

УДК 579:579.22:631.461

**МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ
ОСОБЛИВОСТІ ФОСФАТМОБІЛІЗУВАЛЬНОЇ
БАКТЕРІЇ *PSEUDOMONAS SP. 17*****Гаценко М.В.****Науковий керівник – член-кореспондент НААН****В.В. Волкогон**

Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН України

e-mail: mgatsenko@ukr.net

Із вермикомпосту ізольовано активні штами мікроорганізмів, здатні розчиняти фосфати важкорозчинних сполук. В угрупованні фосфатмобілізувальної мікробіоти біогумусу переважають представники роду Pseudomonas. Відібрано культуру Pseudomonas sp., яка сприяє вивільненню найбільшої кількості водорозчинних сполук фосфору при вермикомпостуванні органіки, збагаченої фосфоритами. На основі аналізу морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних ознак штама ідентифіковано як Pseudomonas putida.

Ключові слова: *Pseudomonas*, фосфатмобілізувальні мікроорганізми, біогумус, морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні властивості, ідентифікація.

Останнім часом у багатьох країнах зростає зацікавленість до технології вермикомпостування. Дана технологія базується на здатності червоного каліфорнійського гібриду *Eisenia foetida* поглинати і трансформувати величезну кількість рослинних решток, мікроорганізмів, грибів, водоростей, найпростіших. При цьому певним чином змінюється склад угруповання мікроорганізмів. Кінцевий продукт компостування – біогумус, характеризується високим вмістом розчинних сполук макро-, і мікроелементів [1-3]. Суттєво зростає вміст розчинних фосфатів у порівнянні з вихідним субстратом. Розчинення сполук фосфору здійснюється, головним чином, під дією ферментів та метаболітів фосфатмобілізувальних мікроорганізмів [4, 5].

Активний розвиток мікроорганізмів, що мобілізують та розчиняють фосфати, дає можливість вдосконалення технології вермикомпостування органіки шляхом збагачення субстрату

фосфоритами або іншою фосфорною сировиною та інтродукції активних штамів фосфатмобілізувальних мікроорганізмів, здатних до активного розвитку у субстраті. У попередніх роботах нами показана висока ефективність *Pseudomonas sp.* 17 щодо розчинення фосфоритів при інтродукції бактерії до субстрату (гній великої рогатої худоби з фосфоритами). Зазначений штам є найактивнішим серед селекціонованих, в умовах вермикомпостування органіки з фосфоритами забезпечує зростання водорозчинних форм фосфатів до 34-39,5 % порівняно до контролю (без інтродукції штамів мікроорганізмів) [4, 5].

Селекціонована бактерія *Pseudomonas sp.* 17 потребує подальшого вивчення її морфологічних, культуральних, біохімічних властивостей. Тому метою роботи є вивчення властивостей ізоляту та його ідентифікація.

Матеріали і методи. Морфологічні особливості клітин вивчали за мікроскопії фіксованих та пофарбованих препаратів у світловому і електронному мікроскопах, досліджуючи в динаміці культуру, вирощену на м'ясо-пептонному агарі (МПА). Фарбування клітин по Граму здійснювали згідно існуючої методики [6]. Рухомість клітин вивчали методом "вісячої краплі" [6]. Для визначення кількості джгутиків бактеріальну культуру вирощували у рідкому елективному середовищі Муромцева такого складу, г/л: глюкоза 10,0; аспарагін – 1,0; K_2SO_4 – 0,2; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,2; кукурудзяний екстракт – 0,02 %; $CaCl_2 \times H_2O$ – 3,3; $Na_3PO_4 \times 12 H_2O$ – 3,8; pH – 7,0 [7]. Препарати для дослідження в електронному мікроскопі (ЕМБ-100) готували методом негативного контрастування в 2 %-у розчині фосфорно-вольфрамвої кислоти впродовж однієї хвилини.

Форму колоній, розмір, профіль, краї, поверхню, оптичні властивості поверхні, колір, консистенцію тощо) досліджуваної бактерії вивчали через 3 доби інкубації при температурі +28 °C на середовищі МПА [6].

Здатність бактерії синтезувати флуоресцентний пігмент вивчали при висіві культури на агаризоване середовище Кінга В [8] та Лічука-Комагата [9]. Продукування пігментів досліджували за методиками, описаними в літературі [10].

Синтез ферментів каталази, оксидази, аргініндигідролази, ліпази, лецитинази, лівану із сахарози, здатність до гідролізу желатини і крохмалю визначали згідно існуючих методик [10, 11].

