



UNIVERSUM: ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ

Научный журнал
Издается ежемесячно с ноября 2013 года
Является печатной версией сетевого журнала
Universum: химия и биология

Выпуск: 11(101)

Ноябрь 2022

Часть 1

Москва
2022

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

БИОТЕХНОЛОГИЯ (В ТОМ ЧИСЛЕ БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ)

DOI – 10.32743/UniChem.2022.101.11.14518

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОСФАТСОЛЮБИЛИЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ
МИКРООРГАНИЗМОВ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ГРАНУЛЫ
ФОСФОРНЫХ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ**Йулдошев Шокир Уринович**

PhD по хим. наукам, ст. науч. сотр.,
Институт химии растительных веществ АН РУз,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: www.yyy.2014@mail.ru

Джуманиязова Гулнара Исмаиловна

д-р хим. наук, проф. кафедры биотехнологии,
Ташкентский государственный технический университет,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: gulnara2559@mail.ru

Закиряева Саида Икромовна

PhD по биологическим наукам, ст. науч. сотр.,
Институт микробиологии АН РУз,
Республика Узбекистан, г. Ташкент

Элмуратов Бурхон Жураевич

д-р хим. наук, проф.,
Институт химии растительных веществ АН РУз,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: b_elmuradov@mail.ru

STUDY OF THE PHOSPHATE-SOLUBILIZING ACTIVITY OF MICROORGANISMS
IMMOBILIZED IN GRANULES OF PHOSPHORUS MINERAL FERTILIZERS**Shokir Yuldoshev**

PhD in Chemical Sciences, Senior Scientist,
Institute of the Chemistry of Plant Substances,
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Republic of Uzbekistan, Tashkent

Gulnara Jumaniyazova

Doctor of Chemistry, Professor
Departments of Biotechnology,
Tashkent State Technical University,
Republic of Uzbekistan, Tashkent

Saida Zakiryaeva

PhD in Biological Sciences, Senior Scientist
Institute of Microbiology, Academy
of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Republic of Uzbekistan, Tashkent

Burkhon Elmuradov

Doctor of Chemistry, Professor
Institute of Chemistry of Plant Substances
of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Republic of Uzbekistan, Tashkent

АННОТАЦИЯ

Исследованы возможности использования фосфатсолубилизирующих микроорганизмов для улучшения усвояемости фосфорных минеральных удобрений. Установлено, что аборигенные микроорганизмы на минеральных удобрениях «Аммофос», PS-Agro, «Супрефос-NS» и фосфогипсе до и после стерилизации отсутствуют. Установлено, что в иммобилизованном состоянии на гранулах минеральных удобрений клетки фосфатсолубилизирующего штамма *Bacillus subtilis* BS-26 не теряют свою фосфатсолубилизирующую активность по сравнению со свободными клетками. При этом иммобилизованные клетки штамма на гранулах удобрения «Аммофос» наиболее активно освобождали P_2O_5 (78,0–82,0 мг P_2O_5 /100 мл) из $Ca_3(PO_4)_2$, чем на других минеральных удобрениях. Высвобождение P_2O_5 иммобилизованными клетками штамма составили: на гранулах «Супрефоса» – 73,0–76,0 мг P_2O_5 /100 мл; на PS-Agro – 70,0–73,0 мг P_2O_5 /100 мл; на фосфогипсе – 60,0–64,0 мг P_2O_5 /100 мл и свободными клетками – до 66,0–68,0 мг P_2O_5 /100 мл соответственно на 3–5-е сутки опыта.

ABSTRACT

The possibilities of using phosphate-solubilizing microorganisms to improve the digestibility of phosphate mineral fertilizers have been studied. It has been established that there are no native microorganisms on mineral fertilizers Ammophos, PS-Agro, Suprefos-NS and phosphogypsum before and after sterilization. It is revealed that, in the immobilized state on mineral fertilizer granules, the cells of the phosphate-solubilizing strain *Bacillus subtilis* BS-26 do not lose their phosphate-solubilizing activity, compared to free cells. At the same time, immobilized cells of the strain on Ammophos fertilizer granules most actively released P_2O_5 (78.0–82.0 mg P_2O_5 /100 ml) from $Ca_3(PO_4)_2$ than on other mineral fertilizers. The release of P_2O_5 by the immobilized cells of the strain was: on Suprefos granules – 73.0–76.0 mg P_2O_5 /100 ml; on PS-Agro – 70.0–73.0 mg P_2O_5 /100 ml; on phosphogypsum 60.0–64.0 mg P_2O_5 /100 ml and free cells – up to 66.0–68.0 mg P_2O_5 /100 ml, respectively, on the 3rd–5th day of the experiment.

