

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. Олесь 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. Лаврентьєва, П. И. Харченко, Н. В. Черевач, А. И. Винников

*Днепропетровский национальный университет им. Олесь 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 – 0.5271 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

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 зволжених 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 ґрунтоутвірної 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 можливість 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 грибового 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, шавлевооцтову, 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 фосфатмобілізуювальних бактерій і процес трансформації ними трикальційфосфату.

### Матеріал і методи досліджень

Для дослідження впливу аерації на розвиток і фосфатмобілізуювальну 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 сульфідним 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 фосфатмобілізуювальну активність штамів *Pseudomonas putida* та *Enterobacter dissolvens* застосовували рідке середовище Менкіної. Початковий  $pH$  у кожному варіанті дослідження 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 дослідження 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 дослідження 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 дослідження складала 18,76 ммоль (рис. 2).

Для культури *Pseudomonas putida* в усіх варіантах дослідження 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 підлогування 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).

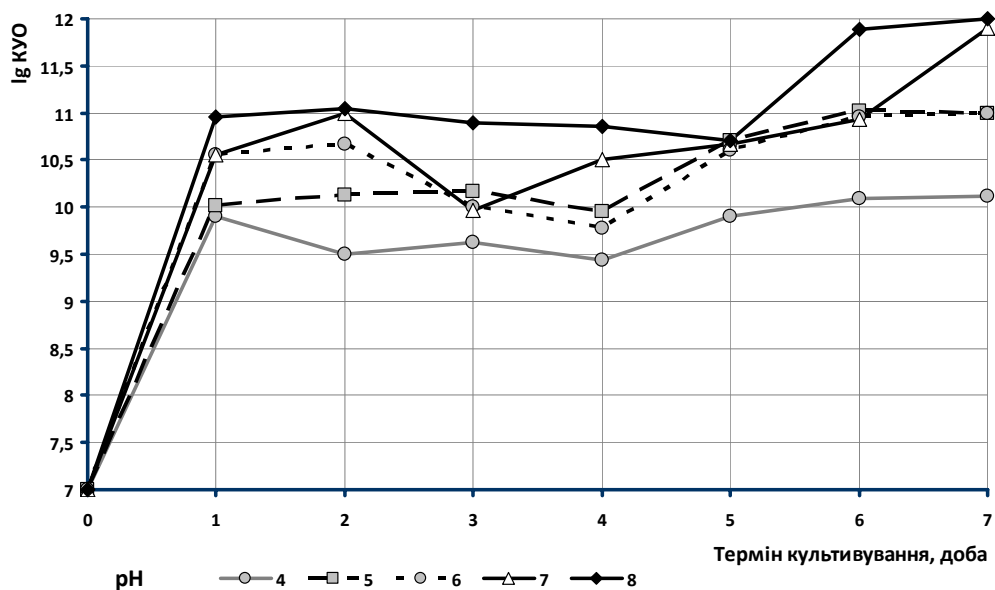


Рис. 1. Вплив  $pH$  на динаміку росту *Enterobacter dissolvens*

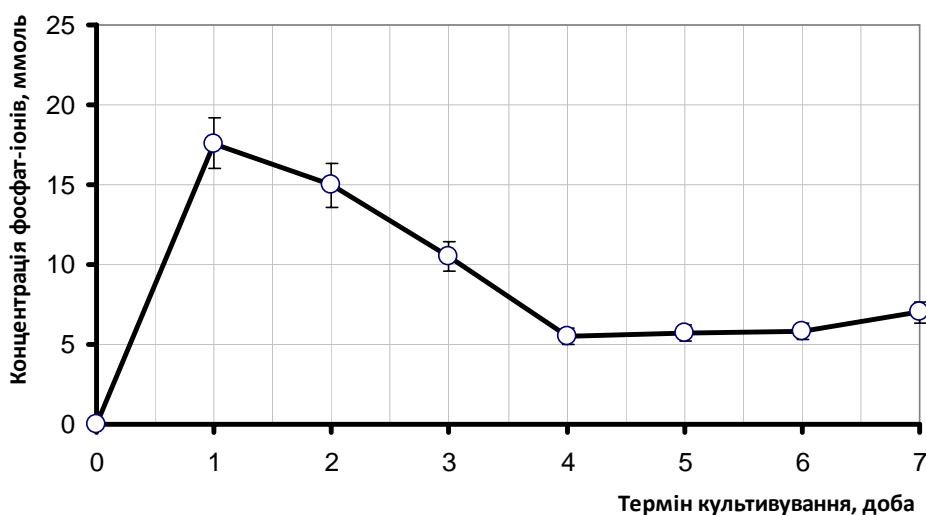


Рис. 2. Динаміка розчинення трикальційфосфату штамом *Enterobacter dissolvens* при значенні  $pH$  середовища 4,0

Характер розчинення трикальційфосфату у культуральній рідині був однаковим при всіх варіантах дослідження: 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 колонієвірних 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 підлугувалося, що засвідчувало підвищення  $pH$  з 4,9 до 5,6, і створювались умови, сприятливі для подальшого розвитку штаму.

