

## РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ИЗВЛЕЧЕНИИ ФОСФОРА ИЗ АГРОХИМИЧЕСКОГО СЫРЬЯ

Е.Г. Мусич<sup>1</sup>, П.Г. Дульнев<sup>2</sup>, В.П. Ландин<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ДУ «Институт геохімії навколишнього середовища НАН України»

<sup>2</sup> Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

<sup>3</sup> Інститут агроекології і природокористування НААН

*Розглянуто питання біодоступності фосфору як ключового елемента живлення рослин. Висвітлено геохімічну дію мікроорганізмів щодо переробки природних копалин з метою вилучення певних продуктів, зокрема агрохімічного призначення. Доведено, що деякі види мікроорганізмів беруть участь у трансформації нерозчинних фосфатних сполук різного походження. Встановлено, що головним чинником мобілізації фосфату з руд є хелатоутворення. Фосфатази мікроорганізмів беруть участь у мінералізації залишків тваринної і рослинної речовини. Обґрунтовано мікробіологічні та біотехнологічні методи прямої мікробної фосфатсолубілізації важкорозчинних фосфатів для використання їх у сільському господарстві.*

**Ключові слова:** фосфор, фосфатсолубілізуючі мікроорганізми, біодобриво.

На современном этапе интенсивного развития аграрного производства одним из основных условий получения высокого урожая и соответствующего качества продукции является сбалансированное питание растений макро- и микроэлементами, особенно при низкой почвенной доступности многих из этих элементов. Это касается и фосфора, дефицит которого практически всегда имеет место в почвах.

Как известно, естественный биогеохимический круговорот фосфора в биосфере не сбалансирован. Основные запасы элемента содержатся в горных породах (апатиты, фосфориты), из которых в процессе выщелачивания водорастворимые фосфаты поступают в наземные и водные экосистемы. В экосистемах суши фосфор поглощается растениями из водного раствора в виде неорганического фосфат-иона и включается в состав различных фосфорорганических соединений. По пищевым цепям фосфорсодержащее органическое вещество переходит от растений к другим организмам экосистемы. Химически связанный фосфор попадает с остатками растений и животных в почву, где подвергается воздействию микроорганизмов

и превращается в минеральные соединения, доступные растениям при фотосинтезе [1].

При интенсивной сельскохозяйственной эксплуатации земель потери фосфора в ландшафте становятся практически необратимыми. Компенсация возможна только за счет применения фосфорных удобрений, получаемых исключительно химическим путем. Фосфорные удобрения, в зависимости от растворимости и доступности для растений, подразделяют на три группы:

- удобрения, содержащие фосфор в водорастворимой форме: суперфосфат простой и суперфосфат двойной. Фосфор из этих удобрений легко доступен растениям;
- удобрения, фосфор которых не растворим в воде, но растворим в слабых кислотах (2%-ной лимонной кислоте) или в щелочном растворе лимоннокислого аммония: преципитат, томасшлак, термофосфаты, обесфторенный фосфат. Фосфор в этих удобрениях находится в доступной растениям форме;
- удобрения, не растворимые в воде, малорастворимые в слабых кислотах и полностью растворимые только в сильных кислотах. Это более труднодоступные источники фосфора для растений, не усваивающиеся большинством культур, но под

действием кислотности почвы, корневых выделений растений фосфор этих удобрений постепенно переходит в усвояемую для растений форму.

С экологической точки зрения, фосфорное производство является достаточно вредным, приводит к деградации окружающей среды, а промышленные регионы вследствие химического преобразования данного элемента превращаются в очаговые зоны глубоких изменений в литосфере и биосфере. Одной из главных причин образования вредных отходов является низкое качество исходного сырья, которое по своей генетической природе нестабильно по химическому и минералогическому составу, в результате чего является труднообогатимым.

Актуальный поиск новых подходов к обеспечению растений фосфором и доступности его для применения в сельском хозяйстве обусловлен неблагоприятным воздействием на окружающую среду имеющимися на сегодняшний день химическими методами получения фосфорных удобрений, истощением ресурсов высококачественных фосфатных пород, а отсюда и ростом цены на них.

Альтернативой существующим химическим методам извлечения фосфора и приготовления удобрений может служить процесс прямого микробиологического высвобождения (солюбилизации) фосфатов из нерастворимого сырья. Процесс основан на использовании метаболической активности высокоактивных фосфатсолюбилизирующих культур микроорганизмов, которые встречаются в природе в различных экологических нишах и способны медленно переводить нерастворимые фосфаты из фосфорсодержащих рудных материалов в растворимую форму в ходе своей жизнедеятельности за счет выделения фосфатаз.

