

БИОЛОГИЯ ИЛИМДЕРИ
БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ
BIOLOGICAL SCIENCES

Тынчтыкбек кызы С., Дөөлөткелдиева Т.

**STREPTOMYCES ШТАММДАРЫНЫН ФОСФАТ ЭРИТҮҮ
АКТИВДҮҮЛҮГҮН БААЛОО**

Тынчтыкбек кызы С., Доолоткелдиева Т.

**ОЦЕНКА ФОСФАТРАСТВОРЯЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ
ШТАММОВ STREPTOMYCES**

Tynchtykbek kyzy S., T. Doolotkeldieva

**EVALUATION OF PHOSPHATE SOLUBILIZATION
ACTIVITY OF STREPTOMYCES STRAINS**

УДК: 579.873.71

Фосфор – өсүмдүктөрдүн өсүп өнүгүүсү үчүн керектелген маанилүү макроэлементтердин бири. Белгилүү болгондой ризосферадагы микроорганизмдердин көбү, анын ичинен *Streptomyces* уруусундагы актиномицеттер эрибеген фосфаттарды эритип, өсүмдүктөр кабыл ала турган формага алып келишет. Буга байланыштуу бул изилдөөдө Жети-Өгүз капчыгайынын кара топурагынан бөлүнүп алынган *Streptomyces* уруусуна кирген үч штамм алынды. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ эрибеген фосфатты кармаган NBRIP катуу чөйрөсүндө үч штаммдын культураларынын суспензиялары куюлган чункурлардын айланаларында ачык түссүздөнгөн зоналар пайда кылганы аныкталды. Изилдөө үч жолу кайталанып, ар бир кайталоодо пайда болгон түссүздөнгөн зоналар ченелип, жыйынтыктары орточо эсеп менен эсептелди. Жыйынтыктарга ылайык алынган үч штаммдын ичинен C1-4 жана Пч-3 штаммдары жогорку көрсөткүчтөрдү көрсөтүп, фосфат эритүү жөндөмдүүлүгү боюнча көбүрөөк активдүү деп табылды. Эрибеген заттардын эришинин натыйжасы *Streptomyces* C1-4 жана Пч-3 штаммдарынын культуралары тарабынан органикалык глюкон кислотасы бөлүнүп чыгарыларын көрсөтөт.

Негизги сөздөр: фосфор, азык чөйрөсү, фосфат, эритүү активдүүлүгү, глюкон кислотасы, активдүү, суспензиялар.

Фосфор является одним из наиболее важных макроэлементов необходимых для роста и развития растений. Известно, что большое количество микроорганизмов, в том числе актиномицеты из рода *Streptomyces* присутствующих в ризосфере, растворяют и делают доступными для растений нерастворимые фосфаты в доступной форме. Связи с этим для данного исследования были взяты три штамма *Streptomyces*, выделенные из горного чернозём-

ма ущелья Джети-Огуз. На агаровой среде NBRIP содержащий нерастворимый фосфат $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ были выявлены четкие прозрачные ореолы вокруг лунок с суспензиями штаммов. Исследование повторялось три раза и каждый раз образовавшиеся прозрачные ореолы измерялись и выводились среднеарифметические подсчёты. По итогам результатов, из взятых трёх штаммов два штамма C1-4 и Пч-3 показали хорошие показатели и были отобраны как наиболее активными в растворении фосфата. Результаты растворения нерастворяющихся веществ указывает что культуры штаммов C1-4 и Пч-3 могут продуцировать органическую-глюконовую кислоту.

Ключевые слова: фосфор, пищевая среда, фосфат, растворимая активность, глюконовая кислота, активная, суспензия.

Phosphorus is one of the most vital macronutrients required for the growth and development of plants. A large number of microorganisms, including actinomycetes of the genus *Streptomyces* present in the rhizosphere are known to solubilize phosphorus and make this element available to plants. Three strains of *Streptomyces* isolated from the mountain's soil of the Jety-Oguz gorge were taken for this study. On the NBRIP agar medium containing insoluble $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ phosphate have been identified clear halo zones around holes with strains' suspensions of *Streptomyces*. The procedure was repeated three times and each time the resulting transparent halos were measured and displayed arithmetic mean calculations. Among these three strains, two strains C1-4 and Pch-3 showed the highest activity of phosphate solubilization. These results indicate that *Streptomyces* strains are able to produce the organic gluconic acid to environment.

Key words: phosphorus, food medium, phosphate, soluble activity, gluconic acid, active, suspension.

