

БАКТЕРИИ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА, МОБИЛИЗУЮЩИЕ ФОСФОР ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Ю.Г. Максимова^{1,2}, К.Г. Семёнова³

¹*"Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН" – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия*

²*Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

³*Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия*

Введение

Фосфор является одним из важнейших макроэлементов и входит в состав таких молекул, как ДНК, РНК, АТФ, фосфолипидов и некоторых коферментов. С целью повышения урожайности и качества получаемых сельскохозяйственных культур, для ускорения роста и развития растений необходимо поддерживать концентрацию фосфора на оптимальном уровне. Однако около 80–90 % почвенного фосфора находится в связанном состоянии. Иными словами, фосфор представлен органическими и неорганическими соединениями, что делает его труднодоступным для питания растений. Поиск путей мобилизации фосфора из нерастворимых соединений и перевод их в дальнейшем в легкодоступные для растений – одна из актуальных проблем сельского хозяйства [1].

Органическая форма фосфора представлена мио-инозитол гексакисфосфорной или фитиновой кислотой. Её соли являются сильными хелатирующими агентами. Анионы фосфорной кислоты, входящие в состав молекулы фитиновой кислоты, способны связывать катионы различных металлов, таких как, железо, кальций, цинк, магний. Кроме того, возможно образование нерастворимых комплексов с белковыми веществами, липидами, крахмалом. Таким образом, данные органические соединения плохо усваиваются растениями и в полной мере не удовлетворяют их потребности в фосфоре. Поэтому с целью оптимизации роста сельскохозяйственных культур к почвам добавляют фосфорсодержащие удобрения. Однако это приводит к увеличению стоимости продукции, а также повышению уровня растворимых фосфатов в почве и загрязнению водоемов. Соответственно решение данной проблемы должно в первую очередь сводиться к уменьшению внесения почвенных удобрений [2–4].

Известно, что фосфор фитатов, а вместе с тем мио-инозитол, высвобождаются в реакции гидролиза фитазами (КФ 3.1.3.). Данные ферменты обнаружены в органах и тканях животных, а также в организмах грибов, растений и бактерий. Ферменты микроорганизмов имеют более высокую удельную активность, большинство из них способны последовательно отщеплять от молекулы фитиновой кислоты до пяти фосфатных остатков. Использование фитазы или фитатгидролизующих бактерий в качестве добавок к растительным кормам позволяет снижать нормы внесения минеральных фосфатов [5, 6].

Неорганические соединения фосфора представлены по большей части кальций, железо, алюминий содержащими формами. Почвенные фосфаты есть результат превращения апатитов и метаболитов фосфорных удобрений в щелочной среде с образованием трикальцийфосфата. Растворение неорганических соединений фосфора происходит с помощью разнородной группы микроорганизмов, которые в ходе своей жизнедеятельности способны выделять продукты кислотного характера. К последним относятся органические кислоты, понижающие pH в ризосфере и в щелочных почвах. Процесс выделения фосфатов из их нерастворимых соединений происходит также за счет продукции бактериями щелочных фосфатаз [7, 8].

Повышение доступности труднорастворимых фосфатов почвы для растений может обеспечить биологическая фосфатмобилизация за счет почвенной микробиоты, а также при использовании бактериальных удобрений на основе фосфатмобилизующих бактерий. Данные разработки являются наиболее выгодными и экологически безопасными. В настоящее время особое внимание уделяется таким перспективным методам, как предпосевная обработка семян препаратами фосфатмобилизующих и фитатгидролизующих бактерий, а также комплексными бактериальными препаратами [9, 10].

Цель исследования: выделить из высокоминерализованного щелочного биотопа и охарактеризовать бактерии, мобилизующие фосфор нерастворимых органических и неорганических соединений, перспективные для дальнейшего использования в качестве биопрепаратов.

Материалы и методы

Фосфатмобилизующие и фитатгидролизующие бактерии выделяли из ризосферы растений, произрастающих в грунте содового шламохранилища АО "Березниковский содовый завод", г. Березники, Пермский край (координаты отбора проб 59°25'40,8" с.ш., 56°43'24,6" в.д.). Отобраны три образца: 3.2 – грунт с ризосферой одуванчика *Taraxacum officinale* F.H. Wigg.; 3.4 – грунт с ризосферой черёмухи *Prunus padus* L.; 3.9 – поверхность грунта, не глубже 1 см.