Цель работы — обосновать возможность использования микроорганизмов как альтернативу химическому методу извлечения фосфора из фосфорсодержащего сырья и получения нового поколения биоудобрений.

Статья основана на результатах работ отечественных и зарубежных авторов в области биогеохимии фосфора и микробиологических процессов, связанных с использованием агрохимического сырья, созданием биофосфорных удобрений для ликвидации последствий антропогенной деятельности человека.

Фосфор (P) вместе с азотом (N) является ключевым элементом питания растений. Он участвует практически во всех основных метаболических процессах растений, включая фотосинтез и дыхание, передачу и консервацию энергии, молекулярный биосинтез и трансдукцию сигналов, а также фиксацию азота в бобовых. Несмотря на то, что фосфор содержится в почвах в неорганических и органических формах в достаточном количестве, он является ограничивающим фактором роста растений, поскольку находится в недоступной форме для поглощения корнями растений.

Основная масса фосфора находится в форме минеральных и органических соединений, недоступных для растений [2]. В материнских породах он содержится чаще в виде фторапатита  $\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$  и гидроксилapatита  $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ . При разрушении этих первичных фосфорсодержащих минералов образуются вторичные минеральные соединения фосфора — соли ортофосфорной кислоты. В кислых почвах (дерново-подзолистых и красноземах) образуются фосфаты окислов  $\text{AlPO}_4$  и  $\text{FePO}_4$ , а также основные соли железа и алюминия  $\text{Fe}_2(\text{OH})_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Al}_2(\text{OH})_3\text{PO}_4$ , которые характеризуются очень слабой растворимостью и доступностью для растений. В почвах, насыщенных основаниями (черноземах и сероземах), образуются преимущественно слаборастворимые в воде фосфаты кальция типа октокальцийфосфата  $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3$ . Постепенно они растворяются под воздействием кислот (угольной, азотной и органических), содержащихся в почвенном растворе. В результате фосфор становится более доступен растениям, чем из апатита и фосфатов. Во всех почвах в незначительном количестве присутствуют хорошо растворимые в воде однозамещен-

ные фосфаты кальция и магния, а также одно- и двухзамещенные фосфаты калия, натрия и аммония. Они быстро используются растениями, микроорганизмами и превращаются в нерастворимые фосфаты при взаимодействии с Ca, Mg, Al и Fe.

В результате деятельности растений и микроорганизмов в почвах накапливаются органические соединения фосфора, но растения могут усваивать их только после минерализации. Только 0,1% общего количества имеющегося фосфора находится в растворимой форме, доступной для поглощения растениями.

Результаты фундаментальных исследований геохимической деятельности микроорганизмов послужили толчком к направленному применению бактериальных методов для переработки природных ископаемых с целью извлечения ценных продуктов [3–5]. В гидрометаллургических процессах принимает участие широкая группа микроорганизмов — классические виды бактерий, микроскопических грибов, широко распространенных в природных и искусственных экологических нишах: виды родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Azospirillum*, *Flavobacterium*, *Erwinia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*.

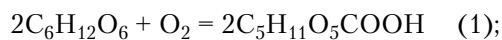
Ряд исследователей считают [6, 7], что основным фактором мобилизации фосфора из руд является хелатообразование. В процессе жизнедеятельности микроорганизмы образуют продукты метаболизма, органические моно-дитрикарбоновые кислоты (уксусная, щавелевая, янтарная, лимонная, пропионовая), фенольные соединения, непосредственно действующие на минералы и разрушающие их. Существует тесная связь между органическим веществом почвы и продуктами метаболизма микроорганизмов. Анионы различных карбо- и аминокислот, некоторые сахара, гумус, лигнин образуют с Ca, Fe, Al более доступны для растений соединения, чем фосфаты соответствующих оснований. Образуется недиссоциирующий органометаллический комплекс, а в почвенный раствор выделяется эквивалентное количество фосфата.

Схематически процесс можно представить следующим образом:

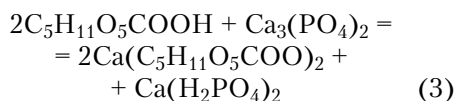
Me-фосфат (осадок) + В = Me-B  
(осадок или комплекс) + фосфат,  
где В — продукт жизнедеятельности микроорганизмов.

Для бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* показано, что в лимоннокислом буферном растворе растворимость  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  существенно повышается с 20,0 до 65,0% при оптимальном pH<sub>5,0</sub>. Мобилизация фосфора из труднорастворимого фосфата кальция осуществлялась при контакте минерала с кислыми зонами гликокаликса бактерий. Дальнейшее культивирование их на среде Эшби и гороховом отваре с  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  показало полное удовлетворение потребности культур в фосфорном питании вследствие растворения фосфата кальция.