Введение. Фосфор (P) является одним из важнейших элементов, необходимых для развития и роста растений, он составляет около 0,2% от сухого веса растений. Среди минеральных питательных веществ фосфор уступает только азоту [1]. Ограниченная доступность из-за низкой растворимости и фиксации в почве фосфора (P) часто ограничивает рост сельскохозяйственных культур [2]. Поэтому химически солиubilizированные (растворимые) фосфатные удобрения применяются для достижения максимальной продуктивности сельскохозяйственных культур [3]. Но большая часть этих удобрений превращаются в недоступные формы, что приводит к необходимым повторным применениям, которые в свою очередь значительно превышают потребность растений и создают экологические проблемы. Высокая стоимость производства химических удобрений и экологические проблемы стимулируют спрос на более дешёвые, экологичные и устойчивые методы [4]. Основным механизмом солиubilизации (растворения) фосфатов фосфатрастворяющими бактериями связан с высвобождением низкомолекулярных органических

кислот, главным образом глюконовой кислоты. Глюконовая кислота хелатирует противоактилоны (Ca^{2+}) отрицательно заряженного нерастворимого фосфата через его карбоксильную группу, превращая в растворимые формы [5].

Принимая во внимание высокий потенциал фосфотрастворяющих стрептомицетов как эффективных, экологически чистых биоудобрений для улучшения фосфора питания растений и повышения урожайности сельскохозяйственных культур [6], в настоящем исследовании ставилась цель изучить фосфатрастворяющей активности штамм *Streptomyces*. Штаммы *Streptomyces* были выделены из образцов почв, собранных в ущелье Джети-Огуз, на высоте 2212 метра.

Материалы и методы.

Характеристики использованных в исследовании штаммов *Streptomyces*.

В данной исследовании использовались три штамма (C1-4, Пч-3 и Тр-5.9) *Streptomyces* выделенные из почвенных образцов, взятых из естественных экосистем Иссык-Кульской области (табл. 1).

Таблица 1

Характеристики штаммов *Streptomyces*

Лабораторный коллекционный номер штаммов <i>Streptomyces</i>	Источник выделения	Культурально-морфологические характеристики штаммов <i>Streptomyces</i>
C1-4 (<i>Streptomyces fumanus</i>)	Был выделен из горного чернозема Иссык-Кульской области, Джети-Огузского ущелья, на высоте 2212 метра.	Хорошо растёт на крахмало-аммиачной среде и овсяно-агарной среде. При оптимальных условиях (pH 6.0-7.2, t-26-28°C) видимый рост на 3-4 сутки после посева. Края колонии волнистые и покрыты ватообразным мицелием, цепочки спор прямые. Продуцируют специфический запах.
Пч-3 (<i>Streptomyces bambergensis</i>)	Был выделен из горного чернозема Иссык-Кульской области, Джети-Огузского ущелья, на высоте 2212 метра.	Хорошо растёт на крахмало-аммиачной среде и овсяно-агарной среде. При оптимальных условиях (pH 7.0-7.2, t-26-28°C) видимый рост на 3-4 сутки после посева. Края колонии волнистые и покрыты коротким ватообразным мицелием, цепочки спор прямые. Продуцируют специфический запах.
Тр-5.9 (<i>Streptomyces violaceoruber</i>)	Был выделен из горного чернозема Иссык-Кульской области, Джети-Огузского ущелья, на высоте 2212 метра.	Хорошо растёт на крахмало-аммиачной среде и овсяно-агарной среде. При оптимальных условиях (pH 7.0-7.2, t-26-28°C) видимый рост на 3-4 сутки после посева. Колонии бархатистые и покрыты коротким ватообразным мицелием, цепочки спор спиралевидные. Продуцируют специфический запах характерный для почв.

Состав питательных сред, использованных в исследовании.

• Крахмало-аммиачный агар (КАА) - среда синтетическая, твёрдая, селективная. Имеет следующий состав, г: крахмал - 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2, K_2HPO_4 - 1, MgSO_4 - 1, CaCO_3 - 3, агар-агар - 20, вода дистиллированная - 1000 мл.

• Жидкая овсяная среда для культивирования суспензий штаммов *Streptomyces* - имеет следующий состав, г: овсяная крупа - 20, вода дистиллированная - 1000 мл;

• Овсяно-агарная среда - состав, грамм: отрубь овсяной - 20, агар-агар - 20, вода из под крана - 1000 мл;

• Питательная среда NBRIP - состав, г: глюкоза - 10, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,25, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 5, KCl - 0,2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,1, агар-агар - 20, pH - 7,0) содержащего $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в качестве единственного источника фосфата.

