

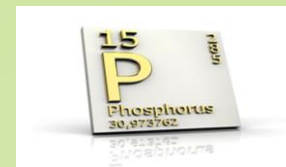
# Zróznicowanie zdolności szczepów bakterii solubilizujących fosforany do rozpuszczenia fosforanu wapnia

Monika Kozieł, Stefan Martyniuk

Institut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, tel. (0-81) 4786950, e-mail: [nmaczka@iung.pulawy.pl](mailto:nmaczka@iung.pulawy.pl)

## Wstęp

Mikroorganizmy biorą udział w transformacjach nieorganicznych i organicznych związków fosforu (P) w glebie. Do podstawowych mechanizmów mikrobiologicznego uruchamiania P należą: uwalnianie kationów wodorowych (H<sup>+</sup>), produkcja kwasów organicznych oraz biosynteza fosfataz.



## Cel badań

Celem badań było określenie wydajności solubilizacji Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> przez 27 szczepów bakteryjnych wyizolowanych z gleb pochodzących z różnych rejonów Polski. W badaniach zastosowano metodę płytkową pozwalającą na obserwowanie stref przejaśnienia powstających wokół kolonii formowanych na pożywce zawierającej nierozpuszczalny Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> jako jedyne źródło P. Oceniono również efektywność rozpuszczania Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> dla tych samych szczepów bakterii solubilizujących fosforany namnożonych w pożywce płynnej metodą kolorymetryczną (metoda molibdenianowa). Zasada spektrofotometryczna oznaczania fosforanów polega na tworzeniu w roztworze kwaśnym kwasu fosfomolibdenowego H<sub>7</sub>(P)MoO<sub>2</sub>(O<sub>4</sub>)<sub>6</sub> o żółtym zabarwieniu, który ulega redukcji pod wpływem chlorku cyny (II), tworząc związek kompleksowy błękit molibdenowy o intensywnym niebieskim zabarwieniu. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do zawartości fosforanów.



## Materiały i metody

W badaniach wykorzystano 27 szczepów bakterii solubilizujących fosforany pochodzących z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Rolniczej IUNG-PIB w Puławach. Szczepy wyizolowano z prób glebowych pochodzących z krajowego monitoringu chemizmu gleb i przechowywano na skosach agarowych w temperaturze 4°C.

Zdolność wyizolowanych szczepów PSB do rozpuszczania fosforanu trójwapniowego sprawdzano w trzech powtórzeniach na podłożu Pikovskaya [Pikovskaya, 1948]. Na pożywce wykonywano posiew punktowy bakterii za pomocą sterylnej ezy. Po 14 dniach inkubacji w temp. 28°C mierzono średnicę kolonii bakterii oraz stref przejaśnień, które powstały w wyniku uwolnienia fosforu z jego nierozpuszczalnej soli Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Zdolność badanych bakterii do solubilizacji fosforanu wyrażono jako wskaźnik solubilizacji (SI), który oszacowano na podstawie stosunku średnicy halo (HD) do średnicy kolonii (CD).

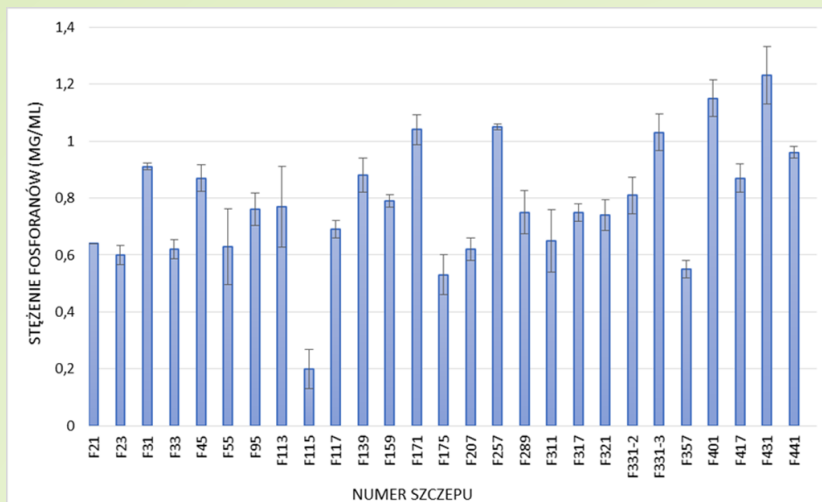
Ocenę efektywności rozpuszczania Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> prowadzono na płynnej pożywce Pikovskaya [Pikovskaya, 1984]. Kolbki z 25 ml pożywki zaszczerpionej czystymi kulturami bakterii solubilizujących fosforany umieszczano na wytrząsarce w temperaturze 28°C na okres 72h. Po upływie 24h, 48h, 72h hodowle bakteryjne odwirowano przy 13000 rpm przez 20 minut, a w supernatancie oznaczano zawartość jonów fosforanowych kolorymetryczną metodą, wykorzystującą tworzenie błękitu fosfomolibdenowego [Lityński i in., 1976]. Do kolb miarowych o pojemności 50 ml dodano po 10 ml badanego supernatantu, a następnie po 1 ml roztworu molibdenianu sodu i 0,25 ml roztworu chlorku cyny. Zawartość kolb dopełniono do kreski wodą destylowaną i dokładnie wymieszano. Po upływie 10-12 minut dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali λ = 690 nm. Oznaczenie wykonano w 3 powtórzeniach dla każdego szczepu.