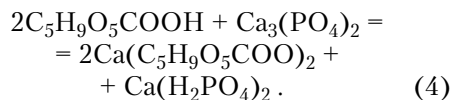
Следует отметить, что *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 способен к мобилизации фосфора непосредственно из фосфатных руд за счет синтеза группы глюконовых кислот. Было установлено [8], что высвобождение фосфора из нерастворимого минерального сырья осуществляется бактерией через образование глюконовой и кетоглюконовой кислот в результате прямого полного окисления глюкозы по схеме:



Образовавшиеся кислоты способствуют растворению трикальцийфосфата:



или



Важным источником свободных органических соединений фосфора в биосфере является разрушение и минерализация животного и растительного вещества. Органически связанный фосфор непосредственно не используется живыми организмами, так

как не может проникнуть в клетку в данной форме. Для этого фосфор минерализуется фосфатазами. В почве в этом процессе может принимать участие 70–80% микробной популяции следующих бактерий: *Bacillus megaterium*, *B. Subtilis*, *B. malabarensis*, *Serratia* sp., *Proteus* spp., *Arthrobacter* spp., *Streptomyces* spp. и грибов: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Cunninghamella* sp. Микроорганизмы образуют и выделяют фосфатазы определенной субстратной специфичности после своей гибели.

Микроскопические грибы родов *Penicillium* и *Trichoderma* обладают высокой фосфатмобилизирующей активностью, способствуя образованию неорганических отложений, накапливая внутриклеточные полифосфатные гранулы. Процесс считают временной иммобилизацией фосфата, так как он быстро высвобождается из клеток вследствие гибели культур и последующей минерализации субстрата. Микроорганизмы опосредованно вовлечены в фосфоритное осаждение, делая реакционноспособный фосфат и кальций доступными для различных видов растений, создавая и поддерживая такие условия окружающей среды, которые благоприятствуют извлечению фосфата.

В природе микроорганизмы участвуют в окислении и восстановлении соединений фосфора. Окисление восстановленных соединений фосфора (фосфит, гипофосфит) может происходить как аэробно, так и анаэробно [9]. В аэробных условиях бактерии родов *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Erwinia* и грибы родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Penicillium* осуществляют процесс окисления фосфита с помощью специальной ферментной системы, состоящей из осажденной белковой фракции, никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и компонентов дыхательной цепи. Добавление фосфата к среде ингибирует окисление фосфита, и окисленный фосфит-фосфат высвобождается в среду только после гибели культур в среде. В анаэробных условиях в смеси фосфита и гипофосфита фосфит окислялся первым. Наличие фосфата ингибировало окисление как фосфита, так и ги-

пофосфита. При этом микроорганизмы не выделяли его в среду. Поскольку фосфит и гипофосфит не найдены в окружающей среде в определенных количествах, предполагается, что микробная способность утилизировать эти соединения, особенно в анаэробных условиях, является рудиментарным явлением, которое возникло в то время, когда на Земле была восстановительная атмосфера, способствующая возникновению последних.

Следовательно, микроорганизмы играют важную роль в переходах фосфора из органической формы в неорганическую, свободную или связанную, растворимую или осажденную.

Учитывая актуальность проблемы, разработаны микробиологические и биотехнологические основы для использования процессов прямой микробной фосфат-солюбилизации (ФС) в сельском хозяйстве и экологии. Из разнообразных экологических ниш и климатических регионов выделены культуры, способные к прямой микробной ФС из нерастворимого рудного сырья. Также модифицирована методология селекции активных ФС культур, перспективных для использования в промышленности и сельском хозяйстве, за счет использования контроля ФС в жидких средах, что позволило дополнительно селекционировать на 25–50% больше высокоактивных фосфатсолюбилирующих микроорганизмов [10].

Предложены две гранулированные формы фосфорных биоудобрений с использованием высокоактивных фосфатрастворяющих штаммов: *Acinetobacter* sp. 305 и *Pseudomonas* sp. 181a [11]. В лабораторных опытах экспериментально установлено, что в составе гранулированных форм культуры бактерий растворяли минеральные фосфаты и стабильнее высвобождали фосфор, повышая его биодоступность путем перевода фосфатов из руд в растворимую форму для растений, конкурируя по эффективности с эталоном — двойным суперфосфатом.