Ключевые слова: иммобилизация, фосфатсолубилизирующие микроорганизмы, *Bacillus subtilis* BS-26, фосфорные удобрения.

Keywords: immobilization, phosphate-solubilizing microorganisms, *Bacillus subtilis* BS-26, phosphate fertilizers.

Введение

Фосфор является основным лимитирующим элементом, входит в состав основных органоидов клеток растений, является неотъемлемой частью нуклеиновых кислот и многих ферментов, регулирующих биохимические процессы растительных и животных организмов [5; 7].

В щелочных карбонатных почвах фосфор переходит в нерастворимый $Ca_3(PO_4)_2$, а затем – апатит. Чем больше изучается фиксация соединений фосфора в почвах, тем более делается ясным, что пахотный и корнеобитаемый горизонты почвы способны поглощать, дезактивировать и задерживать от последующего выщелачивания неограниченные количества фосфора [8]. Фиксация фосфатов почвами бывает иногда настолько полной и необратимой, что даже раствор 0,2–0,5 н HCl не извлекает весь связанный фосфор [9].

Многочисленными научными исследованиями установлено, что многие микроорганизмы, такие как *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Penicillium*, *Aspergillus* и т.д., могут переводить нерастворимые соединения фосфорной кислоты в растворимое состояние в результате образования ими углекислого газа или различных кислот и ферментов [1; 10].

В некоторых случаях растворению фосфатов способствуют азотная кислота, образуемая нитрифицирующими бактериями, и серная кислота, появляющаяся в результате деятельности бактерий, окисляющих серу. Все это повышает доступность фосфора для растений [1; 6; 10].

Наряду с традиционными способами применения микробиологических биопрепаратов способ иммобилизации в гранулы минеральных удобрений микроорганизмов представляет особый интерес для сельскохозяйственного производства, поскольку способ позволяет существенно снижать нормы расхода удобрения, повышает КПД и эффективность препарата за счет рационального использования питательных веществ удобрения и мобилизации закрепленных запасов минеральных элементов почвы.

Цель работы: изучение возможности использования фосфатсолубилизирующих микроорганизмов в производстве минеральных удобрений для повышения их усвояемости, а также для активации труднодоступных фосфатных запасов почвы.

Объекты исследования

Объектами исследований являлись биомодифицированные на основе фосфатсолубилизирующего штамма бактерии *Bacillus subtilis* BS-26, фосфорные минеральные удобрения «Аммофос», PS-Agro, «Супрефос-NS» и фосфогипс.

Методы исследования

Естественная микрофлора фосфорных минеральных удобрений «Аммофос», PS-Agro и «Супрефос-NS» исследовали до и после стерилизации. При этом учитывались такие группы микроорганизмов, как аммонификаторы на среде РПА, грибы и актиномицеты на среде Чапека и олигонитрофилы на среде Эшби. Расчет числа бактерий, грибов и актиномицетов вели на 1 г воздушно-сухого носителя по формуле:

$$a = \frac{b \times v \times g}{d}$$

где а – количество клеток в 1 г носителя;
 б – среднее количество колоний на чашке;
 в – разведение, из которого сделан посев;
 г – количество капель в 1 мл суспензии;
 д – вес воздушно-сухого носителя, взятого для анализа [3].

Стерилизацию удобрений провели в автоклаве при 1 атм. в течение 1 часа. Имобилизацию клеток фосфатсольюбилизирующего штамма *Bacillus subtilis* BS-26 в гранулы фосфорных удобрений осуществляли методом адсорбционной имобилизации. После высушивания готовый сухой препарат в закрытом виде хранили при комнатной температуре [4].

