

ФОСФАТМОБІЛІЗУЮЧІ БАКТЕРІЇ ЯК КОМПОНЕНТИ ГРАНУЛЬОВАНИХ МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ КОМПЛЕКСНОЇ ДІЇ

Курдиш І.К., Рой А.О., Булавенко Л.В., Бега З.Т., Плаксюк В.М., Чуйко Н.В., Царенко І.Ю.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України
вул. академіка Заболотного, 154, м. Київ, Україна, 03143

*Виділені високоактивні штами бактерій роду *Bacillus*, здатні мобілізувати фосфор з його органічних та важкорозчинних неорганічних сполук. Ці мікроорганізми характеризуються високою антагоністичною активністю щодо фітопатогенних мікроміцетів і бактерій. На основі фосфатмобілізуючих та азотфіксуючих бактерій створені мікробні композиції і гранульовані бактеріальні препарати комплексної дії на рослини. Ці препарати характеризуються високим вмістом життєздатних клітин. Вони істотно покращують розвиток рослин і підвищують їх врожайність.*

Ключові слова: *фосфатмобілізуючі бактерії, мікробні композиції, гранульовані бактеріальні препарати.*

Оскільки врожайність сільськогосподарських культур залежить від їх забезпечення азотом, фосфором, іншими біогенними елементами, а також засобами боротьби з хворобами і шкідниками рослин, в землеробстві широко застосовуються хімічні добрива і пестициди. Однак виготовлення цих речовин – процес енергоємний, тоді як ефективність використання діючої речовини залишається низькою. Наприклад, для азотних добрив вона складає близько 44%, для калійних – 26%, а для фосфорних – тільки 17% [1]. Таким чином, основна кількість мінеральних добрив і пестицидів не надходить до цільового об'єкта, а забруднює довкілля.

Важливим напрямом підвищення врожайності рослин та екологізації землеробства є застосування мікробних препаратів. Широкого поширення в рослинництві набули рідкі та торф'яні препарати азотфіксуючих бактерій. Певною мірою з цієї метою використовували препарати фосфатмобілізуючих бактерій [2]. Однак найбільш перспективним є виготовлення препаратів комплексної дії, створених на основі двох чи більше штамів мікроорганізмів, кожен з яких характеризується специфічним позитивним впливом на розвиток рослин і врожайність культур [3]. Широке впровадження мікробних препаратів, у тому числі комплексної дії на рослини, стримується недостатньою

вивченністю біології запропонованих штамів, біотехнології отримання препаратів та відсутністю зручних для використання препаративних форм.

Мета роботи – виділити нові високоактивні штами фосфатмобілізуючих і азотфіксуючих бактерій та створити на їх основі гранульовані мікробні препарати комплексної дії на рослини.

Матеріали і методи. Спороутворюючі бактерії роду *Bacillus*, здатні мобілізувати фосфор, виділяли методом прямого висіву зразків чорнозему на агаризоване середовище Менкіної з додаванням лецитину. Ідентифікацію штамів проводили загальноприйнятими методами.

Штам *Azotobacter vinelandii* 7 був виділений нами з чорноземного ґрунту, відібраного з кореневої зони кормового буряку в Попільнянському районі Житомирської області. Поряд з цим в роботі використовували штами *A. vinelandii* 56 та *A. chroococcum* 20, надані професором А.Ф. Антипчук та *A. chroococcum* 21, наданий академіком УААН В.П. Патиною.

Бактерії роду *Bacillus* культивували в рідких поживних середовищах Менкіної або Муромцева, в які додавали гліцерофосфат кальцію або $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в кількості 2.0 г/л, відповідно. Мікроорганізми роду *Azotobacter* вирощували в середовищі Ешбі. Чисельність бактерій визначали на агаризованих поживних середовищах методом висіву із серійних послідовних розведень.

Здатність мікроорганізмів мінералізувати органічні та мобілізувати фосфати з неорганічних сполук фосфору оцінювали за інтенсивністю росту у відповідних поживних середовищах і накопичення в культуральній рідині іонів фосфату. Концентрацію останніх в середовищі визначали методом Фіске-Субароу з молібдатом амонію і аскорбіновою кислотою [4].