Метод выявления фосфатрастворяющей активности штаммов *Streptomyces*.

Скрининг фосфатрастворяющей активности штаммов *Streptomyces* проводился на питательной среде

NBRIP содержащего $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в качестве единственного источника фосфата (Nautiyal et al., 1999) [7]. На чашках с питательной средой сделали лунки и в них вливали суспензии спор штаммов (С1-4; Рч-3; Тр-59) культивированные в жидкой среде в течении 7 дней, через двух недельной инкубации при температуре +26-28°C, вокруг лунок должны образоваться прозрачные ореолы (зоны растворения фосфат). Эксперимент повторяли 3 раза на каждый штамм *Streptomyces* и каждый раз образовавшиеся прозрачные ореолы вокруг лунок измеряли и из результатов измерений (в мм) выводили среднеарифметический подсчёт.

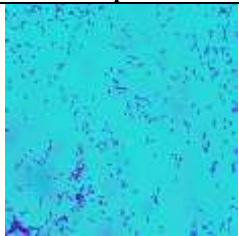
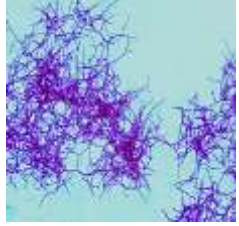
Результаты.

Культуральные особенности штаммов *Streptomyces* на различных питательных средах.

Используемые в опыте штаммы дали различного оттенка цветов колонии на различных питательных средах. Данные таблицы 2 показывают результаты выращивания штаммов *Streptomyces* на агаризированно-овсяной среде.

Таблица 2

Чистые культуры штаммов *Streptomyces* на агаризированной-овсяной и жидкой овсяной среде

Коллекционный номер штаммов	Колонии чистых культур штаммов на плотной среде	Вид суспензий в жидкой среде	Клетки и споры штаммов под микроскопом
С1-4			
Рч-3			
Тр-5.9			

Штамм С1-4 (*Streptomyces fumanus*) на агаризованно-овсяной среде - воздушные мицелии бледно розового оттенка, а субстратные мицелии бледно коричневого оттенка. Штамм Пч-3 (*Streptomyces bambbergensis*) образует воздушные мицелии желто серого оттенка, а субстратные мицелии коричневого оттенка. Штамм Тр-5.9 (*Streptomyces violaceoruber*) – воздушные мицелии сине-фиолетового оттенка, а субстратные мицелии темно синего оттенка.

Из полученных чистых культур культивировались суспензии в жидкой среде и в течении 7 дней

выращивались в шейкере при 220 обороте в минуту для получения жидкого концентрата спор.

Выявления фосфатрастворяющей активности штаммов *Streptomyces*.

Из трёх исследуемых, два штамма: С1-4 и Пч-3 показали наиболее сильные фосфатрастворяющие способности, демонстрируя четкие зоны прозрачного ореола вокруг лунок. Вокруг лунок с суспензией штамма Тр-5.9 выросла только культура, а прозрачный ореол не наблюдался (рис. 1).



Рис. 1. а) зона лизис вокруг лунки штамма С1-4, б) зона лизис вокруг лунки штамма Пч-3, в) штамм Тр-5.9 не проявил лизис зоны.

Зона растворения вокруг лунок на агаровых пластинках NBRIP после двух недель инкубации при температуре +26- 28°C варьировало от 2,1 до 3,5 мм по результатам трёх повторений. Штамм С1-4 показал самые высокие результаты, усреднённый показате

тель трёх повторений составил $2,86 \text{ мм} \pm 0,64$ стандартным отклонением (рис. 2). Штамм Пч-3 показал тоже неплохие результаты, усреднённый показатель трёх повторений составил $2,2 \text{ мм}, \pm 0,8$ стандартным отклонением (рисунок 3).