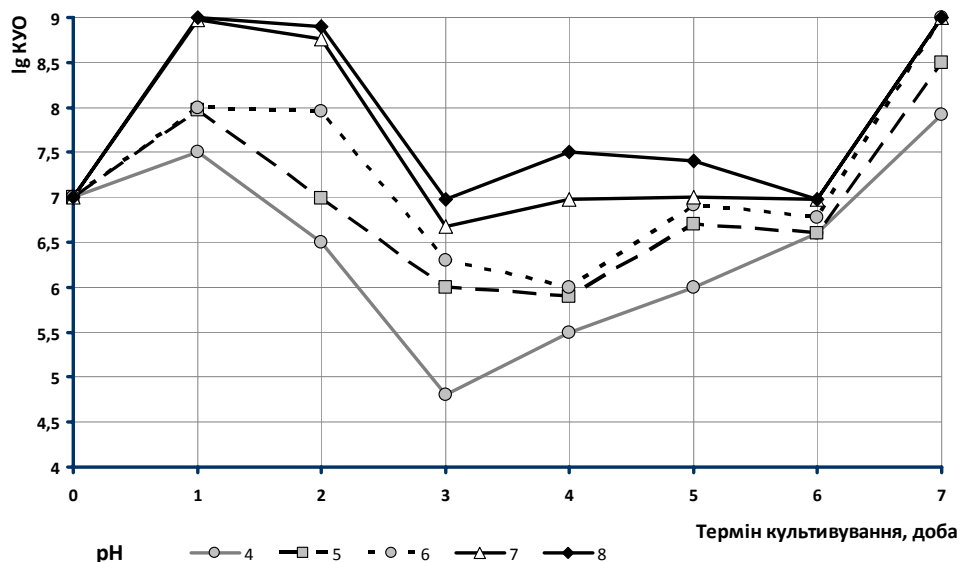


Рис. 3. Вплив  $pH$  на динаміку росту *Pseudomonas putida*

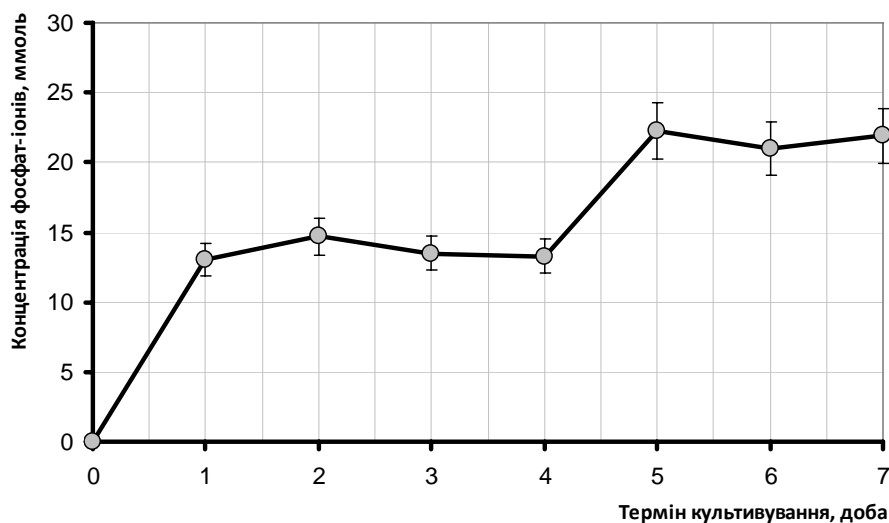


Рис. 4. Динаміка розчинення трикальційфосфату *Pseudomonas putida* при значенні  $pH$  середовища 4,0

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).

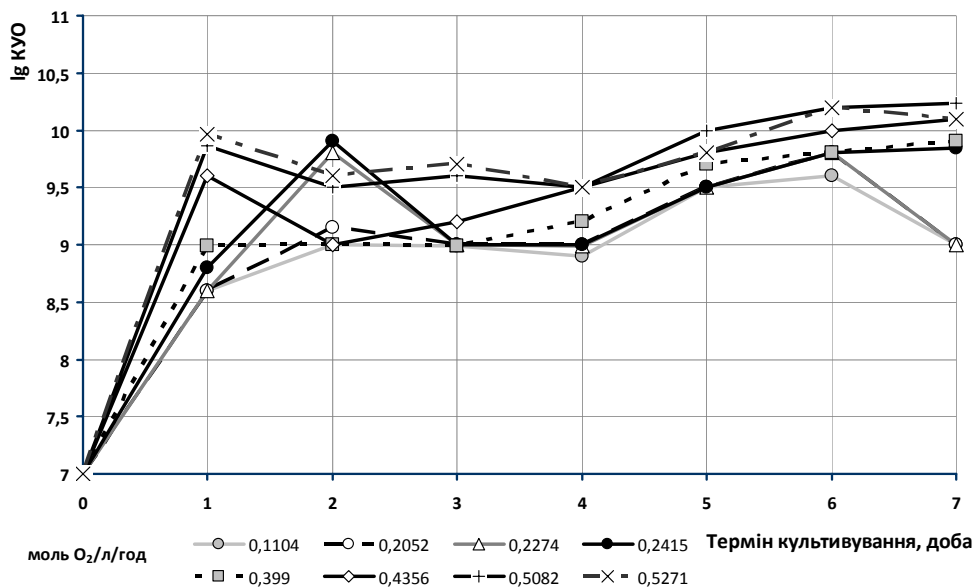


