Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2009. – Вип. 17, т. 2. – С. 69–76.
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Ecology. – 2009. – Vol. 17, N 2. – P. 69–76.

УДК 579.22+577.15

К. В. Лаврентьєва, П. І. Харченко, Н. В. Черевач, А. І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара

ВПЛИВ ІНТЕНСИВНОСТІ АЕРАЦІЇ ТА КИСЛОТНОСТІ СЕРЕДОВИЩА НА ФОСФАТМОБІЛІЗУВАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ҐРУНТОВИХ БАКТЕРІЙ

Вивчено вплив інтенсивності аерації та кислотності середовища на фосфатмобілізувальну активність ґрунтових бактерій *Pseudomonas putida* та *Enterobacter dissolvens*. Охарактеризовано розвиток досліджуваних штамів бактерій за різних рівнів *pH* культурального середовища та ступеня його аерації. Показано оптимізацію росту мікроорганізмів і ефективне розчинення трикальційфосфату при високому ступені аерації (0,5271 моль O_2/л/год.) і значенні *pH* культуральної рідини (6,0).

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

Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара

ВЛИЯНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ АЭРАЦИИ И КИСЛОТНОСТИ СРЕДЫ НА ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Изучено влияние интенсивности аэрации и кислотности среды на фосфатмобилизирующую активность почвенных бактерий *Pseudomonas putida* и *Enterobacter dissolvens*. Охарактеризовано развитие исследованных штаммов бактерий при разных уровнях *pH* культуральной среды и степени ее аэрации. Показана оптимизация роста микроорганизмов и эффективное растворение трикальцийфосфата при высокой аэрации (0,5271 моль O_2/л/час) и значении *pH* культуральной жидкости (6,0).

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

Oles' Gonchar Dnipropetrovs'k National University

INFLUENCE OF AERATION INTENSITY AND MEDIUM ACIDITY ON PHOSPHATE MOBILIZATION AFFECTED BY SOIL BACTERIA

The paper deals with the investigation of phosphate solubilisation conducted by two bacteria *Pseudomonas putida* and *Enterobacter dissolvens* under conditions of different rates of aeration and *pH*. Bacterial development was characterized by different media acidity and aeration levels. It was established optimal aeration rates and potential of hydrogen for soil bacteria growth and phosphate solubilisation – 0.5721 mole O_2/l per hour and *pH* ≈ 6.0.

Вступ

Фосфор поглинається рослинами у вигляді вищого окислу PO_4^{3-} і включається до складу органічних сполук. У рослинних тканинах концентрація фосфору становить 0,2–1,3 % від сухої маси рослини [1; 4; 11]. В орному шарі ґрунту запаси фосфору відносно невеликі (2,3–4,4 т/га у перерахуванні на P_2O_5). Від цієї кількості 2/3 складають солі ортофосфорної кислоти, 1/3 – органічні фосфорумісні сполуки (гумус, фітат тощо) [3; 5; 6]. Більша частина фосфорних сполук малорозчинна у воді. Фосфор

© К. В. Лаврентьєва, П. І. Харченко, Н. В. Черевач, А. І. Вінніков, 2009

міститься у ґрунті у різних формах. Концентрація іонів фосфору у ґрунті становить приблизно 0,1–10 мМ. Для оптимального росту рослинам необхідна концентрація від 1 до 5 мМ, для сільськогосподарських культур – від 5 до 60 мМ. При внесенні хімічних фосфорних добрив у ґрунті з'являються негативно заряджені іони $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} на малій відстані від зволожених частинок добрива, які домінують переважно при pH = 7,0–7,2. Ці негативно заряджені іони швидко зв'язуються з позитивно зарядженими іонами мінералів Fe^{3+}, Al^{3+} та Mn^{2+} при pH = 5,5–7,0; та іонами Ca^{2+} при pH = 6–8 та при pH = 6,5–8,5 – з іонами кальцію та різноманітними силікатами. Максимальне поглинання рослинами фосфору спостерігається при pH = 6–7. При потраплянні до ґрунту фосфор також швидко зв'язується з $CaCO_3$ із формуванням різноманітних мінералів: монокальційфосфату – $Ca(H_2PO_4)_2$, дикальційфосфатдигідрату (ДКФД) або бруситу – $CaHPO_4{\cdot}2H_2O$, дикальційфосфату (ДКФ) або монетиту – $CaHPO_4$, трикальційфосфату (ТКФ) – $Ca_3(PO_4)_2$, октокальційфосфату (ОКФ) – $Ca_4H(PO_4)_3{\cdot}2{,}5H_2O$, гідроксиапатиту – $Ca_5(PO_4)_3OH$ та інших. Розчинність цих мінералів падає в ряду ДКФД > ДКФ > ТКФ > гідроксиапатит [1; 5].

