

УДК 579.64

UDC 579.64

03.00.00 Биологические науки

Biological sciences

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ФОСФАТРАСТВОРЯЮЩИХ
МИКРООРГАНИЗМОВ В СОСТАВЕ
ГРАНУЛИРОВАННЫХ БИОУДОБРЕНИЙ С
ФОСФАТНОЙ РУДОЙ**

**THE EFFICACY OF USING PHOSPHATE
SOLUBILIZING MICROORGANISMS IN
GRANULAR BIOFERTILIZERS WITH
PHOSPHATE ORE**

Дунайцев Игорь Анатольевич
канд. биол. наук, SPIN-код 8649-7481
ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская обл., Россия
dunaytsev@obolensk.org

Dunaitsev Igor Anatolievich
Cand. Biol. Sci., RSCI SPIN-code 8649-7481
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, Russia
dunaytsev@obolensk.org

Сомов Алексей Николаевич
канд. ф.-м. наук, SPIN-код 4112-2571
ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская обл., Россия

Somov Alexey Nikolaevich
Cand. Ph.-M. Sci., RSCI SPIN-code 4112-2571
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, Russia

Вирясов Сергей Николаевич
канд. ф.-м. наук, SPIN-код 2261-1570
ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская обл., Россия

Viryasov Sergey Nikolaevich
Cand. Ph.-M. Sci., RSCI SPIN-code 2261-1570
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, Russia

Старшов Алексей Александрович
канд. биол. наук
ЗАО Фирма «Август», Москва, Россия

Starshov Alexey Alexandrovich
Cand. Biol. Sci.
JSC Firm "August", Moscow, Russia

Кондрашенко Татьяна Николаевна
ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская обл., Россия

Kondrashenko Tatiana Nikolaevna
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, Russia

Клыккова Марина Викторовна
SPIN-код 5765-7822
ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская обл., Россия

Klykova Marina Viktorovna
RSCI SPIN-code 5765-7822
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, Russia

Жиглецова Светлана Константиновна
канд. хим. наук, SPIN-код 4687-3529
ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская обл., Россия

Zhigletsova Svetlana Konstantinovna
Cand. Chem. Sci., RSCI SPIN-code 4687-3529
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, Russia

Испытаны две гранулированные формы фосфорных биоудобрений на основе фосфоритной руды и двух высокоактивных фосфатрастворяющих штаммов: *Acinetobacter species* 305 и *Pseudomonas species* 181a. Гранулы размером около 3 мм получены путем контактно-конвективного высушивания смеси измельченной руды, концентрированной биомассы двух разных штаммов, крахмала и глюкозы. Микрогранулы размером 0,1-0,5 мм получены путем распылительного высушивания биомассы двух раз-

Two granular formulations of phosphorus biofertilizers combining rock phosphate and two highly active phosphate solubilizing strains: *Acinetobacter species* 305 and *Pseudomonas species* 181a have been investigated. Granules of about 3 mm in size were obtained by contact-convective drying of a mixture of ground ore, concentrated biomass of two different strains, starch and glucose. Micro granules with size of 0.1-0.5 mm were obtained by spray drying the biomass of two different strains and application of dried cells on

ных штаммов и нанесением высушенных клеток на частицы измельченной руды с использованием крахмала в качестве связующего. В жидкой модельной среде показано, что микроорганизмы в составе приготовленных гранулированных форм сохранили способность растворять минеральные фосфаты. В лабораторном вегетационном эксперименте на бархатцах отклоненных (*Tagetes patula*) показано, что обе готовые формы биоудобрений повышали сухой вес растений до того же уровня, что и химическое удобрение - двойной суперфосфат, но уступали ему по повышению концентрации фосфора в растениях. Обе формы превышали эффективность руды и биомассы при использовании последних в качестве биоудобрений как по отдельности, так и совместно. Между двумя штаммами и двумя гранулированными формами достоверных различий, как по сухому весу растений, так и по содержанию в них фосфора отмечено не было. В течение года хранения при 4 °С обе гранулированные формы биофосфорных удобрений сохраняли свою структуру и не слеживались. Средняя сохраняемость живых клеток в микрогранулах составила около 1,5 %, а в гранулах - 32 %