Фосфатсольюбилизирующую активность имобилизованных в гранулы удобрений клеток штамма *Bacillus subtilis* BS-26 определяли при росте бактерий в жидкой питательной среде NBRIP. Для этого 10 г образца опытных удобрений растворяли в 90 мл дистиллированной воды и перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 минут для полного отделения микроорганизмов от удобрения. После отстаивания в течение 20 минут стерильной пипет-

кой 1 мл суспензии добавляли в среду NBRIP, содержащую нерастворимый $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ следующего состава: глюкоза – 10; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; KCl – 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1; неорганический фосфат $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – 5; вода водопроводная – 1000 мл; pH 7,0. Затем колбы помещали на шейкере при 37 °C и 200 об/мин. В качестве контроля использовали культуру свободных (без минеральных удобрений) клеток штамма *Bacillus subtilis* BS-26, хранившихся на скошенном агаре при температуре 4–5 °C, с периодическими пересевами. Через 1, 2 и 3 суток культуру бактерий центрифугировали, отбирали супернатант, в котором по методу Чирикова определяли содержание подвижных форм фосфора, растворимых в 0,5 М уксусной кислоты [2].

Результаты исследований и обсуждение

Исследование численности различных физиологических групп микроорганизмов на отечественных фосфорных минеральных удобрениях «Аммофос», PS-Agro, «Супрефос-NS» и фосфогипсе до и после стерилизации провели следующим образом: общее количество аммонификаторов, растущих на среде МПА, количество микромицетов и актиномицетов на среде Чапека, количество олигонитрофилов на среде Эшби, фосфатсольюбилизирующих на среде Пиковской с трикальцийфосфатом. Результаты опыта показали, что во всех изученных видах минеральных удобрений и фосфогипсе не было обнаружено посторонней микрофлоры.

Анализ результатов экспериментов по изучению фосфатсольюбилизирующей активности имобилизованных на минеральных удобрениях «Аммофос», PS-Agro, «Супрефос-NS» и фосфогипсе клеток *Bacillus subtilis* BS-26 показал, что имобилизованные клетки бактерий проявили лучшие данные по растворению $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ по сравнению со свободными (без минеральных удобрений) клетками, хранившимися на скошенном агаре при температуре 4–5 °C с периодическими пересевами (рис. 1).

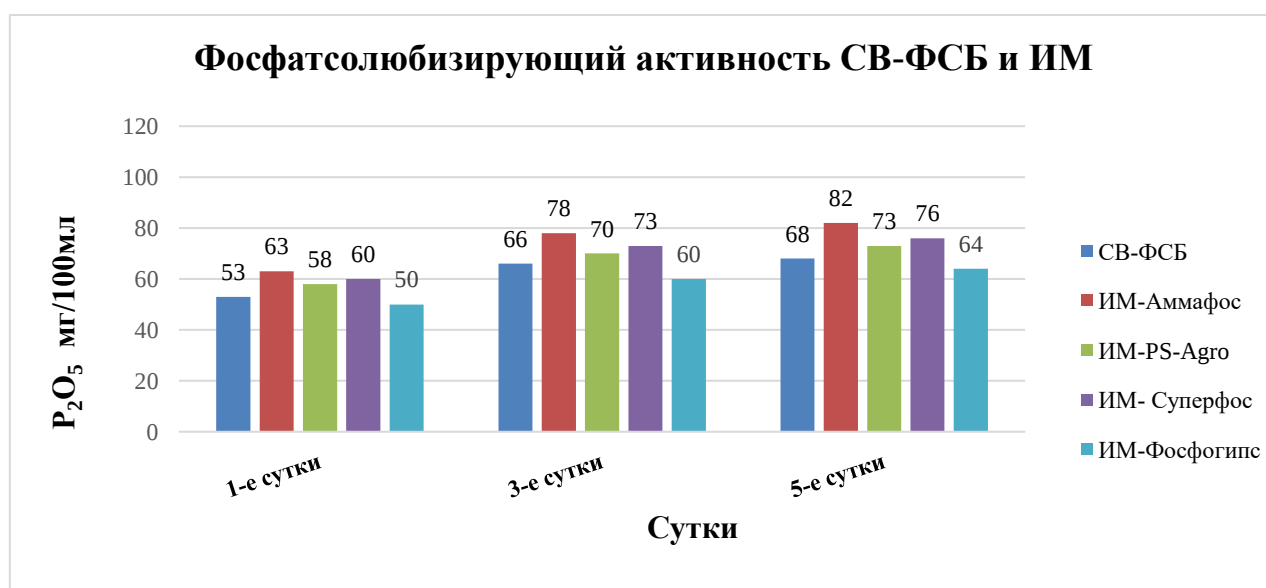


Рисунок 1. Мобилизация P_2O_5 из $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ свободными (СВ) и имобилизованными (ИМ) в гранулы удобрений клетками штамма *Bacillus subtilis* BS-26