Производство химических фосфорных удобрений — энергоемкий и дорогостоящий процесс, и только 10–25% вносимого с

химическими удобрениями фосфора усваивается растениями. Остальной фосфор связывается в почве и вымывается грунтовыми водами, становясь недоступным для растений. Поэтому во всем мире ведутся работы по преобразованию, с помощью микроорганизмов, нерастворимых в воде минеральных фосфатов в доступные для растений формы. К сожалению, биофосфорные удобрения до сих пор не нашли широкого применения во многом из-за отсутствия эффективных готовых форм препаратов [12]. В настоящее время фосфатрастворяющие микроорганизмы (ФРМ) используют в трех направлениях: в виде жидкой или высушенной биомассы ФРМ; для обработки агропромышленных отходов перед их использованием в условиях твердофазной ферментации; приготовление компостов. Однако задача создания дешевых и эффективных препаративных форм биофосфорных удобрений остается актуальной. Научно обоснованное применение элементов технологий с использованием новых видов микроорганизмов и их метаболитов позволит не только увеличить урожайность культур, улучшить ка-

чество выращиваемой продукции, но и существенно повысить иммунный статус растений и их устойчивость к стрессовым факторам [13].

## ВЫВОДЫ

Проанализированы основные факторы, обуславливающие мобилизацию фосфора из фосфорсодержащего сырья:

- бактерии высвобождают фосфор из руд вследствие синтеза группы глюконовых кислот, моно-, ди- и трикарбоновых кислот, а также фосфатаз;
- микроскопические грибы образуют полифосфатные гранулы в процессе временной иммобилизации фосфата с последующей его минерализацией.

Показана роль специальной ферментной системы, участвующей в окислении и восстановлении соединений фосфора в аэробных и анаэробных условиях.

Дальнейшее развитие научного и промышленного интереса в данной области связано с созданием нового поколения биоудобрений, которые являются альтернативой химическим фосфорным удобрениям.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Towards global phosphorus security: A systems framework for phosphorus recovery and reuse options / D. Cordell, A. Rosemarin, J.J. Schröder, A.L. Smit // *Chemosphere*. — 2011. — Vol. 84. — P. 747–775.
2. *Sample E.C.* Reactions of phosphate fertilizers in soils / E.C. Sample, R.J. Soper, G.J. Racz // *The role of phosphorus in agriculture*. — Madison, WI: American Society of Agronomy, 1980. — P. 263–310.
3. *Иванов М.В.* Геологическая микробиология / М.В. Иванов, Г.И. Каравайко // *Микробиология*. — 2004. — Т. 73, № 5. — С. 581–597.
4. *Черняк А.С.* Основы биотехнологии металлов / А.С. Черняк. — Иркутск, 2002. — 102 с.
5. *Блайда И.А.* Извлечение ценных металлов при переработке промышленных отходов биотехнологическими методами / И.А. Блайда // *Энерготехнологии и ресурсосбережение*. — 2010. — № 6. — С. 39–45.
6. *Saghir Khan M.* Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agri- culture — A review / M. Saghir Khan, A. Zaidi, P.A. Wani // *Agron. Sustain. Dev.* — 2007. — Vol. 27 (1). — P. 29–43.
7. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications / M.D. Figueiredo, L. Seldin, F.F. de Araujo, R.D.L.R. Mariano // *Plant growth and health promoting bacteria*. — 2010. — Vol. 18. — P. 21–43.
8. *Клыккова М.В.* Биологическое обоснование использования штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 в качестве продуцента антимикробных препаратов: Авт. дисс. ... канд. биол. наук / М.В. Клыккова. — Оболенск, 2016. — 27 с.
9. *Павлова Г.Г.* Поширення фосфатрозчинюючих бактерій у воді та донних відкладеннях північно-західної частини Чорного моря / Г.Г. Павлова // *Екологічна безпека прибережної та шельфової зон та комплексне використання ресурсів шельфу: Зб. наук. пр. — Вип. 25, Т. 1. — Севастополь, 2011. — С. 340–346.*
10. Эффективность использования фосфатрастворяющих микроорганизмов в составе гранулированных биоудобрений с фосфатной рудой / И.А. Дунайцев, А.Н. Сомов, С.Н. Вирясов и др. // *Науч. журн. КУБГАУ*. — 2016. — № 117 (03). — С. 48–55.
11. Пат. 2451068. 2451069. Российская Федерация. Фосфатрастворяющий штамм *Acinetobacter species* 305 с фунгицидными свойствами. Фосфатрастворяющий штамм *Pseudomonas species* 181a

- с фунгицидными свойствами / И.А. Дунайцев, М.В. Клыкова, Т.Н. Кондрашенко, А.А. Старшов. — Бюл. № 14.
12. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013) / Y. Bashan, L.E. de-Bashan, S.R. Prabhu, J.-P. Hernandez // *Plant Soil*. — 2014. — Vol. 278. — P. 1–33.
13. Василенко М.Г. Перспективи застосування органіно-мінеральних добрив і регуляторів росту рослин / М.Г. Василенко, А.П. Стадник, П.М. Душко // *Агрокологічний журнал*. — 2017. — № 3. — С. 96–102.