Хімічні фосфорні добрива, які масово вносяться до ґрунтів, малоефективні (від 75 до 90 % внесеного фосфору зв'язується іонами заліза, алюмінію та кальцію) і, таким чином, формуються нерозчинні та недоступні рослинам фосфорні сполуки [1].

Основне природне джерело надходження фосфору до орного шару – вивітрювання ґрунтотвірної породи, де він міститься головним чином у вигляді апатитів $3Ca_3(PO_4)_2{\cdot}CaF_2$ тощо. Тризаміщені фосфорні солі кальцію та магнію та солі полуторних оксидів заліза й алюмінію ($FePO_4$, $AlPO_4$ у кислих ґрунтах) малорозчинні та малодоступні для рослин. Двозаміщені та особливо однозаміщені солі кальцію та магнію, тим більше солі одновалентних катіонів і вільна ортофосфорна кислота розчинні у воді й використовуються рослинами як головне джерело фосфору. Рослини здатні поглинати і деякі органічні форми фосфору (фосфати цукрів, фітин) [1; 12].

Це, з одного боку, знижує інтенсивність процесу вимивання фосфору із ґрунту, а з іншого – обмежує можливості використання його рослинами [1; 7; 8; 10].

Певна кількість бактеріальних штамів може позитивно впливати на ріст рослин. Здебільшого вони асоційовані з рослинною ризосферою (саме там міститься в 5–20 разів більше мікроорганізмів, ніж за її межами). Популяція фосфатмобілізувальних мікроорганізмів у ґрунтах налічує в середньому від 10^2 до $3{\cdot}10^6$ скупчень, здатних формувати колонії, на 1 г ґрунту. Вони складають від 0,1 до 0,5 % усього бактеріального та грибкового різноманіття ґрунту [1]. Фосфатмобілізувальні бактерії здатні до трансформації трикальційфосфату, дикальційфосфату, гідроксиапатиту, кам'яного фосфату [7; 8].

Фосфатмобілізувальні бактерії швидко та ефективно переводять дані сполуки у розчинний стан [7]. У літературі описано декілька механізмів процесу мобілізації нерозчинних фосфатів. Розчинення мінеральних форм відбувається в результаті синтезу органічних кислот більшістю ґрунтових бактерій. Насамперед, бактерії можуть продукувати глюконову (штами *Pseudomonas sp.*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia cepacia*) та 2-кетоглюконову (штами *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*, *Bacillus firmus*) кислоти. Бактерії роду *Bacillus* синтезують суміш молочної, ізовалеріанової, ізобутилової та оцтової кислот. Окремі представники ґрунтової мікрофлори утворюють гліколеву, щавлевооцтову, малонову та сукцинілову кислоти. Інший механізм фосфатмобілізації – ферментативне дефосфорилювання органічних сполук фосфору за участі ферментів – фосфатаз. Окремі мікроорганізми здатні виділяти сірководень, азотну, карбонову та інші неорганічні кислоти. Нітрифікувальні

бактерії при окисленні амонію утворюють азотну кислоту, сіркобактерії при окисленні сірководню та сірки утворюють сірчану кислоту, а інші мікроорганізми в процесах дихання виділяють вуглекислий газ, що переходить у вуглекислоту. Усі ці кислоти взаємодіють із $Ca_3(PO_4)_2$ і утворюють дифосфат і монофосфат кальцію, доступні рослинам. Встановлено, що процес фосфатмобілізації може посилюватись під дією різних абіотичних факторів [1; 4; 10]. У зв'язку з цим мета роботи – визначити та кількісно охарактеризувати вплив рівня *pH* культуральної рідини та ступеня аерації на ріст фосфатмобілізувальних бактерій і процес трансформації ними трикальційфосфату.

Матеріал і методи досліджень

Для дослідження впливу аерації на розвиток і фосфатмобілізувальну активність штамів *Pseudomonas putida* та *Enterobacter dissolvens* використовували рідке елективне середовище Менкіної з трикальційфосфатом у концентрації 5 г/л. Середовище вносили у колби Ерленмейєра по 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 мл. Концентрація кисню, визначена за сульфітним методом, у кожній із них складала відповідно 0,53, 0,51, 0,44, 0,40, 0,24, 0,23, 0,21, 0,11 моль O_2/л/год.