$$SI = \frac{\text{średnica kolonii} + \text{średnica strefy halo}}{\text{średnica kolonii}}$$



## Wyniki

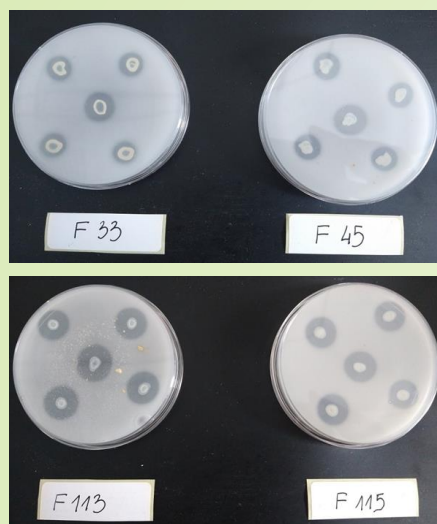
Przeprowadzone badania wykazały, że wszystkie izolaty tworzyły przejaśnienia na pożywce Pikovskaya, co świadczy o zdolności tych bakterii do rozpuszczania fosforanów i uwalniania fosforu z jego nierozpuszczalnej soli. Zgodnie z klasyfikacją Berraquero i in. [1976] pięć izolatów zostało sklasyfikowanych jako szczepy o średnim stopniu (2 < SI ≤ 4) solubilizacji, natomiast pozostałe dwadzieścia dwa zostało zaklasyfikowanych jako solubilizatory o niskim stopniu (SI < 2) rozpuszczalności fosforanu. Największe strefy przejaśnień (SI = 2,33 mm) obserwowano u szczepu **F171** należącego do gatunku *Pseudomonas arsenicoxydans*.



Wykres 1. Efektywność rozpuszczania Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> przez wyodrębnione szczepy PSB po 72h inkubacji w 28°C

Tabela 1. Indeks solubilizacji fosforanów wyliczony dla badanych szczepów

Numer szczepu	SI
F21	1,25 ± 0
F23	1,44 ± 0,10
F31	1,80 ± 0,02
F33	1,50 ± 0,07
F45	1,73 ± 0,11
F55	1,13 ± 0,02
F95	1,25 ± 0,13
F113	2,0 ± 0
F115	1,89 ± 0,10
F117	2,27 ± 0,12
F139	2,17 ± 0,14
F159	1,22 ± 0,18
F171	2,33 ± 0,14
F175	2,08 ± 0,14
F207	1,34 ± 0,08
F257	1,36 ± 0,13
F289	1,74 ± 0,15
F311	1,56 ± 0,14
F317	1,44 ± 0,14
F321	1,35 ± 0,07
F331-2	1,73 ± 0,12
F331-3	1,31 ± 0,10
F357	1,2 ± 0
F401	1,84 ± 0,02
F417	1,15 ± 0,06
F431	1,49 ± 0,27
F441	1,27 ± 0,14



Zdjęcie 1. Strefy przejaśnień wokół kolonii szczepów PSB

Rozpuszczanie fosforanu trójwapniowego badano w pożywce płynnej, oznaczając stężenie jonów PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> metodą spektrofotometryczną po 24h, 48h i 72h inkubacji w 28°C. Sprawdzono efektywność rozpuszczania Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> dla 27 szczepów PSB. Wszystkie szczepy w pożywce płynnej wykazywały zdolność do rozpuszczania fosforanu trójwapniowego. Wśród rodzajów, które charakteryzowały się najwyższą zdolnością do rozpuszczania Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> znalazły się *Pseudomonas* (F171, 431), *Phyllobacterium* (F331-3), *Inquilingus* (F401), *Bacillus* (F257). Najniższą zdolność do rozpuszczania fosforanu trójwapniowego wykazał szczep F115 należący do rodzaju *Inquilingus*.

## Podsumowanie

Badane gatunki bakterii różniły się znacznie pod względem intensywności rozpuszczania trójfosforanu wapnia w podłożu płynnym, a najefektywniejszymi pod tym względem były gatunki: *Pseudomonas arsenicoxydans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas helmanticensis*, *Inquilingus ginsengisoli* i *Paraburkholderia caledonica*.