Фосфатазну активність визначали колориметричним методом з використанням фенолфталеїнофосфату натрію [5].

Гранульовані бактеріальні препарати виготовляли методом, описаним раніше [3].

Результати та їх обговорення. Дослідження показали, що високоактивні мікробні препарати комплексної дії на рослини можуть бути створені на основі двох чи більше культур мікроорганізмів. Вони здатні покращувати азотне та фосфорне живлення рослин, синтезувати біологічно активні речовини, які стимулюють проростання насіння, розвиток рослин, попереджувати їх ураження фітопатогенними мікроміцетами та бактеріями і захищати від шкідників. З метою створення таких препаратів нами із зразків чорноземного ґрунту виділено 16 культур, здатних мінералізувати орґанофосфати, віднесені до 4 видів роду *Bacillus*:

Bacillus megaterium (5 штамів), *B.subtilis* (4 штами), *B.pumilus* (4 штами), *B.cereus* (3 штами). Всі виділені штами активно росли в середовищі з гліцерофосфатом, накопичуючи в 1 мл культуральної рідини за 3 доби інкубування до 10^7 – 10^9 клітин та від 40 до 280 мг $\text{PO}_4^{3-}/\text{л}$. Найвищу активність мали штами *B.megaterium* 12, *B.cereus* 10 та *B.subtilis* 5. Як джерело фосфорного живлення ці бактерії здатні також використовувати фітин. Однак ця органічна сполука мінералізувалась ними менш активно (за винятком штамів *B.pumilus* 3 та 4).

Встановлено, що виділені фосфатмобілізуючі мікроорганізми мають високу фосфатазну активність. Порівняльне дослідження фосфатазної активності клітин *B.subtilis* 5 і *B.megaterium* 12 показало, що за оптимальних для функціонування фермента температури (55°C) і рН (9,5-10,0) фосфатазна активність *B.subtilis* 5 становить 260 мкмоль/г субстрату за годину, а *B.megaterium* 12 – 100 мкмоль/г субстрату за годину. Встановлено, що фосфатазна активність цих бактерій активується катіонами Mg^{2+} , Ca^{2+} і інгібується катіонами Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , а також аніонами ортофосфату (PO_4^{3-}).

Виділені штами бацил здатні мобілізувати фосфор з його важкорозчинних неорганічних сполук. За три доби інкубації цих мікроорганізмів у середовищі з $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ як єдиним джерелом фосфорного живлення чисельність бактерій зростала на 3 порядки, а в культуральній рідині накопичувалось понад 100 мг $\text{PO}_4^{3-}/\text{л}$. Одним з найактивніших штамів був *B.subtilis* 5. Встановлено, що фізіологічна активність фосфатмобілізуючих бактерій значно підвищувалась при їх гетерофазному культивуванні в живильних середовищах з глинистими мінералами (табл. 1).

Стимулюючий вплив глинистих мінералів оцінювали за ступенем їх дисперсності. Так, при культивуванні *B.subtilis* 5 в живильному середовищі, в яке вносили 0,2 % порошкоподібного монтморилоніту, чисельність бактерій у порівнянні з контролем зростала на 67 %. Ще помітніше зростання чисельності спостерігали при культивуванні бактерій з даним глинистим мінералом колоїдної дисперсності. Максимальний приріст чисельності мікроорганізмів спостерігали при внесенні у середовище 0,5 % монтморилоніту у вигляді порошку цього мінералу чи його колоїдного розчину. В даних умовах кількість бактерій у порівнянні з контролем зростала на 81 та 158,6 %, відповідно.

Фосфатмобілізуючі бактерії характеризувались високою антагоністичною активністю по відношенню до фітопатогенних мікроміцетів *Fusarium graminearum*, *F.culmorum*, *F.oxysporum*, *F.sambucinum*, *Biopolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata* та *Gliocladium roseum* (табл. 2), а також

Таблиця 1. Вплив монтморилоніту на фізіологічну активність *Bacillus subtilis* 5 при культивуванні у середовищі Муромцева з $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (час культивування – 20 год.)