Для дослідження впливу *pH* на ріст та фосфатмобілізувальну активність штамів *Pseudomonas putida* та *Enterobacter dissolvens* застосовували рідке середовище Менкіної. Початковий *pH* у кожному варіанті досліду становив 8,0, 7,0, 6,0, 5,0, 4,0. Його підтримували на відповідному рівні за допомогою 1 Н *HCl* або 1 Н *NaOH* протягом усього часу культивування. Дослід проводили в пробірках об'ємом 50 мл, куди вносили по 10 мл середовища та $Ca_3(PO_4)_2$ із розрахунку 5 г/л. Концентрація фосфору в останньому складала 32,2 ммоль.

Живильне середовище інокулювали суспензією кожної з досліджуваних культур до концентрації 10^6–10^7 клітин/мл. Бактерії культивували на качалці (220 об./хв.) при +28 °С протягом 7 діб. Щодня відбирали проби по 10 мл культуральної рідини, в яких визначали концентрацію вільних фосфат-іонів колориметричним методом Лоурі та Лопеса в модифікації Скулачова з метою оцінки здатності виділених культур розчиняти трикальційфосфат і визначення кількості життєздатних клітин шляхом висіву на м'ясо-пептонний агар [2].

Результати та їх обговорення

При дослідженні закономірностей росту встановлено різний характер розвитку штамів залежно від *pH* та рівня аерації живильного середовища. Для культури *Enterobacter dissolvens* у всіх варіантах досліду спостерігали активне накопичення життєздатних клітин та вихід у стаціонарну фазу росту вже на першу добу культивування. Різницю відмічали у кількості життєздатних клітин за різних значень *pH* середовища. Найбільше накопичення біомаси спостерігали при *pH* = 7–8: у цьому випадку концентрація життєздатних клітин становила 12,04 *lg* КУО (рис. 1).

Процес розчинення трикальційфосфату в усіх варіантах досліду характеризувався підвищенням концентрації вільних фосфат-іонів у культуральній рідині вже на 1–2-гу добу культивування та подальшим зниженням кількості останніх по мірі їх поглинання клітинами. Найінтенсивніше розчинення трикальційфосфату спостерігали при *pH* середовища 4,0. Максимальна концентрація фосфат-іонів для даного варіанта досліду складала 18,76 ммоль (рис. 2).

Для культури *Pseudomonas putida* в усіх варіантах досліду до 3-ї доби культивування, після незначного росту, спостерігали різке відмирання культури та одночасне зниження *pH* середовища до 4,0, після чого – поступове збільшення кількості

життєздатних клітин у культуральній рідині та підлуговування середовища до 5,6 одиниці. Максимальну концентрацію життєздатних клітин відмічали при *pH* 6–8 (9,0 *lg* КУО). При *pH* 4–5 цей показник був на порядок нижчим (7,9–8,5 *lg* КУО) (рис. 3).