Рис. 5. Вплив різних ступенів аерації на ріст *Enterobacter dissolvens*

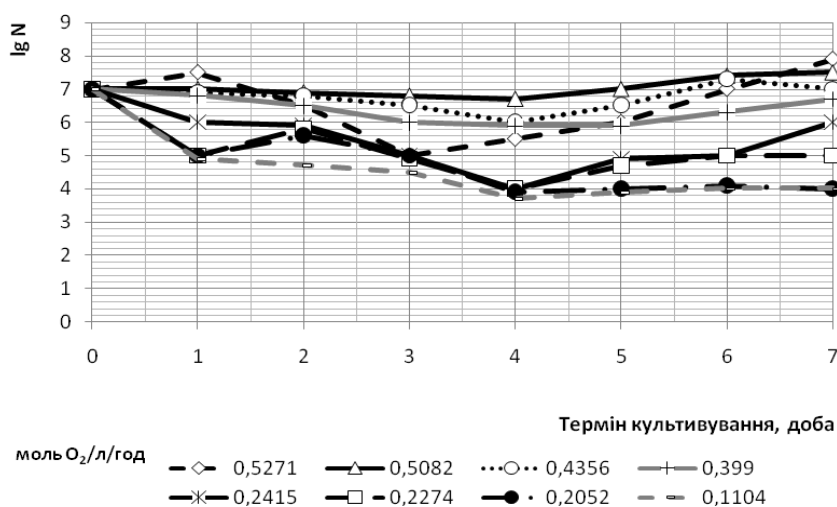


Рис. 6. Вплив різних ступенів аерації на ріст *Pseudomonas putida*

Можливо, такий характер росту культур можна пояснити тим, що *Enterobacter dissolvens* за способом дихання – факультативний анаероб, а *Pseudomonas putida* – облигатний 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).