Для получения накопительной культуры фосфатмобилизующих бактерий 1 г грунта вносили в 20 мл жидкой среды Герретсена в модификации Муромцева, (г/л): глюкоза – 10,0; аспарагин – 1,0; K_2SO_4 – 0,2; $MgSO_4$ – 0,2; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 3,3; $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ – 3,8. Нерастворимый $Ca_3(PO_4)_2$ выпадал в виде мелкодисперсного осадка, придававшего питательной среде равномерную мутность. Для выделения бактерий, способных растворять трикальцийфосфат, проводили высев десятикратных разведений накопительной культуры на плотную питательную среду National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium (NBRIP) следующего состава (г/л): глюкоза – 10,0; $Ca_3(PO_4)_2$ – 5,0; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 5,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,25; KCl – 2,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,1; агар – 15,0 [11,12].

Для количественного подсчёта микроорганизмов использовали метод десятичных разведений [13]. Определение активности выделенных изолятов проводили на жидкой среде NBRIP.

Накопительную культуру бактерий – продуцентов фитаз, получали на питательной среде Phytase Screening Medium (PSM) следующего состава (г/л): $CaCl_2$ – 2; NH_4NO_3 – 5; KCl – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01; $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 0,01; глюкоза – 20; фитат натрия – 4. Для выделения колоний микроорганизмов, способных гидролизовать нерастворимый фитат натрия, проводили высев десятикратных разведений накопительной культуры на агаризованную среду PSM следующего состава (г/л): $CaCl_2$ – 2; NH_4NO_3 – 5; KCl – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01; $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 0,01; глюкоза – 20; агар – 20; фитат натрия – 4 [14].

Для определения фосфатазной активности изолятов, выращенных на жидкой селективной питательной среде NBRIP, проводили биохимическую реакцию с п-нитрофенилфосфатом, который под действием щелочной фосфатазы гидролизует с образованием окрашенного продукта п-нитрофенола. Активность фосфатазы определяли по приросту оптической плотности среды при $\lambda = 420$ нм, измеренной на спектрофотометре Ultraspec 3000 («GE Healthcare», США). Единицу (Ед.) активности фосфатазы определяли как количество фермента, необходимое для высвобождения 1 мкмоль п-нитрофенола/мин [15].

Свободный фосфор в культуральной среде определяли по реакции неорганического фосфата с молибдатом аммония в присутствии восстановителей с образованием окрашенного комплексного соединения (молибденовой сини). Интенсивность окраски раствора пропорциональна концентрации неорганического фосфата. Экстинкцию калибровочных, а также опытных проб измеряли на ФЭК (КФК-3, Россия) при $\lambda = 670$ нм [16, 17].

Количественную оценку активности фермента фитазы определяли по методу Грайнера по количеству фосфора, высвободившегося при гидролизе фитата натрия. Данный метод основан на реакции неорганического фосфата с молибдатом аммония в присутствии восстановителей с образованием окрашенного комплексного соединения. Оптическую плотность контрольной и реакционной смесей измеряли на спектрофотометре Ultraspec 3000 («GE Healthcare», США) при длине волны излучения $\lambda = 355$ нм. За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющего фитат натрия с образованием 1 мкмоль фосфата за одну минуту [18, 19].

Результаты и их обсуждение

Грунты содового шламохранилища, формирующиеся после прекращения эксплуатации на месте сброса содового шлама, характеризуются высокой минерализацией и щелочным pH [20]. Микроорганизмы, обитающие в таких средах, обладают как специфической (алкало- и галотолерантностью), так и неспецифической устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды, в связи с чем являются перспективными объектами биотехнологического значения. В щелочной среде преобладают фосфаты в нерастворимом виде, что позволяет предполагать наличие в такой среде бактерий, активно мобилизующих фосфаты.

Нами из ризосферы растений, произрастающих в грунте старой карты содового шламохранилища, на среде с нерастворимым неорганическим фосфатом было выделено 5 изолятов фосфатмобилизующих бактерий. Все изоляты формируют зону просветления агаризованной среды с нерастворимым фосфатом (рис. 1, а), снижают pH жидкой среды культивирования до значений pH 3–4. На среде с нерастворимым органическим фосфатом выделено 7 изолятов фитатгидролизующих бактерий. Все изоляты также формируют зону просветления агаризованной среды с нерастворимым фитатом натрия (рис. 1, б).