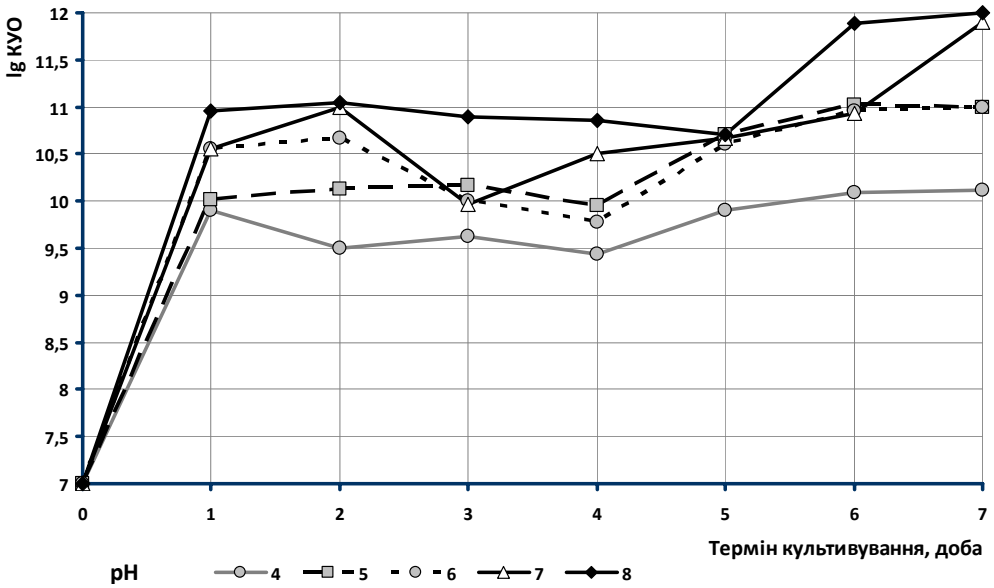

Рис. 1. Вплив *pH* на динаміку росту *Enterobacter dissolvens*

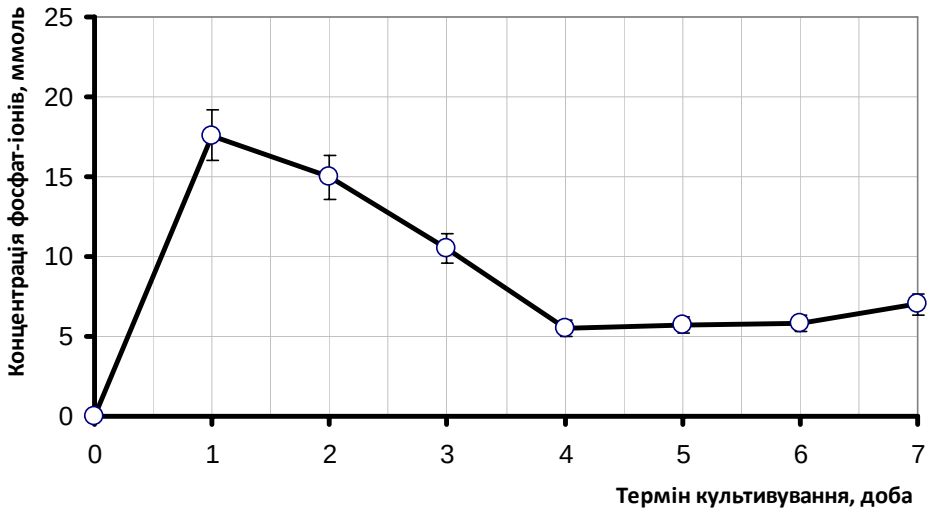

Рис. 2. Динаміка розчинення трикальційфосфату штамом *Enterobacter dissolvens* при значенні *pH* середовища 4,0

Характер розчинення трикальційфосфату у культуральній рідині був однаковим при всіх варіантах досліду: відбувалось поступове накопичення вільних фосфат-іонів у середовищі протягом усього часу культивування. Максимальна їх концентрація спостерігалась у середовищі із *pH* 4,0, а саме – 20,98 ммоль (рис. 4).

Таку динаміку росту *Pseudomonas putida* можна пояснити тим, що протягом перших трьох діб культивування культура росла та виділяла кислі метаболіти (початковий *pH* знизився до 4,0). Це впливало на процес звільнення фосфат-іонів із слабкорозчинного $Ca_3(PO_4)_2$. Оскільки бактерії не є кислотостійкими, кислі продукти мета-

болізму репресували певні ділянки шляху утилізації глюкози. Це призводило до часткового відмирання клітин, на що вказує зниження кількості колонієтвірних одиниць від 7,5 *lg* КУО до 4,8 *lg* КУО. Виходячи з того, що кислі метаболіти здатні утворювати хелатні сполуки з металами, можна припустити, що в культуральному середовищі кислі метаболіти утворювали комплексні сполуки з кальцієм при розчиненні трикальційфосфату. У результаті цього середовище підлуговувалося, що засвідчувало підвищення *pH* з 4,9 до 5,6, і створювались умови, сприятливі для подальшого розвитку штаму.