Вміст мінералу, %	Стан мінералу	Чисельність життєздатних бактерій		Вміст PO_4^{3-} мг/л
		кл/мл	% до контролю	
0	-	$(1,16 \pm 0,20)10^8$	100,0	$159 \pm 19,1$
0,2	порошкоподібний	$(1,94 \pm 0,40)10^8$	167,0	$242 \pm 11,8$
0,2	колоїдний	$(2,00 \pm 0,30)10^8$	1,72,4	$298 \pm 15,4$
0,5	порошкоподібний	$(2,10 \pm 0,35)10^8$	181,0	$288 \pm 14,7$
0,5	колоїдний	$(3,00 \pm 0,41)10^8$	258,6	$299 \pm 19,3$
1,0	порошкоподібний	$(1,40 \pm 0,27)10^8$	120,7	$236 \pm 16,4$
1,0	колоїдний	$(1,97 \pm 0,40)10^8$	109,8	$251 \pm 6,9$
2,0	порошкоподібний	$(3,00 \pm 0,20)10^7$	25,9	$152 \pm 7,9$
2,0	колоїдний	$(2,70 \pm 0,30)10^7$	23,3	$156 \pm 8,9$

до ряду видів фітопатогенних бактерій (*Pseudomonas syringae* pv *syringae*, *P.fluorescens*, *Erwinia carotovora* subs. *carotovora*, *Xantomonas campestris* pv. *campestris*, *Clavibacter michiganense*).

Найширший спектр антагоністичної дії мав штам *B.subtilis* 5 (табл. 2). На ріст азотфіксуючих бактерій роду *Azotobacter* ці бактерії майже не спричиняли антагоністичного впливу.

Слід відмітити, що штам *B.subtilis* 5, а також виділений нами високоактивний штам *Azotobacter vinelandii* 7 позитивно впливали на проростання насіння ряду культурних рослин.

На основі фосфатмобілізуючих бактерій *B.subtilis* 5 та азотфіксуючих *A.chroococcum* 20, *A.vinelandii* 56 створені мікробні композиції, що спричиняють помітний вплив на проростання насіння і формування проростків томатів сорту Світанок у порівнянні з окремими монокультурами (табл. 3).

Таблиця 2. Антагоністична активність фосфатмобілізуючих бацил до фітопатогенних грибів

Штами	Fusarium graminearum	Fusarium sambucinum	Fusarium culmorum	Biopolaris sorokiniana	Alternaria alternata	Gliocladium roseum
	радіус зони пригнічення росту мікроміцетів бацилами, мм					
<i>B.megaterium</i> 1	10,5±1,5	—	13,0±1,1	38,5±2,5	3,0±0,2	—
<i>B.megaterium</i> 2	8,5±1,5	15,8±1,3	9,5±0,6	24,1±1,6	6,5±0,5	—
<i>B.megaterium</i> 9	10,0±0,4	24,1±1,8	10,1±0,7	8,5±0,5	11,5±1,5	4,8±0,8
<i>B.megaterium</i> 12	12,5±1,5	—	—	24,0±2,0	7,0±1,0	11,2±1,2
<i>B.megaterium</i> 16	20,5±0,5	15,0±1,1	11,0±1,0	28,0±1,2	5,0±0,4	12,0±0,8
<i>B.subtilis</i> 5	21,5±0,5	15,0±1,2	11,2±1,1	26,5±1,5	13,5±1,5	9,5±0,5
<i>B.subtilis</i> 11	—	—	—	—	—	—
<i>B.subtilis</i> 13	16,0±1,3	—	—	19,0±1,1	12,5±1,2	24,0±1,5
<i>B.subtilis</i> 15	16,0±1,2	—	5,9±0,2	15,0±0,9	9,0±1,0	25,0±1,6
<i>B.cereus</i> 6	12,5±1,1	15,2±1,4	—	27,5±1,5	18,8±1,6	9,5±0,8
<i>B.cereus</i> 10	20,1±1,4	—	—	10,0±1,0	14,0±1,3	—
<i>B.cereus</i> 14	7,8±0,6	9,0±0,7	7,0±0,3	32,5±1,8	11,1±0,9	25,0±1,9
<i>B.pumilus</i> 3	13,5±1,1	16,0±1,4	10,0±1,0	22,5±1,5	2,8±0,2	10,0±1,0
<i>B.pumilus</i> 4	11,5±1,0	—	—	—	—	—
<i>B.pumilus</i> 7	6,0±0,2	—	3,0±0,4	31,0±1,8	—	—
<i>B.pumilus</i> 8	—	—	7,8±0,3	—	5,5±0,5	—

Примітки: “—” відсутність зони пригнічення; *B.subtilis* 5 також пригнічує ріст *F.oxysporum* (зона пригнічення - 9,0±1,0 мм).