Рисунок 1 – Фосфатмобилизующие (а) и фитазопродуцирующие (б) бактериальные изоляты

Изучена динамика высвобождения фосфора из трикальцийфосфата в процессе роста изолятов фосфатмобилизующих бактерий. К концу культивирования (231 ч) изолятов 3.2.1 и 3.4.2 на среде в нерастворимым неорганическим фосфатом концентрация свободного фосфора в среде составляла $410,69 \pm 17,50$ и $348,79 \pm 17,99$ мкг/мл соответственно, содержание КОЕ/мл – $(4,67 \pm 0,82) \cdot 10^8$ и $(1,80 \pm 0,24) \cdot 10^9$ соответственно, pH среды снижалась с 7,0 до 4,5 и 4,0 соответственно (рис. 2).

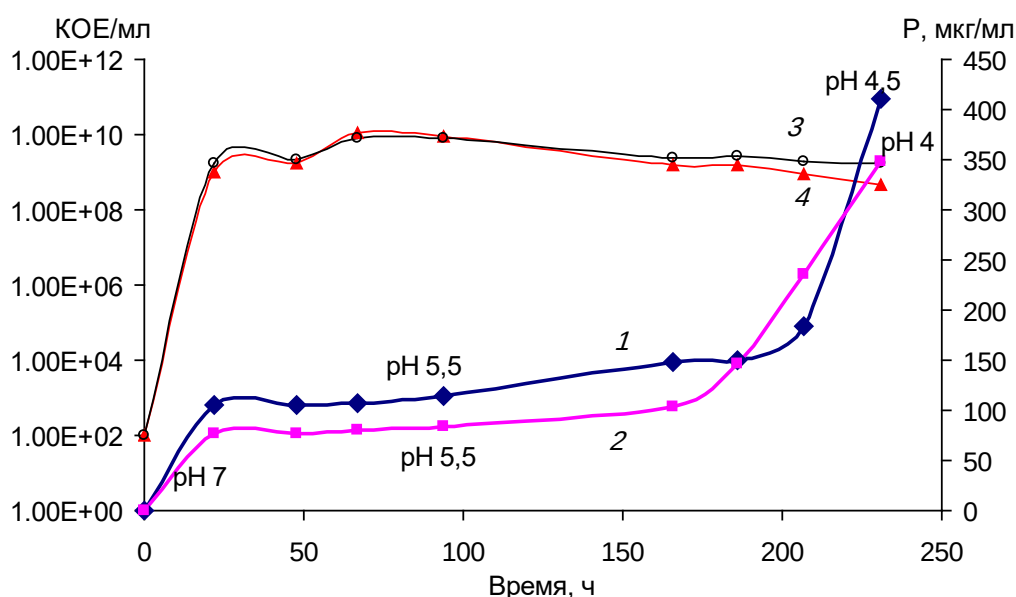


Рисунок 2 – Высвобождение фосфора (1, 2) и динамика роста (3, 4) изолятов 3.2.1 (1, 4) и 3.4.2 (2, 3) на среде NBRIP

Определена фосфатазная активность изолятов. Она составила от 0,033 до 0,062 Ед./л. Известно, что при участии фосфатаз происходит мобилизация органического фосфора, и основными продуцентами для щелочных фосфатаз, преобладающих в нейтральных и щелочных почвах, являются бактерии, а для кислых фосфатаз, распространенных в кислых почвах, – растения, грибы и в меньшей степени бактерии [21]. В случае мобилизации неорганических фосфатов предполагается больший вклад в этот процесс закисления почвы при жизнедеятельности бактерий, выделяющих в среду органические кислоты.

Для изолятов, выделенных на среде PSM, определена активность фитазы. Активность этого фермента варьировала в пределах от 0,041 до 0,067 Ед./мл. Данные изоляты при дальнейшей селекции могут быть использованы для повышения питательности кормов для сельскохозяйственных животных или как компонент биологического удобрения.

Заключение

Использование фосфатмобилизующих микроорганизмов, которые обеспечивают биологическую мобилизацию труднодоступных почвенных фосфатов, а также активацию низкосортных фосфоритов, является перспективным для улучшения фосфорного питания растений [22]. Из ризосферы растений, произрастающих на высокоминерализованных щелочных средах содового шламохранилища г. Березники (Пермский край), выделено пять наиболее активных изолятов фосфатмобилизующих бактерий и семь изолятов фитатгидролизующих бактерий. По результатам скрининга отобранных изолятов, активно продуцирующих метаболиты кислотного характера и мобилизующих нерастворимые соединения кальция, выбраны изоляты 3.2.1 и 3.4.2, отличающиеся высокой активностью в жидкой среде.