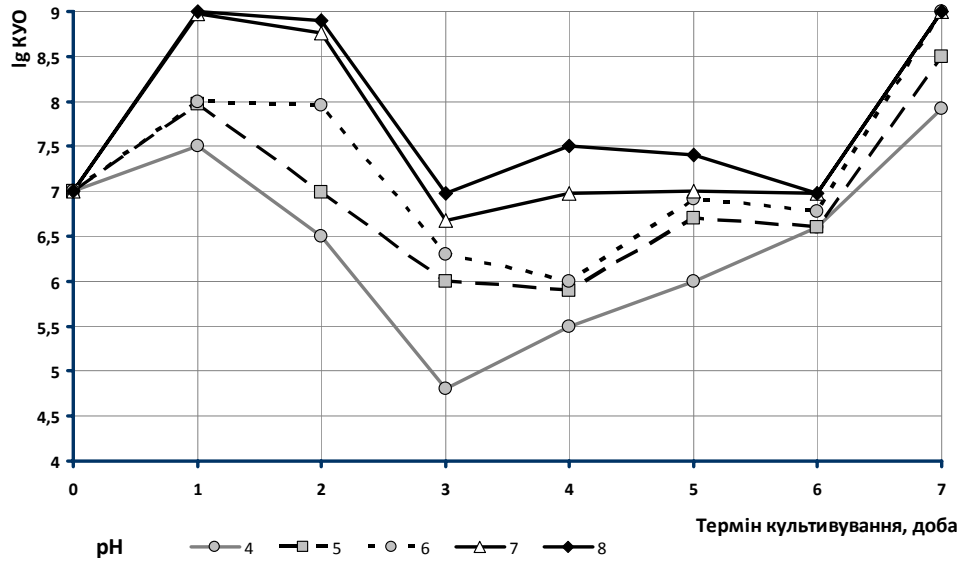

Рис. 3. Вплив *pH* на динаміку росту *Pseudomonas putida*

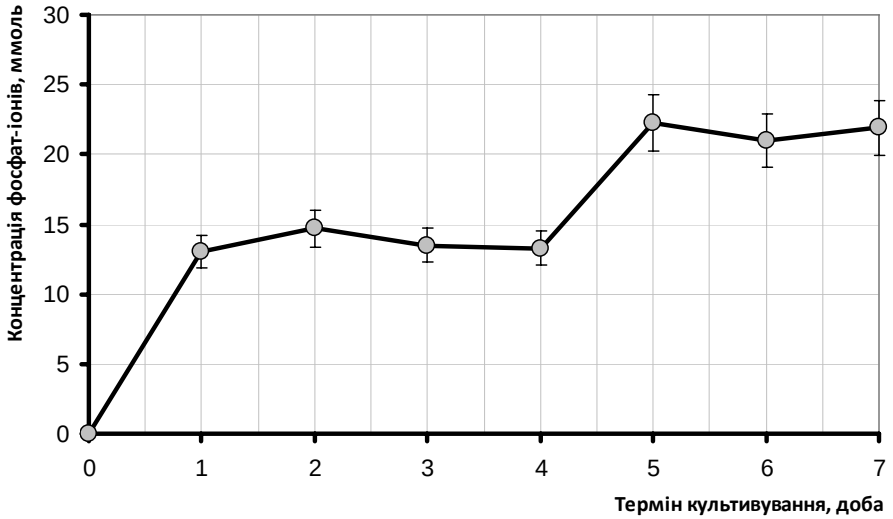

Рис. 4. Динаміка розчинення трикальційфосфату *Pseudomonas putida* при значенні *pH* середовища 4,0

Аналізуючи процеси росту та розчинення трикальційфосфату *Pseudomonas putida* та *Enterobacter dissolvens* у рідкому середовищі Менкіної з трикальційфосфатом при різних значеннях *pH*, можна відмітити загальну тенденцію в обох штамів: процес

розчинення трикальційфосфату був ефективнішим при кислому *pH* середовища, однак при цьому значно уповільнювався ріст культур.

Дослідження впливу аерації на динаміку росту *Enterobacter dissolvens* показало, що ступінь аерації середовища суттєво не впливав на накопичення біомаси цим штамом (рис. 5). Накопичення життєздатних клітин спостерігалось протягом усього періоду культивування за будь-якої концентрації кисню у середовищі. Ріст *Pseudomonas putida*, на відміну від ентеробактерії, майже не спостерігався за низьких концентрацій кисню в середовищі (рис. 5, 6).