Таблиця 3. Вплив *Azotobacter chroococcum* 20, *Azotobacter vinelandii* 56, *Bacillus subtilis* 5 та їх бінарних культур на енергію проростання насіння і формування проростків томатів сорту Світанок

Обробка насіння	Енергія проростання		Кількість нормально сформованих проростків	
	штук	%	штук	%
Контроль (H ₂ O)	54,4±3,4	100,0	34,2±7,7	100,0
<i>A.chroococcum</i> 20	60,9±6,0	111,9	37,3±9,9	109,1
<i>A.vinelandii</i> 56	64,0±6,8	117,6	36,5±3,7	106,7
<i>B.subtilis</i> 5	61,3±3,3	112,7	42,9±5,7	125,4
<i>A.chroococcum</i> 20 + <i>B.subtilis</i> 5	64,9±5,1	119,3	45,6±6,1	133,3
<i>A.vinelandii</i> 56 + <i>B.subtilis</i> 5	65,6±3,8	120,6	40,0±7,0	117,0

Внесення мікробних композицій *B.subtilis* 5 та *A.vinelandii* 56 під розсаду огірків сорту Вокал в умовах гідропоніки сприяло підвищенню їх врожайності майже на 19%, тоді як окремі монокультури спричиняли менш помітний вплив (табл. 4).

Таблиця 4. Вплив бактеріальної обробки розсади огірків сорту Вокал на їх врожайність

Обробка розсади	Врожайність рослин		
	з 1 м ² , кг	% до контролю	маса зібраних огірків, кг
Контроль (препарат не вносили)	6,20	100,0	5971
<i>A.vinelandii</i> 56 + <i>B.subtilis</i> 5	7,37	118,9	7093
<i>A.vinelandii</i> 56	6,96	112,0	6697
<i>B.subtilis</i> 5	6,32	102,0	6084

Зважаючи на пластифікаційні властивості глинистих мінералів, їх стимулюючий вплив на фізіологічну активність бактерій та здатність захищати їх від дії шкідливих факторів [7] на основі взаємодії створених нами бактеріальних композицій з цими мінералами розроблені

гранульовані мікробні препарати комплексної дії на рослини. Ці препарати характеризуються високим вмістом життєздатних клітин (табл. 5), вони добре зберігаються і зручні в застосуванні.

Таблиця 5. Вихід життєздатних бактерій у комплексному гранульованому препараті Azotobacter vinelandii 7 та Bacillus subtilis 5

Показник	A.vinelandii 7	B.subtilis 5
Об'єм суспензії, мл	385,0	385,0
Питома чисельність бактерій, кл/мл	6,3x10 ⁸	2,3x10 ⁸
Загальна чисельність бактерій в суспензії, кл	2,4x10 ¹¹	8,9x10 ¹⁰
Маса отриманого препарату, г	1743,0	
Чисельність життєздатних бактерій у препараті, кл/г	1,07x10 ⁸	5,2x10 ⁷
Загальна чисельність бактерій у препараті, кл	1,9x10 ¹¹	9,1x10 ¹⁰
Вихід життєздатних клітин, %	79,2	102,2

Таблиця 6. Вплив гранульованих бактеріальних препаратів на врожайність томатів сорту Червона стріла

Препарат	Врожай, кг/ділянку	Прибавка врожаю	
		кг/ділянку	%
Контроль (препарат не вносили)	2556,5	—	100
A.vinelandii 56	3037,1	480,5	118,8
A.vinelandii 7	3264,5	708,0	127,7
B.subtilis IMB B – 7023 + A.vinelandii 56	3351,6	795,1	131,1
B.subtilis IMB B – 7023 + A.vinelandii 7	3502,4	945,9	137,0

