тез. докл. II Всерос. конф. «Химия и технология растительных веществ». – Казань, 2002. – С. 136.

**Справочник** по микробиологическим и вирусологическим методам исследования // Под ред. М. О. Биргера. – М.: Медицина, 1982. – 464 с.

**Токмакова Л. Н.** Штаммы *Bacillus polymyxa* и *Achromobacter album* – основа для создания бактериальных препаратов // Микробиол. журн. – 1997. – 59, № 4. – С. 131-138.

**Ivanova R., Vojinova D., Nedialkova K.** Rock phosphate solubilization by soil bacteria // Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. – 2006. – 59, №3. – P. 297-302.

**Phosphate solubilizing bacteria** from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities / Y. P. Chen, P. D. Rekha, A. B. Arun, F. T. Shen, W.-A. Lai, C. C. Young // Applied Soil Ecology. – 2006. – 34, № 1. – P. 33-41.

**Phosphate solubilizing microorganisms** associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon / P. Vasquez, G. Holguin, M. Puente, Lopez A. Cortes, Y. Bashan // Biology and Fertility of Soils. – 2000. – 30, № 5-6. – P. 460-468.

**Pradhan N., Sukla L. B.** Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil // African Journal of Biotechnology. – 2005. – 5, № 10. – P. 850-854.

**Pseudomonas cepacia** – mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions / B. Bar-Yosef, R. D. Rogers, J. H. Wolfram, E. Richman // Soil Science Society of America Journal. – 1999. – 63, № 6. – P. 1703-1708.

**Storkanova G.** P-solubilizacni aktivita kmenu rodu *Rhizobium* // Rostlinna vyroba. – 1999. – 45, № 9. – P. 403-406.

Надійшла до редколегії 20.12.07