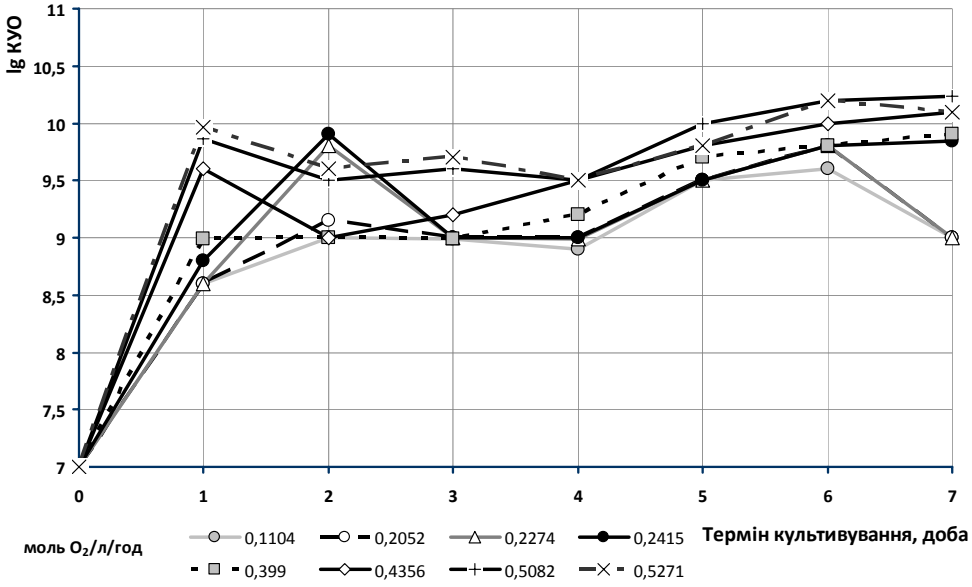

Рис. 5. Вплив різних ступенів аерації на ріст *Enterobacter dissolvens*

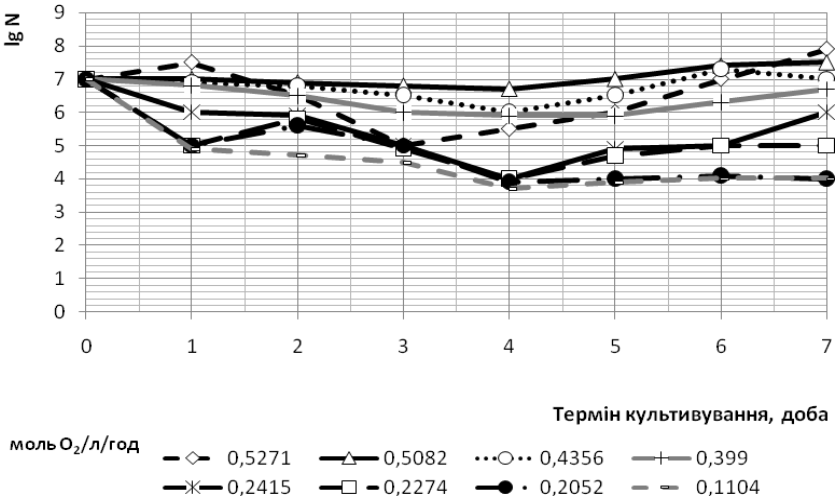

Рис. 6. Вплив різних ступенів аерації на ріст *Pseudomonas putida*

Можливо, такий характер росту культур можна пояснити тим, що *Enterobacter dissolvens* за способом дихання – факультативний анаероб, а *Pseudomonas putida* – облігатний аероб. Що стосується процесу мобілізації трикальційфосфату, то в обох штамів

він посилювався зі збільшенням ступеня аерації. Максимальну кількість фосфат-іонів (17,57 ммоль) відмічено в культуральній рідині штаму *Enterobacter dissolvens* за умов 0,5271 моль O_2/л/год. і 20,28 ммоль у культуральній рідині штаму *Pseudomonas putida* за тієї ж концентрації кисню в середовищі (рис. 7, 8).

Рис. 7. Динаміка розчинення трикальційфосфату *Enterobacter dissolvens* при аерації середовища 0,5271 моль O_2/л/год.

