

## **ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩАЯ И АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

*Исаков Доминик Владимирович – студент 4 курса института биологии и природопользования ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет».*

*Научный руководитель – Пархоменко Анна Николаевна, к.б.н., доцент, доцент кафедры Прикладной биологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет».*

*Аннотация: проведено исследование активности коллекционных штаммов ризосферных азотфиксаторов и выявление у них способности к фосфатмобилизации с последующим отбором наиболее перспективных по обоим признакам культур. Результатом проведённой работы стало не только определение интенсивности процессов азотфиксации для опытных штаммов, продемонстрировавших высокий, относительно имеющихся литературных данных, показатель выделения  $\text{NH}_4^+$  в среду, но и выявление у них способности к мобилизации как органических, так и неорганических фосфатов.*

*Ключевые слова: азотфиксирующие и фосфатмобилизующие микроорганизмы, ризосфера, интенсивность азотфиксации, катионы аммония, метод Несслера.*

В последнее время всё больше внимания уделяется штаммам, обладающим широким спектром «способностей», например, одновременно проявляющим азотфиксирующие и фосфатмобилизующие свойства или являющиеся эффективными продуцентами сразу нескольких биологически активных веществ, положительно влияющих на ростовые и иные параметры растения.

За счёт своей «многозадачности» препараты на основе подобных «универсальных» штаммов имеют преимущество перед препаратами на основе штаммов, обладающих только одним полезным свойством (например, только фосфатмобилизацией или только азотфиксацией).

Целью нашей исследовательской работы является изучение активности коллекционных штаммов ризосферных азотфиксаторов и выявление у

них способности к фосфатмобилизации с последующим отбором наиболее перспективных по обоим признакам культур.

Объектами исследования были выбраны 13 коллекционных штаммов ризосферных азотфиксирующих бактерий, выделенных из ризосферы яблони – культуры КА-10, КА-31, ПА-7, ПА-20, ЮЯ-4, ЮЯ-13; смородины – АБС-24, АБС-25, АБС-27, БКСМ 20.1, ГСМ-19, СМ-19; и груши – культура ГР-1.

Из 13 штаммов 5 (АБС-24, АБС-27, ПА-20, ЮЯ-4, ЮЯ-13) – грамположительные, 5 штаммов – грамотрицательные и 3 штамма (ГСМ-19, СМ-19, КА-31) – грамвариабельные. Среди культур присутствуют, как стабильно палочковидные, кокковидные, так и полиморфные формы (ГСМ-19, СМ-19).

Для всех исследуемых микроорганизмов характерна способность к хорошему накоплению биомассы на селективной среде Эшби, пигментация колоний, обильное слизеобразование, формирование капсул и цист.

Азотфиксирующую активность выделенных штаммов определяли согласно методике, измеряя концентрацию свободного  $\text{NH}_4^+$  в питательной среде. Для этого коллекционные штаммы микроорганизмов в течение 7 суток культивировали в 15 мл жидкой безазотистой среды Эшби при температуре 24 °С. Одна из пробирок – контроль – была заполнена стерильной жидкой средой Эшби [3. С.138-140].

По истечению срока культивирования отобрали из каждой пробирки по 6 мл культуральной жидкости и центрифугировали со скоростью 10 000 об/мин в течение 8 мин при температуре 20 °С. Далее по 4 мл надосадочной жидкости перенесли в стерильные пробирки, в каждую из которых последовательно внесли по 2 мл 50 %-го раствора сегнетовой соли и 1 мл реактива Несслера. После появления характерного жёлтого окрашивания провели спектрофотометрическое исследование относительно нулевого раствора (жидкая среда Эшби с добавленными реактивами) при длине волны 410 нм [6. С. 89-91].

Концентрацию катионов аммония рассчитывали по калибровочному графику [5. С. 22]. Параллельно для каждого опытного штамма подсчитывали численность клеток в среде по методу Виноградского-Брида [4. С. 101-114].

Полученные по каждой культуре результаты концентрации катионов аммония в среде и численности клеток выразили в виде диаграммы (рис. 1).



**Рис. 1** Концентрация катионов аммония и численность клеток исследуемых штаммов в среде по прошествии 7 суток

Научные работы исследователей [3. С.138-140] сообщают об азотфиксирующей активности различных штаммов азотфиксаторов в пределах от 0,605-5,486 мг/л при численности от  $3 \cdot 10^6$  до  $7,6 \cdot 10^6$  кл/мл для аналогично поставленного эксперимента. Сопоставление полученных нами результатов с литературными источниками позволяют сделать вывод об очень высокой активности 10 из 13 исследуемых коллекционных штаммов, а именно культур: ЮЯ-13, АБС-25, ГСМ-19, КА-10, ЮЯ-4, СМ-19, ГР-1, АБС-27, ПА-7 и АБС-24.