Здатність бактерій рости при температурі +4 °С , +37 °С і +41 °С вивчали на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) [6]. Відновлення нітрату до нітриту та використання нітрату як джерела азоту проводили відповідно до методик [8].

Здатність до росту на агарі Симонса з цитратом, потребу в органічних факторах росту (метіоніну і цистеїну), використання вуглеводів (глюкози, сахарози, лактози, мальтози, трегалози, галактози, арабінози, ксилози, гліцерину, сорбіту) та амінокислот (L-валіну, β-аланіну, інозиту, L-аргініну) як єдиного джерела вуглецю вивчали за загальноприйнятими тестами [8, 10, 11].

Ідентифікацію бактерій здійснювали за визначником бактерій Берджі [12] та оригінальними роботами [8].

Результати та їх обговорення. Дослідження морфологічних особливостей культури свідчить, що *Pseudomonas sp. 17* – не спорова бактерія. Довжина бактеріальних клітин знаходиться у межах 1,5-2,0 мкм, ширина 0,7–1,0 мкм). Клітини мають округлі кінці (рис.), розташовані поодинокі і рухаються за допомогою декількох джгутиків. Бактерія грамнегативна.

Культура *Pseudomonas sp. 17* на середовищі МПА утворює через одну добу інкубації округлі слизисті випуклі брудно-білого кольору колонії з гладенькою блискучою поверхнею та рівними краями (0,2-1 см у діаметрі).



Рис. Електроннограма (негативне контрастування) *Pseudomonas sp. 17* (збільшення $\times 15000$)

При вирощуванні бактерії на середовищі Кінга В або Іцука-Комагата спостерігається продукування жовто-зеленого флуоресцентного пігменту. Водночас, ізолят не синтезує піоціанін та помаранчеві пігменти (табл. 1). Бактерія росте у МПБ за температури +37 °С, але не проявляє ознак росту при +4 °С і +41 °С. Оптимальна температура росту складає +28 °С. Для розвитку не потребує органічних факторів, зокрема метіоніну і цистеїну. Здатна використовувати для своєї життєдіяльності цитрат натрію. Як джерело азоту використовує нітрат та відновлює його до нітриту. Тест на денітрифікацію показав, що *Pseudomonas sp.* 17 є денітрифікатором.

Бактерія *Pseudomonas sp.* 17 синтезує ферменти оксидазу, каталазу та аргініндигідролазу, не утворює ліпазу, лецитиназу, не розріджує желатину і крохмаль (табл. 2). Не утворює полісахарид ліван із сахарози. Як джерело вуглецю використовує моносахариди, зокрема такі, як глюкоза, галактоза, арабіноза, ксилоза, рамноза, глутамат натрію, і не використовує дисахариди, а саме сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу. Бактерія здатна до використання як єдиного джерела вуглецю β -аланіну, *L*-аргініну і *L*-валіну. Не використовує органічні спирти (гліцерин і інозит) як джерело вуглецю (табл. 3).

Таблиця 1. Фізіолого-біохімічні властивості *Pseudomonas sp.* 17

Властивості	Наявність/відсутність
Мукоїдний ріст	–
Жовто-зелений флуоресцентний пігмент	+
Пігмент піоціанін	–
Помаранчеві пігменти	–
Потреба в органічних факторах росту	–
Використання нітрату як джерела азоту	+
Здатність до денітрифікації	+
Утилізація цитрату	+
Відновлення нітрату	+
Ріст при температурі + 37°С	+
Ріст при температурі + 41°С	–
Ріст при температурі + 4°С	–

Примітка. “+” – позитивна реакція, “–” – негативна реакція.

Таблиця 2. Синтез ферментів бактерією *Pseudomonas sp. 17*

Ферменти	Наявність/відсутність
Оксидаза	+
Каталаза	+
Аргініндигідролаза	+
Ліпаза	–
Лецитиназа	–
Лівансахараза	–

Примітка. “+” – позитивна реакція, “–” – негативна реакція.

Таблиця 3. Використання вуглеводів, амінокислот та спиртів як єдиного джерела вуглецю

Джерело вуглецю	Використання, +/-
Глюкоза	+ К
Галактоза	+ К
Арабіноза	+ К
Ксилоза	+ К
Рамноза	+
Глутамат натрію	+
Сахароза	–
Лактоза	–
Мальтоза	–
Трегалоза	–
L-валін	+
β-аланін	+
L-аргінін	+
Гліцерин	–
Інозит	–

Примітка. “+” – позитивна реакція, “–” – негативна реакція, «к» – кислотоутворення.