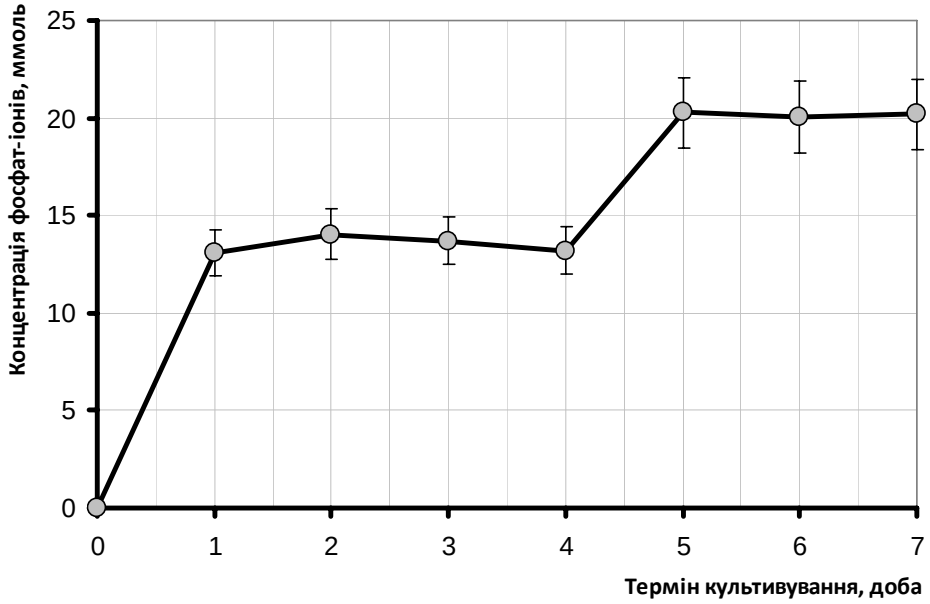

Рис. 8. Динаміка розчинення трикальційфосфату *Pseudomonas putida* при аерації середовища 0,5271 моль O_2/л/год.

Можливо, це пов'язано з активацією ферментів метаболічних шляхів, в результаті чого синтезувалися кислі метаболіти. Накопичення останніх, у свою чергу, призводило до ефективного розчинення трикальційфосфату.

Висновок

Для штамів *Enterobacter dissolvens* і *Pseudomonas putida* процес розчинення трикальційфосфату найефективніший при *pH* середовища 4,0, однак при цьому значно

уповільнюється ріст культур. Інтенсивність накопичення біомаси *Enterobacter dissolvens* практично не залежить від ступеня аерації середовища, на відміну від штаму *Pseudomonas putida*, ріст якого майже не спостерігали за низьких концентрацій кисню. Процес розчинення трикальційфосфату для обох культур найефективніший при концентрації кисню в середовищі 0,5271 моль/л/год.

Бібліографічні посилання

1. **Волкогон В. В.** Фосфор і калій у землеробстві // Проблеми мікробіологічної мобілізації. Матер. міжнар. наук.-практ. конф. – Чернігів–Харків, 2004. – С. 5–245.
2. **Никулина Н. А.** Обзор методов определения фосфора по образованию молибденовой сини. – М. : Колос, 1978. – 49 с.
3. **Goldstein A. H.** Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria // Biological Agriculture and Horticulture. – 1995. – Vol. 12. – P. 185–193.
4. **Grover R.** Rock phosphate and phosphate solubilizing microbes as a source of nutrients for crops // Thapar Institute of Engineering and Technology. – 2003. – Vol. 37, N 1. – P. 1–51.
5. **Gyles E. C.** Characterization of the membrane quinoprotein glucose dehydrogenase from *Escherichia coli* and characterization of a site-directed mutant in which histidine-262 has been changed to tyrosine // Biochemistry Journal. – 1999. – Vol. 340, N 7. – P. 639–647.
6. **Hwangbo H.** 2-ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium* // Current Microbiology. – 2003. – Vol. 47, N 2. – P. 87–92.
7. **Jia X.** Screening for calcium phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarum* // Department of Soil Science of Saskatchewan University. Saskatoon. – 2008. – Vol. 1, N 1. – P. 15–97.
8. **Minoru A.** Mode of binding of pyrroloquinoline quinone to apo-glucose dehydrogenase // Agriculture biochemistry. – 1985. – Vol. 49, N 4. – P. 1227–1231.
9. **Ok-Ryul S.** Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil // Brazilian Journal of Microbiology. – 2008. – Vol. 39, N 1. – P. 151–156.
10. **Oubrie A.** Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase // The EMBO Journal. – 1999. – Vol. 18, N 4. – P. 5187–5194.
11. **Ponmurugan P.** In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria // African Journal of Biotechnology. – 2006. – Vol. 5, № 4. – P. 348–350.
12. **Sadaf S.** Effect of various parameters on the efficiency of zinc phosphate solubilization by indigenous bacterial isolates // African Journal of Biotechnology. – 2008. – Vol. 7, N 10. – P. 1543–1549.

Надійшла до редколегії 10.09.2009