На первые сутки опыта наиболее активную мобилизацию P_2O_5 из $Ca_3(PO_4)_2$ показали клетки, иммобилизованные на «Аммофосе» – 63,0 мг P_2O_5 /100 мл из $Ca_3(PO_4)_2$, тогда как свободные клетки освобождали до 53,0 мг P_2O_5 /100 мл. При этом наименьшую активность проявили иммобилизованные клетки на фосфогипсе – 50 мг/100 мл. На 3-е и 5-е сутки такая тенденция сохранялась, при этом на протяжении всего опыта наиболее высокую активность по растворению $Ca_3(PO_4)_2$ проявили клетки фосфатсолубилизирующего штамма, иммобилизованные на гранулах удобрения «Аммофос», освобождая 78,0–82,0 мг P_2O_5 /100 мл на 3-е и 5-е сутки опыта, а иммобилизованные на «Супрефосе» – до 73,0–76,0 мг P_2O_5 /100 мл, иммобилизованные на PS-Agro клетки – до 70,0–73,0 мг P_2O_5 /100 мл. Свободные клетки растворяли до 66,0–68,0 мг P_2O_5 /100 мл соответственно. Среди опытных вариантов наименьшую активность по растворению трикальцийфосфата проявили клетки бактерии, иммобилизованные на фосфогипсе – 60,0–64,0 мг P_2O_5 /100 мл.

Выводы

Таким образом, исследование численности различных физиологических групп микроорганизмов на отечественных фосфорных минеральных удобрениях «Аммофос», PS-Agro, «Супрефос-NS» и фосфогипсе до и после стерилизации показало, что во всех изученных видах минеральных удобрений и фосфогипсе не обнаружено посторонней микрофлоры. Результаты экспериментов по фосфатсолубилизирующей активности иммобилизованных в гранулы удобрений клеток штамма *Bacillus subtilis* BS-26 показали, что в иммобилизованном состоянии на гранулах минеральных удобрений клетки фосфатсолубилизирующего штамма не теряют свою фосфатсолубилизирующую активность по сравнению со свободными клетками. При этом иммобилизованные на гранулах удобрения «Аммофос» клетки фосфатсолубилизирующего штамма наиболее активно освобождали P_2O_5 (78,0–82,0 мг P_2O_5 /100 мл) из $Ca_3(PO_4)_2$, чем на других минеральных удобрениях. Видимо, это связано с тем, что минеральное удобрение «Аммофос» содержит в большом количестве фосфор (45,3%) и элемент N по сравнению с другими минеральными удобрениями, что благотворно влияет на фосфатсолубилизирующую активность штамма.

Список литературы:

1. Биологизация минеральных удобрений как способ повышения эффективности их использования / А.А. Завалин, В.К. Чеботарь, А.Г. Ариткин, Д.Б. Сметов // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – № 9. – С. 45–47.
2. ГОСТ 26204-91. Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Чирикова в модификации ЦИНАО. – М.: Изд-во стандартов, 1992.
3. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М., 1991. – 350 с.
4. Курдиш И.К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства. Наука и практика. – Киев, 2001. – 142 с.
5. Чеботарь В.К., Завалин А.А., Ариткин А.Г. Применение биомодифицированных минеральных удобрений: монография. – М.: ВНИИА; Ульяновск: УлГУ, 2014. – 142 с.
6. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate-solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger* / L. Zhen, T. Bai, L. Dai, F. Wang [et al.] // Sci. Rep. – 2016. – № 6. – P. 25313.
7. Alori E.T., Glick B.R., Babalola O.O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture // Front. Microbiol. – 2017. – № 8. – P. 971.
8. Phosphorus acquisition efficiency in arbuscular mycorrhizal maize is correlated with the abundance of root-external hyphae and the accumulation of transcripts encoding PHT1 phosphate transporters / R.J.H. Sawers, S.F. Svane, C. Quan, M. Grunlund [et al.] // New Phytol. – 2017. – № 214. – P. 632–643.
9. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate solubilizing bacteria inoculation / Y. Wei, Y. Zhao, M. Shi, Z. Cao [et al.] // Biores. Technol. – 2018. – № 247. – P. 190–199.
10. Long-term nitrogen fertilization decreased the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacteria in an alkaline soil / B.X. Zheng, X.L. Hao, K. Ding, J.B. Zhang [et al.] // Sci. Rep. – 2017. – № 7. – P. 42284.