На основі досліджених морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей *Pseudomonas sp. 17* культуру ідентифіковано як *Pseudomonas putida*.

Автор висловлює щирю вдячність професору Кіпріановій Є.А. за допомогу при проведенні даної роботи.

1. Покровская С.Ф. Вермикомпостирование /С.Ф. Покровская, Ф.Б. Прижуков //Земледелие: межвед. темат. науч. сб. – 1990. – Вип. 12. – С. 57-59.
2. Методика и результаты исследований эффективности компостов и вермикомпостов /Г.Е. Мерзлая //Дождевые черви и плодородие почв: II Международная научно-практическая конференция (17-19 марта 2004 г.): матер. конф. – Владимир, 2004. – С. 40-45.
3. Вермикультура: производство и использование /[Повхан М.Ф., Мельник И.А., Андриенко В.А. и др.]. – К.: УкрИНТЭН, 1994. – 128 с.
4. Гаценко М.В. Оптимизация вермикомпостування органіки, збагаченої фосфоритами, за участі фосфатмобілізувальних мікроорганізмів /М.В. Гаценко, В.В. Волгогон //Мікробіол. журн. – 2010. – № 3. – С. 14-19.
5. Гаценко М.В. Мікробіологічні аспекти біокомпостування гною ВРХ з фосфоритами за участю фосфатмобілізувальних бактерій /М.В. Гаценко, В.В. Волгогон, Л.М. Токмакова, Н.В. Луценко //С.-г. мікробіологія : міжвід. темат. наук. зб. – Чернігів: ЦНТЕІ, 2010. – Вип. 11. – С. 75-89.
6. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии: учебное пособие [для вузов] /Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – М.: Дрофа, 2005. – 256 с.
7. Методические указания по выделению микроорганизмов, растворяющих труднодоступные минеральные и органические соединения фосфора. – Л., 1981. – 17 с.
8. Смирнов В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* /Смирнов В.В., Киприанова Е.А. – К.: Наукова думка, 1990. – 264 с.
9. Iuzuka H. An attempt at grouping of genus *Pseudomonas* /H. Iuzuka, K. Komagata //J. Gen. Microbiol. – 1963. – Vol. 9, № 1. – P. 73-83.
10. Методы общей бактериологии /под ред. Ф. Герхарда и др.; в 3 т. – М.: Мир, 1984. – Т. 3. – 264 с.
11. Звягинцев Д.Т. Методы почвенной микробиологии и биохимии /Д.Т. Звягинцев. – М.: Изд-во МГУ. – 180. – 224 с.
12. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition. – Vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria). – New York: Springer, 2005. – P. 438.

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГО-
БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕНОСТИ
ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ
PSEUDOMONAS SP. 17**

Гаценко М.В.

Институт сельскохозяйственной микробиологии НААН Украины,
г. Чернигов

Из вермикомпоста изолированы активные штаммы микроорганизмов, способные мобилизовать фосфор из труднорастворимых соединений. В сообществе фосфатмобилизирующей микробиоты биогуруса преобладают представители рода Pseudomonas. Отобрано культуру Pseudomonas sp., которая способствует высвобождению наибольшего количества водорастворимых соединений фосфора при вермикомпостировании органики, обогащенной фосфоритами. На основе анализа морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков штамм идентифицирован как Pseudomonas putida.

Ключевые слова: *Pseudomonas*, фосфатмобилизирующие микроорганизмы, биогурус, морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства, идентификация.

**MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND
BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF PHOSPHATE-
MOBILIZING BACTERIA PSEUDOMONAS SP. 17**

Gatsenko M.V.

Institute of Agricultural Microbiology, NAAS of Ukraine, Chernihiv

The active strains of microorganisms capable of mobilizing phosphorus from sparingly soluble compounds were isolated from the vermicompost. Representatives of the genera Pseudomonas has dominated in association of phosphate mobilizing humus microbiota. The Pseudomonas sp. culture able to release the biggest amount of water-soluble phosphorus at vermicomposting of organic enriched with phosphorites was isolated. Basing on the analysis of morphological, cultural, physiological and biochemical properties studied strain was identified as Pseudomonas putida.

Key words: *Pseudomonas*, phosphate-mobilizing microorganisms, humus, morphological, cultural, physiological and biochemical properties, identification.