## REFERENCES

- Cordell, D., Rosemarin, A., Schröder, J.J., & Smit, A.L. (2011). Towards global phosphorus security: A systems framework for phosphorus recovery and reuse options. *Chemosphere*, 84, 747–775 [in English].
- Sample, E.C., Soper, R.J., & Racz, G.J. (1980). *Reactions of phosphate fertilizers in soils. The role of phosphorus in agriculture*. F.E. Khasawneh, E.C. Sample, E.J. Kamprath (Eds.). Madison, WI: American Society of Agronomy [in English].
- Ivanov, M.V. & Karavayko, G.I. (2004). Geologicheskaya mikrobiologiya [Geological microbiology]. *Mikrobiologiya — Microbiology*, 73, 5, 581–597 [in Russian].
- Chernyak, A.S. (2002). *Osnovy biotekhnologii metallov [Fundamentals of biotechnology of metals]*. Irkutsk: publishing house Irkut. un-ta [in Russian].
- Blayda, I.A. (2010). Izvlecheniye tsennykh metallov pri pererabotke promyshlennykh otkhodov biotekhnologicheskimi metodami [Extraction of valuable metals in the processing of industrial waste by biotechnological methods]. *Energotekhnologii i resursosberezhenie — Energy Technology and Resource Saving*, 6, 39–45 [in Russian].
- Saghir Khan, M., Zaidi, A., & Wani P.A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agri-culture. *Agron. Sustain. Dev.*, 27, 1, 29–43 [in English].
- Figueiredo, M.D.V.B., Seldin, L., de Araujo, F.F., & Mariano, R.D.L.R. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. *Plant growth and health promoting bacteria*, 18, 21–43 [in English].
- Klykova, M.V. (2016). Biologicheskoye obosnovaniye ispol'zovaniya shtamma *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 v kachestve produktsenta antimikrobnyykh preparatov [Biological substantiation of the use of the strain *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 as a producer of antimicrobial preparations] *Candidate's thesis*. Obolensk [in Russian].
- Pavlova, H.H. (2011). Poshyrennya fosfatrozchynnyuyuchykh bakteriy u vodi ta donnykh vidkladennyakh pivnichno-zakhidnoyi chastyni Chornoho morya [Distribution of phosphate-soluble bacteria in water and bottom sediments of the north-western part of the Black Se]. *Ekolohichna bezpeka pryberzhnoi ta shelfovoi zon ta kompleksne vykorystannia resursiv shelfu — Ecological security of coastal and offshore areas and integrated use of shelf resources*, 25, 1, 340–346 [in Ukrainian].
- Dunajtsev, I.A., Somov, A.N., & Viryasov, S.N. (2016). Effektivnost' ispol'zovaniya fosfatrastvoryayushchikh mikroorganizmov v sostave granulirovannykh bioudobreniy s fosfatnoy rudoy [Efficiency of the use of phosphate-sequestering microorganisms in the composition of granulated biofertilizers with phosphate ore]. *Nauch. zhurn. KUBGAU*, 117, 03, 48–55 [in Russian].
- Dunajtsev, I.A., Klykova, M.V., Kondrashenko, T.N., & Starshov, A.A. (2012). Fosfatrastvoryayushchiy shtamm *Acinetobacter* species 305 s fungitsidnymi svoystvami [Phosphatransaturating strain *Acinetobacter* species 305 with fungicidal properties]. *Patent of the Russian Federation № 2451068*. Fosfatrastvoryayushchiy shtamm *Pseudomonas* species 181a s fungitsidnymi svoystvami [Phosphatransaturating strain *Pseudomonas* species 181a with fungicidal properties]. *Patent of the Russian Federation № 2451069*. Bul. 14 [in Russian].
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., & Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*, 278, 1–33 [in English].
- Vasylenko, M.H., Stadnyk, A.P., & Dushko, P.M. (2017). Perspektyvy zastosuvannya orhano-mineralnykh dobryv i rehulyatoriv rostu roslyn [Prospects for application of organo-mineral fertilizers and plant growth regulators]. *Ahroekolohichniy zhurnal — Agroecological journal*, 3, 96–102 [in Ukrainian].