Результаты по культуре ПА-20 (концентрация катионов аммония составила 2,1 мг/л при численности  $9 \cdot 10^5$  кл/мл) на основании тех же литературных источников можно считать средними.

Кроме того, 2 испытываемые культуры – БКСМ 20.1 и КА-31 показали отрицательную реакцию на реактив Несслера. Опираясь на литературные источники, можно предположить, что данные культуры образуют соединения аммония иного происхождения (например, в результате аммонификации), содержащиеся в культуральной жидкости, но не выявляемые используемым нами методом [1. С. 37-38].

Для первичного определения способности микроорганизмов к мобилизации фосфатов, согласно методике, использовали чашечный метод выращивания опытных культур на селективных средах [4. С. 450-452].

Для выявления способности растворять неорганические фосфаты исследуемые микроорганизмы высевали штрихом на поверхность плотной среды Муромцева. Для выявления способности растворять органические фосфаты исследуемые микроорганизмы высевали штрихом на поверхность плотной среды Менкиной с лецитином. Культивировали в течение 7 суток при 24 °С. По истечению срока культивирования фиксировали интенсивность роста опытных культур на средах и наличие зон гидролиза фосфатов.

Результаты исследования занесли в таблицу 1.

Таблица 1

**Определение способности исследуемых штаммов  
к фосфатмобилизации**

№	Культура	Зоны гидролиза, мм	
		Среда Муромцева	Среда Менкиной
1	ГР-1	17	0,5-1,5
2	АБС-24	2-4	5-9
3	АБС-25	0,5-2	1-7
4	ПА-20	1	2-3
5	КА-31	16-17	0
6	ЮЯ-13	10-12	0
7	ГСМ-19	3-15	0
8	АБС-27	2-3	0
9	СМ-19	0	1-3
10	КА-10	0	1-2
11	ЮЯ-4	0	1-2
12	ПА-7	0	0,5-1,0
13	БКСМ 20.1	0	0

В результате исследования установили, что 4 коллекционные культуры (ГР-1, АБС-24, АБС-25, ПА-20) обладают способностью к мобилизации, как неорганических фосфатов, так и органических, при этом лучшие предварительные результаты продемонстрировал штамм ГР-1 (зоны гидролиза до 17 мм на Муромцева и до 1,5 на Менкиной); 4 культуры (КА-31, ЮЯ-13, ГСМ-19, АБС-27) способны к мобилизации только неорганических фосфатов кальция (лучший результат у штамма КА-31 – зона гидролиза фосфатов 16-17 мм); ещё 4 культуры (СМ-19, КА-10, ЮЯ-4, ПА-7) могут мобилизовать только органический фосфор (СМ-19, КА-10 и ЮЯ-4 показали схожий результат – зоны гидролиза фосфатов до 2-3 мм); и 1 культура (БКСМ 20.1) к видимой мобилизации фосфора (наличие зон гидролиза не выявлено) не способна и на селективных средах растёт плохо.

Культуральные признаки некоторых испытуемых штаммов при росте на среде Муромцева и Менкиной претерпели определённые изменения: штамм ГР-1 начал вырабатывать зелёный пигмент; у штамма ПА-20 появился неярко жёлто-зелёный пигмент; в тоже время некоторые штаммы (АБС-24, АБС-25, АБС-27, КА-31, ГСМ-19) потеряли способность к пигментации или пигментация оказалась выражена существенно слабее, относительно роста тех же самых культур на среде Эшби. В тоже время морфологические свойства большинства штаммов практически не изменились (в основном изменялись размеры клеток).

Первичный скрининг на фосфатмобилизующую активность показал способность 12 коллекционных ризосферных культур азотфиксирующих микроорганизмов к растворению органических и неорганических фосфатов. Исходя из известных литературных данных, можно сделать предпо-

ложение, что культуры азотфиксаторов, проявившие способность к растворению неорганических фосфатов, могут быть способны к выделению как различных органических кислот (в первую очередь карбоновых: глюконовой, щавелевой, лимонной и др.), так и, учитывая обильное слизеобразование, присущее исследуемым штаммам, роль в растворении фосфатов могут играть экзополисахариды и иные соединения. Способность к растворению органического фосфора может свидетельствовать об образовании исследуемыми штаммами различных ферментов (фитаз и др.) [2. С. 145-147].