Эксперименты по изучению динамики накопления растворимого фосфата в жидкой среде позволяют сделать вывод, что в процессе роста на среде с нерастворимым неорганическим фосфатом снижается рН и повышается концентрация свободного фосфора, причем при этом концентрация свободного фосфора в среде во много раз превышает необходимую для роста бактерий. Кроме того, свободный фосфор не возвращается в нерастворимое состояние, что в дальнейшем обеспечивает его поглощение растениями. Такой тип бактериальных культур является перспективным для создания биологических удобрений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507

Литература

1. Белясова Н.А., Игнатовец О.С., Сергиевич Д.С. Выделение и характеристика почвенных фосфатмобилизующих микроорганизмов // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. № 2. С. 93–97.
2. 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.
3. Егоршина А.А. и др. Фосфат-мобилизующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. 2011. № 2. С. 172–182.
4. Konietzny U., Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytate degrading enzymes (phytases) // International Journal of Food Science and Technology. 2002. V. 37. 791–812.
5. Босак В.Н. Оптимизация питания растений. Lambert Academic Publishing, 2012. 203 с.
6. Гесслер Н.Н., Сердюк Е.Г., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И. Активность фитазы в рекомбинантных штаммах *Yarrowia lipolytica* при различных условиях культивирования // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. № 5. С. 498–505.
7. Савинов В.А. Природные и рекомбинативные фитазы микроорганизмов // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2007. № 2. С. 66–67.
8. Закирьяева С.И., Хамидова Х.М., Шакиров З.С. Поиск фосфатмобилизующих бактерий в почвах Узбекистана // Universum: химия и биология. 2021. № 9(87). С. 5–10.
9. Кузьмина Л.Ю. и др. Новые штаммы фосфатмобилизующих бактерий, продуцирующих ауксин, перспективные для сельскохозяйственной биотехнологии // Известия УНЦ РАН. 2015. № 1. С. 40–46.
10. Персикова Т.Ф., Цыганов А.Р., Суховицкая Л.А. Применение diazотрофных и фосфатмобилизующих бактериальных препаратов при возделывании основных сельскохозяйственных культур // Горки: БГСХА. 2003. С. 28.
11. Nadeem M., Wu J., Ghaffari H., Kadir A.J., Saleem S., Mollier A., Singh J., Cheema M. Understanding the adaptive mechanisms of plants to enhance phosphorus use efficiency on podzolic soils in boreal agroecosystems // Frontiers in Plant Science. 2022. P. 1–23.
12. Пуронен С.В., Жусупова А.М., Тен О.А. Выделение активных культур фосфатмобилизующих микроорганизмов из ризосферы // Биотехнология. Теория и практика. 2012. № 3. С. 77–82.
13. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. М.: Издательский центр "Академия", 2005. 608 с.
14. Патент РФ № 2654595 С1, МПК A01N 63/02, C12N 1/20. Сулейманова А.Д., Иткина Д.Л., Шарипова М.Р. Штамм бактерий *Pantoea brenneri*, обладающий фосфатмобилизующей и фунгицидной активностью.
15. Behera B.C., Yadav H., Singh S.K., Sethi B.K., Mishra R.R., Kumari S., Thatoi H. Alkaline phosphatase activity of a phosphate solubilizing *Alcaligenes faecalis*, isolated from Mangrove soil // Biotechnology Research and Innovation. 2017. V. 1(1). P. 101–111.
16. ГОСТ 18309–2014. Вода. Методы определения фосфорсодержащих веществ. Российская Федерация: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2014.
17. Heinonen J.K., Lahti R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic phosphatase // Anal Biochem. 1981. V. 113. P. 313–317.
18. Greiner R. Purification and characterization of three phytases from germinated lupine seeds (*Lupinus albus* Var. Amiga) // J Agric Food Chem. 2002. V. 50. P. 6858–6864.
19. Greiner R., Egli I. Determination of the activity of acidic phytate-degrading enzymes in cereal seeds // J Agric Food Chem. 2003. V. 51. P. 847–850.
20. Шилова А.В. и др. Изменения микробиома как индикатор восстановления природных сред содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» // Вода и экология. Проблемы и решения. 2020. № 1(81). С. 81–94.
21. Каширская Н.Н. и др. Пространственно-временные особенности фосфатазной активности естественных и антропогенно-преобразованных почв // Почвоведение. 2020. № 1. С. 89–101.
22. Park J., Bolan N., Mallavarapu M., Naidu R. Enhancing the solubility of insoluble phosphorus compounds by phosphate solubilizing bacteria // 19-th World Congress of Soil Science. 2010.