

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 6, Number 306 (2014), 96 – 100

EFFECT OF THE FOSFATMOBILIZING BACTERIA ON THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF SOILS

I. E. Smirnova, R. Sh. Galimbaeva, A. Zh. Sultanov, A. A. Sabdenova

Institute of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: iesmirnova@mail.ru

Key words: phosphorus, fosfatmobilizing bacteria, soil respiration, catalase, dehydrogenase

Abstract: The effect of the fosfatmobilizing bacteria on the respiratory and enzymatic activity of the soil was studied. It has been shown that application fosfatmobilizing bacteria into the soil positively affect on the biological activity of the soil. Thus, dehydrogenase activity increased by 1.5-2.0, catalase - 1.7-2.2 times and intensity of soil respiration in 5-8 times. This has a positive effect on soil fertility.

УДК 579.64

ВЛИЯНИЕ ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ

И. Э. Смирнова, Р. Ш. Галимбаева, А. Ж. Султанова, А. А. Сабденова

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: фосфор, фосфатмобилизирующие бактерии, почвенное дыхание, дегидрогеназа, катализаза.

Аннотация. Изучено влияние фосфатмобилизирующих бактерий на дыхательную и ферментативную активность почвы. Показано, что внесение в почву фосфатмобилизирующих бактерий положительно влияет на биологическую активность почвы, активизируя ее ферментативную активность (активность дегидрогеназы увеличивается в 1,5-2,0 раза, каталазы - 1,7-2,2 раза), и повышая в 5-8 раз интенсивность почвенного дыхания, что положительно сказывается на почвенном плодородии.

Фосфор является одним из важнейших минеральных элементов в жизни растений, по своему влиянию на развитие растений он занимает второе место после азота. Недостаток фосфора сдерживает рост и развитие растений, усиленное снабжение растений фосфором позволяет получать более ранний урожай с высоким качеством продукции [1]. Несмотря на высокое содержание общего фосфора в почве, его биодоступность является лимитирующим фактором развития и продуктивности растений, это явление называется «фосфорный парадокс» [2]. Степень использования фосфора растениями из почвы составляет только 3-5%. В сельском хозяйстве, как основной отрасли потребляющей фосфорные соединения, проблема дефицита доступного фосфора в почве решается путем регулярного внесения минеральных удобрений. Однако только 10-30% вносимых фосфорных удобрений ассимилируется растениями, большая часть их переходит в труднодоступную для растений форму [3]. Альтернативой чрезмерного использования фосфорных удобрений для повышения урожайности сельскохозяйственных культур является мобилизация фосфатов из нерастворимых соединений за счет использования фосфатмобилизирующих микроорганизмов, способных переводить нерастворимые фосфаты из удобрений и почвы в

растворимую форму. Существует большое количество исследований, посвященных проблеме повышения доступности труднорастворимых фосфатов путем использования фосфатмобилизирующих микроорганизмов для сельского хозяйства [4, 5]. В то же время установлено, что применение импортных биопрепаратов в условиях Казахстана часто не приводит к повышению урожайности сельскохозяйственных культур. Это объясняется тем, что культуры микроорганизмов, входящие в состав биопрепаратов, не приживаются в почвах. На сегодняшний день отечественных биопрепаратов на основе фосфатмобилизирующих бактерий не разработано, а существующие импортные биопрепараты, из-за их неприспособленности к типам почв и природно-климатическим условиям Республики, малоэффективны. Поэтому разработка отечественных биопрепаратов на основе фосфатмобилизирующих бактерий для повышения урожайности агрокультур является актуальной задачей для Республики Казахстан.

Для практического использования фосфатмобилизирующих бактерий в сельском хозяйстве, необходимо всестороннее изучение их влияния на микробные почвенные процессы. Целью данного исследования было изучение влияния новых штаммов фосфатмобилизирующих бактерий на дыхательную и ферментативную активность почвы.

Материалы и методы

Объектами исследований служили музейные и новые штаммы фосфатмобилизирующих бактерий, выделенные из ризосферы культурных растений на юге и юго-востоке Казахстана. Образцы почв для выделения микроорганизмов отбирали с соблюдением правил асептики и помещали в стерильные пергаментные пакеты.