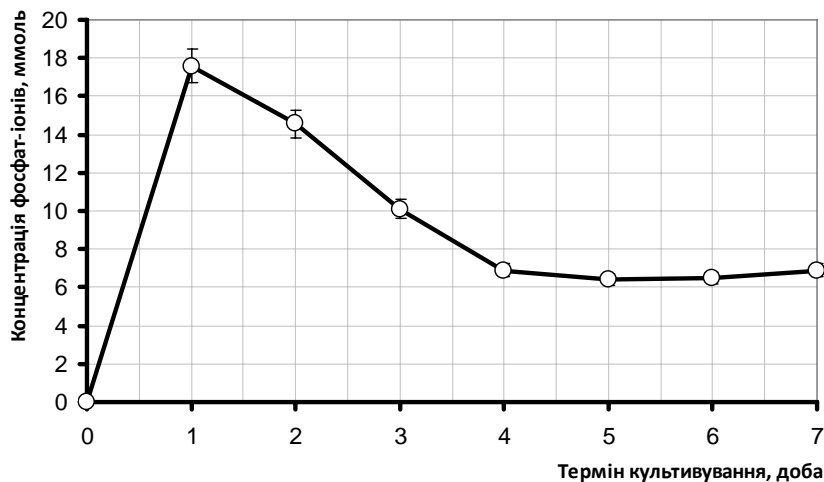


Рис. 7. Динаміка розчинення трикальційфосфату *Enterobacter dissolvens* при аерації середовища 0,5271 моль  $O_2$ /л/год.

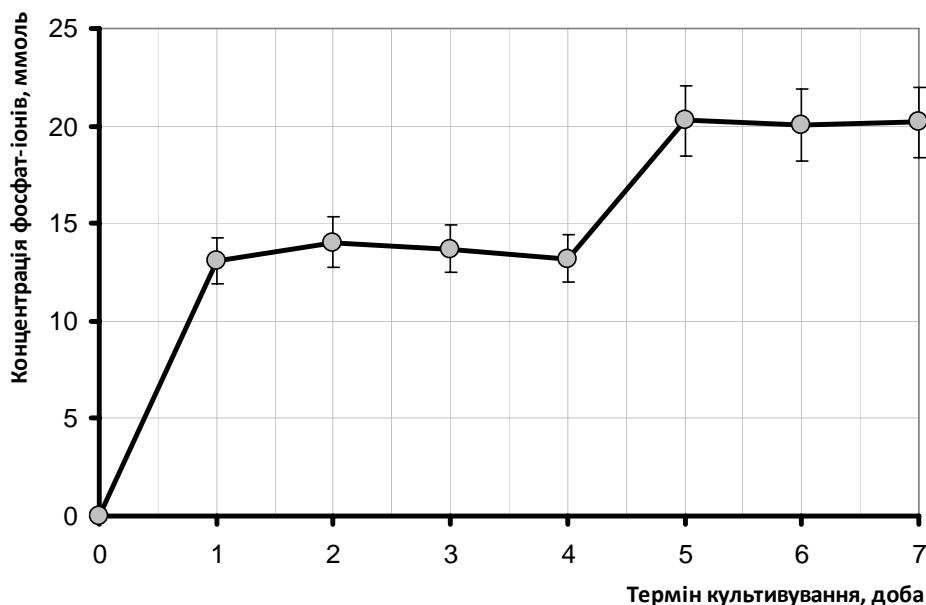


Рис. 8. Динаміка розчинення трикальційфосфату *Pseudomonas putida* при аерації середовища 0,5271 моль  $O_2$ /л/год.

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. **Никulina 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 intermedius* // 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