Примітка: площа теплиці 452 м²

Дослідно-промислова перевірка ефективності впливу гранульованих препаратів комплексної дії на рослини показала їх високу ефективність. Ці препарати значно покращують розвиток троянд сорту Іліус, підвищуючи кількість квітконосних пагонів. Гранульовані бактеріальні препарати істотно впливають на врожайність томатів при

їх вирощуванні у теплицях в умовах краплинного зрошування. Особливо помітний стимулюючий вплив спричиняли гранульовані препарати комплексної дії у складі *B.subtilis* 5 та *A.vinelandii* 7 на врожайність томатів сорту Червона стріла в умовах закритого ґрунту. Врожайність цієї культури зростала по відношенню до контролю на 37% (табл. 6).

Гранульовані бактеріальні препарати комплексної дії стимулюють розвиток та врожайність ряду видів рослин як у тепличних, так і в польових умовах. Вони є перспективним засобом регуляції стану агроценозів.

1. Волгогон В.В. Ассоциативные азотфиксирующие микроорганизмы // Микробиол. журн. – 2000. – 62, № 2. – С. 54 – 68.

2. Мікроорганізми і альтернативне землеробство / Під ред. В.П.Патики. – Київ: Урожай, 1993. – 173 с.

3. Курдиш И.К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: Наука и практика. Київ: РІВЦ, 2001. – 141 с.

4. Унифицированные методы анализа вод / Под. ред. Ю.Ю. Лурье. – М.: Химия, 1971. – 207 с.

5. Калашникова Н.А., Родзевич В.И. Активность фосфатаз различных культур плесневых грибов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1971. – Т. 7, № 4. – С. 446 – 450.

6. Пат. України № 57269 А МКИ⁴ С05711/08 Спосіб одержання гранульованих бактеріальних препаратів / І.К.Курдиш, А.О.Рой, З.Т.Бега. – Опубл. 16.06.2003, Бюл. № 6.

7. Курдиш И.К., Антонюк Т.С. Влияние глинистых минералов на жизнеспособность некоторых бактерий при повышенных температурах // Микробиол. журн. – 2000. – Т. 61, № 3. – С. 3-8.

ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ КАК КОМПОНЕНТЫ ГРАНУЛИРОВАННЫХ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ КОМПЛЕКСНОГО ДЕЙСТВИЯ НА РАСТЕНИЯ

Курдиш И.К., Рой А.А., Булавенко Л.В., Бега З.Т., Плаксюк В.М., Чуйко Н.В., Царенко И.Ю.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, г. Киев

Выделены высокоактивные штаммы бактерий рода Bacillus, которые способны мобилизовать фосфор из его органических и труднорастворимых неорганических соединений. Эти микроорганизмы характеризуются высокой антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микромицетам и бактериям. На основе фосфатмобилизирующих и азотфиксирующих бактерий созданы микробные композиции и гранулированные бактериальные препараты комплексного действия на растения. Эти препараты характеризуются высоким содержанием жизнеспособных клеток. Они существенно улучшают развитие растений и повышают их урожайность.

Ключевые слова: *фосфатмобилизирующие бактерии, микробные композиции, гранулированные бактериальные препараты.*

PHOSPHATE-MOBILIZED BACTERIA – COMPONENTS GRANULATED MICROBIAL PREPARATIONS OF COMPLEX ACTION ON PLANTS.

Kurdish I.K., Roy A.A., Bulavenko L.V., Bega Z.T., Placsuk V.M., Chuiiko N.V., Tsarenko I.Y.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, UNAS, Kyiv

The high activity strains of Bacillus species that mobilized phosphorus from organic and hard-solving inorganic compounds are isolated. These microorganisms are characterized a high antagonistic activity by phytopathogenic micromycetes and bacteria. On the basis phosphate-mobilized and nitrogen-fixing bacteria the microbial compositions and granulated bacterial preparations of complex action on plants are created. These preparations are contained the high amount a living cells. They essentially improve the development and increase the yield of plants.

Key words: *phosphate-mobilized bacteria, the microbial compositions, granulated bacterial preparations.*