В работе были использованы стандартные питательные среды [6-9]. Бактерии, растворяющие фосфаты кальция, выявляли на среде Муромцева.

Фосфат кальция вносили в питательную среду методом осаждения, предложенным Герретсеном в модификации Муромцева, следующим образом: в стерильную расплавленную агаризованную среду вносили (из расчета на 1 л) $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (допускают в небольшом избытке), после его растворения, добавляли 3,8 г $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$. Соли вносили в сухом виде, что обеспечивало их постепенное взаимодействие по мере растворения. При этом по расчету на 1 л среды приходится 1,5 г свежеосажденного $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. С целью подавления роста грибов дополнительно добавляли нистатин, из расчета 500 тысяч единиц на 250 мл стерилизованной среды.

Для культивирования фосфатмобилизирующих бактерий использовали среду NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium).

Активность микробных ферментов почвы (каталазы, дегидрогеназы), а также дыхательную активность почв, определяли через 7, 21 и 30 суток после внесения фосфатмобилизирующих микроорганизмов.

Для определения каталазной активности измельченную почву (1г) вносили в сосуд емкостью 100 мл, добавляли 0,5 г CaCO_3 . Осторожно помещали на дно маленький стаканчик с 5 мл 3%-ного раствора перекиси водорода. Склянку плотно закрывали пробкой с трубкой, соединенной с бюреткой и сообщающейся с грушей. Бюретку и грушу заполняли водой. Сосуд с перекисью опрокидывали и взбалтывали в течение 1 минуты. Каталазную активность выражали в мл O_2 , выделившегося за одну минуту на грамм почвы [10].

Для определения дегидрогеназной активности 1 г почвы помещали в пробирку, добавляли 0,1 г CaCO_3 , 1 мл 0,1 М раствора глюкозы и 1 мл 1%-ного раствора трифенилтетразолия хлористого. Содержимое пробирки тщательно смешивали, закрывали, удаляли кислород и культивировали в течение двух суток при 30°C. Образовавшийся формазан экстрагировали 50 мл этанола и фильтровали. Дегидрогеназную активность выражали в единицах оптической плотности. Оптическую плотность определяли на цифровом ФЭКе АР-101 (Япония) при длине волн 460 нм [11].

Дыхательную активность почвы определяли весовым методом Изермейера и выражали в г поглощенного CO_2 [12].

Повторность опытов была 3-5-ти кратная. Результаты исследования были статистически обработаны с использованием коэффициента Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Постановку модельных опытов проводили в 250 мл вегетационных сосудах. В опытах использовали почву серозем, легкого механического состава, рН почвенной среды 6,8-7,1. Биомассу бактерий для опытов наращивали на среде NBRIP, на качалке при 180 об/мин и температуре 25-27°C, в течение 3-5 суток до концентрации клеток 10^6 - 10^7 кл/мл.

В вегетационные сосуды вносили суспензию бактерий в определенном количестве с титром 10^7 кл/мл и тщательно перемешивали. Длительность эксперимента составляла 30 суток, каждые 7 суток проводился отбор проб для определения дыхательной и ферментативной активности почвы. В течение всего эксперимента проводилось рыхление и увлажнение почвы, путем добавления определенного количества стерильной водопроводной воды.

Одним из важнейших показателей жизнедеятельности микроорганизмов в почве является почвенное дыхание. Дыхание почвы является не только показателем биохимических и биологических процессов, но также и показателем плодородия почвы в целом. В этой связи изучали влияние фосфатмобилизирующих бактерий на интенсивность почвенного дыхания. Опыты проводили в течение 30 дней, отбор проб проводили еженедельно. Дыхательную активность почвы выражали в г поглощенного диоксида углерода (CO_2). Полученные данные представлены на рисунке.