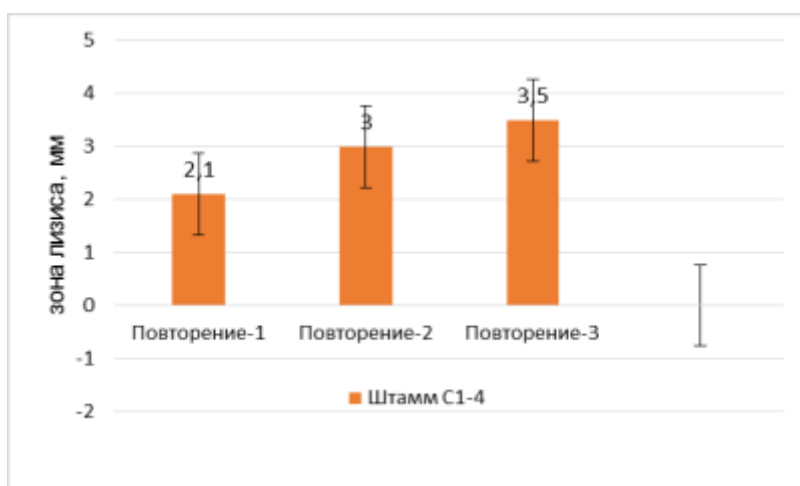


Рис. 2. Результаты измерений по размерам образовавшихся прозрачных ореол после трехкратного повторения.

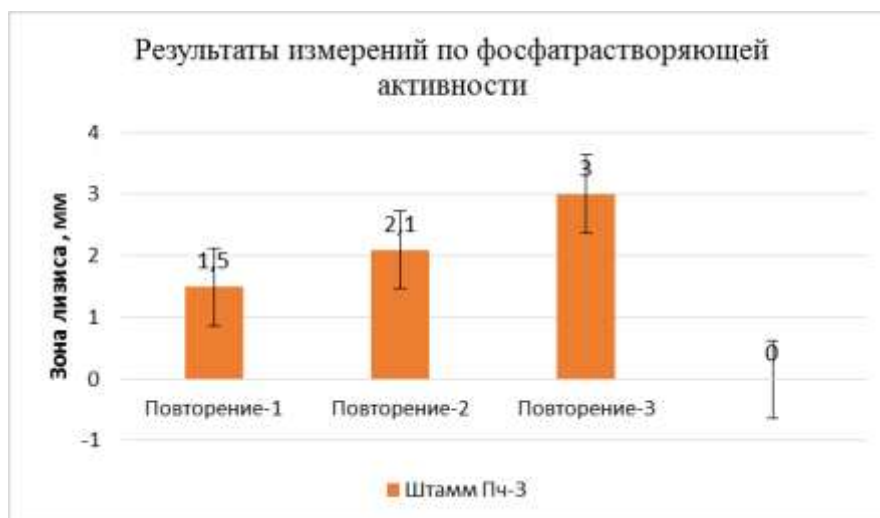


Рис. 3. Результаты измерений по размерам образовавшихся прозрачных ореол после трехкратного повторения.

Наличие прозрачных ореол вокруг лунок, прямое доказательство того что нерастворимый фосфат, а точнее $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ растворился благодаря высвобождению низкомолекулярной органической кислоты, главным образом глюконовой кислоты культурами штаммов С1-4 и Пч-3.

Вывод. Исходя из результатов данного исследования, из трёх изолятов штаммы С1-4 и Пч-3 оказались наиболее активны в фосфатрастворении. По результатам измерений прозрачных ореол, разница между штаммами С1-4 и Пч-3 оказались не такими уж большими. Дальнейшие исследования, посвящённые изучению потенциального влияния природных соединений в сочетании со штаммами С1-4 и Пч-3 *Streptomyces*, могут привести внедрению дешёвых, экологически чистых и устойчивых методов повышения урожайности сельскохозяйственных культур.

Литература:

1. Azziz G., Bajsa N., Haghjou T., Taulé C., Valverde A., Igual J., et al. (2012). Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils

under crop-pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. Appl. Soil Ecol. 61 320–326.10.1016/j.apsoil.2011.10.004

2. Gulati and Rahi P Vyas P Characterization of phosphate-solubilizing fluorescent Pseudomonads from the rhizosphere of seabuckthorn growing in the cold deserts of Himalayas Curr Microbiol 2008 56 7 39.
3. Gyaneshwar P., Kumar G.N., Parekh L.J. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants Plant Soil 2002 245 83 93
4. Macias FA Marin D Oliveros-Bastidas A et al. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development Biol Sci Space 2003 17 18 23.
5. Vyas P. Gulati A. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by 9 phosphate-solubilizing fluorescent Pseudomonas BMC Microbiol 2009 9 174.
6. <https://academic.oup.com/femsle/article/362/5/fnv008/468182> 26.11.2019.
7. Nautiyal C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilising microorganisms FEMS Microbiol Lett 1999 170 265 70.