Таким образом, на основании полученных результатов исследования в можно сделать следующие выводы:

1. Из 13 исследуемых культур 10 культур продемонстрировали наилучшие показатели азотфиксирующей активности.

2. Из 13 исследуемых культур: 4 коллекционные культуры обладают способностью к мобилизации неорганических и органических фосфатов; 4 культуры мобилизуют только неорганические фосфаты; и ещё 4 культуры мобилизуют только органический фосфор. Одна культура к видимой мобилизации фосфора не способна.

3. Из 13 исследуемых культур отобрали 11 наиболее продуктивных по обоим исследуемым свойствам (азотфиксация и фосфатмобилизация) коллекционных азотфиксирующих штаммов ризосферных микроорганизмов для дальнейших исследований. Это культуры: АБС-24, АБС-25, ГР-1, ПА-20 (высокая азотфиксация; растворение неорганических и органических фосфатов); АБС-27, ГСМ-19, ЮЯ-13 (высокая азотфиксация; растворение неорганических фосфатов); КА-10, ПА-7, СМ-19, ЮЯ-4 (высокая азотфиксация; растворение органических фосфатов).

Полученные результаты позволяют предполагать высокий потенциал изучаемых культур для дальнейших более развёрнутых исследований. Проявляющие комплекс полезных свойств (высокая интенсивность азотфиксации и выраженная способность к фосфатмобилизации) коллекционные штаммы в кратковременно перспективе нуждаются в дополнительном изучении выявленных свойств, а в долговременной – могут представлять интерес для биотехнологии в области агрономии в качестве основы для создания биопрепаратов.

### **Библиографический список:**

1. Бегматов Ш.А. Ассоциативные бактерии засоленных почв и возможность их использования в агробiotехнологиях: специальность 03.02.03 «Микробиология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Ш.А. Бегматов. – Москва, 2020. – 72 с.

2. Мусич Е.Г. Роль микроорганизмов в извлечении фосфора из агрохимического сырья / Е.Г. Мусич, П.Г. Дульнев, В.П. Ландин // Агроэкологічний журнал. – 2018. – №1. – С. 144-149.

3. Нгуен Ван Жанг. Выделение и характеристика азотфиксирующего штамма СД1 из почвы чайной плантации провинции Фу Тхо Республики Вьетнам / Нгуен Ван Жанг, Ву Тхи Хьен, В.В. Пыльнев // Известия ТСХА. – 2017. – №4.

4. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов. – М.: АСАДЕМА», 2005. – 603 с.

5. Попова Л.Ф. Методы химико-экологического мониторинга: практикум для выполнения лабораторно-практических занятий по дисциплинам магистратуры / Л.Ф. Попова. – Архангельск, 2013. – 49 с.

6. Халецкая К.В. Аммиак и его соединения в железобетонных изделиях: обзор аналитических методик и результаты потенциометрического и фотометрического определения / К.В. Халецкая, Н.П. Яловая, Ю.С. Яловая // Вестник Полоцкого государственного университета. Серия F. Строительство. Прикладные науки. – 2015. – № 8. – С. 88-96.

#### PHOSPHATE-MOBILIZING AND NITROGEN-FIXING ACTIVITY OF RHIZOSPHERIC MICROORGANISMS

**Isakov Dominik Vladimirovich** – 4th-year student of the Institute of Biology and Environmental Management of the Federal State Educational Institution of ASTU. Russian Federation, Astrakhan.

**Scientific supervisor** – **Anna Nikolaevna Parkhomenko**, PhD, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Applied Biology and Microbiology of the Federal State Budgetary Educational Institution of ASTU. Russian Federation, Astrakhan.

**Abstract:** the activity of collection strains of rhizosphere nitrogen fixers was studied and their ability to phosphatemobilize was revealed, followed by the selection of the most promising cultures for both characteristics. The peculiarity and result of the work carried out was not only the determination of the intensity of nitrogen fixation processes for experimental strains that demonstrated a high, relative to the available literature data, the  $\text{NH}_4^+$  release rate into the medium, but also the identification of their ability to mobilize both organic and inorganic phosphates.

**Keywords:** nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing microorganisms, rhizospheres, nitrogen fixation intensity, ammonium cations, Nessler method.