Динамика изменения активности почвенного дыхания при внесении фосфатмобилизирующих бактерий

Как видно на рисунке, исходная почва, взятая для исследования (контроль), характеризовалась крайне низким уровнем активности почвенного дыхания, который практически не менялся в течение всего опыта. Внесение фосфатмобилизирующих бактерий приводило к значительной активизации почвенного дыхания. Так, интенсивность дыхания во всех опытных образцах увеличилась в 5-8 раз по сравнению с контролем (исходная почва). Лучшим был вариант со штаммом Ф4, при внесении которого в почву, активность дыхания на 28 сутки опыта выросла в 7,9 раза по сравнению с контролем.

Одним из показателей, реально отображающих экологическое состояние почвы, является активность почвенных ферментов, рассматриваемая как совокупность процессов, катализируемых ферментами почвенной микрофлоры. С этой целью в модельных опытах изучали динамику изменения почвенных ферментов каталазы и дегидрогеназы, при внесении в нее фосфатмобилизирующих бактерий.

Дегидрогеназную активность выражали в единицах оптической плотности. Каталазную активность выражали в мл O_2 , выделившегося за одну минуту в 1 грамме почвы. Полученные данные представлены в таблице.

Из данных таблицы видно, что исходная почва характеризуется крайне низкой активностью почвенных ферментов. При внесении в почву фосфатмобилизирующих бактерий активность дегидрогеназы через 7 суток увеличивается в 1,0-1,2 раза, через 14 суток в 1,5-2,0 раза по сравнению с этими показателями у исходной почвы (контроль). Исследование изменения этого фермента в динамике показало, что после третьей недели опыта активность дегидрогеназы снижается как в опытных вариантах, так и в контроле.

Динамика изменения ферментативной активности почвы при внесении фосфатмобилизирующих бактерий

Длительность опыта	Варианты опыта	Активность почвенных ферментов	
		Дегидрогеназа	Катализ
	Исходная почва	1,55±0,3	3,31±1,2
7 сут.	Контроль	1,57±0,1	3,37±1,1
	Ф4	1,84±0,2	3,57±1,5
	Б1	1,68±0,2	3,38±0,2
	CapA	1,72±0,3	3,45±1,3
14 сут.	Контроль	1,55±0,1	3,32±1,5
	Ф4	2,95±0,5	6,97±1,9
	Б1	2,69±0,6	5,60±1,7
	CapA	2,76±0,5	6,00±1,9
21 сут.	Контроль	1,52±0,3	3,34±1,5
	Ф4	1,34±0,2	3,83±1,3
	Б1	1,36±0,1	4,13±1,5
	CapA	1,27±0,3	3,67±1,1
30 сут.	Контроль	0,32±0,02	3,32±1,2
	Ф4	0,83±0,07	4,40±1,1
	Б1	0,54±0,06	4,27±1,2
	CapA	0,44±0,05	4,50±1,5

Динамика изменения фермента каталазы аналогична изменению дегидрогеназы. При внесении в почву фосфатмобилизирующих бактерий активность каталазы через 14 суток увеличивается в 1,7-2,2 раза по сравнению с этими показателями у контроля. Показано, что после прохождения третьей недели опыта активность фермента снижается во всех вариантах опыта. Полученные данные по динамике изменения дегидрогеназной и каталазной активности почвы хорошо коррелируют с увеличением численности фосфатмобилизирующих бактерий при их внесении в почву. Можно сказать, что фосфатмобилизирующие бактерии являются одной из физиологических групп бактерий, положительно влияющих на биологическую активность почв.

Таким образом, показано, что внесение в почву фосфатмобилизирующих бактерий положительно влияет на биологическую активность почвы, активизируя не только ее ферментативную активность (дегидрогеназу и каталазу), но и увеличивая активность почвенного дыхания. При этом активность дегидрогеназы увеличивается на 14 сутки в 1,5-2,0 раза, каталазы – 1,7-2,2 раза, интенсивность почвенного дыхания возрастает в 5-8 раз по сравнению с контрольной почвой. Все это положительно сказывается на почвенном плодородии.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Чумаченко И.Н., Янишевский Ф.В. Исследование фосфатного режима почв, оптимизация питания растений и баланса фосфора в экосистемах // Агрохимия. – 2009. – № 4. – С. 94-96.
- [2] Вильдфлущ И. Р., Цыганов А. Р., Лапа В. В., Персикова Т. Ф. Рациональное применение удобрений: Пособие. – Горки: Изд-во Белорусская государственная сельско-хозяйственная академия. – 2002. – 324 с.
- [3] Omar S.A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbusular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate // World J. Microbiol. Biotech. – 1998. – Vol. 14. – P. 211-218.
- [4] Сельское хозяйство, фосфатмобилизирующие препараты: <http://selo-del.ru>
- [5] Khan A.A., Jilani G., Akhtar M.S., Naqvi S., Rasheed M. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production // J. Agric. Biol. Sci. – 2009. – Vol. 1(1). – P. 48-58.
- [6] Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – С. 59-75.
- [7] Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – С. 56-124.
- [8] Герхардт Ф. Методы общей бактериологии. – М.: Изд-во Мир, 1983. – Т. 1. – С. 234-265.
- [9] Практикум по микробиологии / Под ред. А. Н. Нетрусова. – М.: Academia, 2005. – 597 с.
- [10] Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии. – М.: МГУ, 1991. – 304 с.
- [11] Isermeyer H. Eine einfache methode fur Bestimmung der Bodenatmung und der Carbonate im Boden // Z/ Pflanzenernahr. Bodenk. – 1992. – Bd. 65. – 26 p.

REFERENCES

- [1] Chumachenko I.N., Janishevskij F.V. *Agrohimija*, **2009**, 4, 94-96 (in Russ.).
- [2] Vil'dflush I. R., Cyganov A. R., Lapa V. V., Persikova T. F. *Racional'noe primenenie udobrenij*, **2002**, 324 (in Russ.).
- [3] Omar S.A. *World J. Microbiol. Biotech.*, **1998**, 14, 211-218 (in Engl.).
- [4] Sel'skoe hozjajstvo, fosfatmobilizirujushchie preparaty: <http://selo-delo.ru> (in Russ.).
- [5] Khan A.A, Jilani G, Akhtar M.S., Naqvi S., Rasheed M. *J. Agric. Biol. Sci.*, **2009**, 1(1), 48-58 (in Engl.).
- [6] Zvagincev D.G. *Metody pochvennoj mikrobiologii i biohimii.*, **1991**, 59-75 (in Russ.).
- [7] Egorov N.S. *Praktikum po mikrobiologii*, **1976**, 56-124 (in Russ.).
- [8] Gerhardt F. *Metody obshhej bakteriologii*, **1983**, V.1, 234 - 265 (in Engl.).
- [9] *Praktikum po mikrobiologii /Pod. red. A.N. Netrusova*, **2005**, 97 (in Russ.).
- [10] Zvagincev D. G. *Metody pochvennoj mikrobiologii*, **1991**, 304 (in Russ.).
- [11] Isermeyer H. *Eine einfache methode fur Bestimmung der Bodenatmung und der Carbonate im Boden*, **1992**, 65, 26 (in Gem.).

**ФОСФАТМОБИЛИЗДЕУШІ БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ТОПЫРАҚТЫҢ
БИОЛОГИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГНЕ ӘСЕРІ**

И. Э. Смирнова, Р. Ш. Галимбаева, А. Ж. Султанова, А. А. Сабденова

РМК «Микробиология және вирусология институты» ҚР БФМ ФК, Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: фосфор, фосфатмобилиздеуші бактериялар, топырақ тыныс алуы, дегидрогеназа, катализатор.

Аннотация. Фосфатмобилиздеуші бактериялардың топырақтың тыныс алуына және ферментті белсенділігіне әсері зерттелді. Топыраққа фосфатмобилиздеуші бактерияларды енгізу топырақтың биологиялық белсенділігіне жағымды әсер ететіндігі, оның ферментті белсенділігін белсендерітіндігі (дегидрогеназалардың белсенділігі 1,5-2,0 есеге көтеріледі, каталазалар – 1,7-2,2 ессе) және топырақтың интенсивті тыныс алуын 5-8 есеге көтеретіндігі анықталды, яғни топырақтың құнарлығына жағымды.

Поступила 10.11.2014 г.