Ключевые слова: ФОСФОРНЫЕ БИОУДОБРЕНИЯ; ГРАНУЛИРОВАННЫЕ ФОРМЫ; МОБИЛИЗАЦИЯ ФОСФАТОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ; ФОСФАТРАСТВОРЯЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

the particles of the ground ore. Starch was used as a binder. In the model liquid medium it was shown that the microorganisms have retained the ability to solubilize mineral phosphates in granular formulations prepared. In laboratory pot trial on marigold (*Tagetes patula*) it was demonstrated that both formulations of biofertilizer increased the dry weight of the plants to the same level as that of chemical fertilizer - double superphosphate, but were inferior in the concentration of phosphorus in plants. Both formulations exceeded the effectiveness of rock phosphate and biomass used as biofertilizers both separately and jointly. No significant differences were noted between the two strains and the two granular formulations both for plant dry weight, and the content of phosphorus therein. Both granular formulations of biofertilizer retained their structure and avoided aggregating over a year of storage at 4 °C. The average persistence of living cells in the microbeads was about 1.5%, in granules - 32 %

Keywords: PHOSPHORUS BIOFERTILIZERS; GRANULAR FORMULATIONS; MOBILIZATION OF PHOSPHATE BY MICROORGANISMS; PHOSPHATE SOLUBILIZING MICROORGANISMS

Обеспечение населения продовольствием связано с интенсивной эксплуатацией сельскохозяйственных земель, что требует постоянного применения минеральных удобрений, в том числе и фосфорных. Однако производство химических фосфорных удобрений – энергоемкий и дорогостоящий процесс, наносящий серьезный ущерб среде обитания человека как непосредственно на предприятиях, так и на прилегающих к ним территориях [1-2]. При этом только 10-25% вносимого с химическими удобрениями фосфора усваивается растениями [3-4]. Остальной фосфор связывается в почве и вымывается грунтовыми водами, становясь недоступным для растений. Поэтому во всем мире многие годы ведутся исследования возможности перевода нерастворимых в воде минеральных фосфатов в доступные для растений формы непосредственно в почве с помощью микроорганизмов [4-7].

За десятилетия поисков по всему миру были выделены сотни штаммов в той или иной степени растворяющих природные фосфаты [8-9]. Однако до сих пор биофосфорные удобрения не нашли широкого применения во многом из-за отсутствия эффективных готовых форм препаратов [10]. В настоящее время используют несколько способов применения фосфатрастворяющих микроорганизмов (ФРМ). Самым простым способом является использование жидкой или высушенной биомассы ФРМ, однако при этом получают противоречивые результаты [6]. Другим часто применяемым способом является использование агропромышленных отходов, обработанных ФРМ в условиях твердофазной ферментации, и приготовление компостов [11-12]. Такие удобрения трудно стандартизуемы и требуют использования больших количеств. Перспективным способом применения ФРМ является приготовление гранул на основе биомассы и фосфатных руд, поскольку в такой форме осуществляется наиболее близкий контакт микроорганизмов с источником фосфата [13]. Для получения гранул биоудобрений в подавляющем большинстве исследований используется альгинат [14]. Применение альгинатных гранул ФРМ с рудой и органическими добавками позволило на 65% повысить урожай сои и почти на 90 % повысить содержание фосфора в бобах [13]. Однако альгинат является дорогостоящим продуктом и при разработке биоудобрений его содержание пытаются свести до минимума [10,14]. Задача создания дешевых и эффективных гранулированных биофосфорных удобрений до сих пор не решена.

В отделе биологических технологий ФБУН ГНЦ ПМБ создана рабочая коллекция ФРМ, выделенных из различных экологических ниш в различных географических зонах России и СНГ [15]. Наиболее активные ФРМ в коллекции не уступают лучшим мировым аналогам [16-17]. Были также разработаны гранулы на основе ФРМ и фосфоритной руды, показавшие свою эффективность в деляночных опытах на ячмене [18]. Однако

в процессе их приготовления использовался не сертифицированный химический пленкообразователь и токсичный агент для его растворения.

Целью работы являлось создание и изучение эффективности действия недорогих и простых в изготовлении гранулированных форм биофосфорных удобрений, содержащих фосфатную руду и ФРМ.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали 2 штамма высокоактивных ФРМ: *Acinetobacter species* 305 (далее штамм №305) и *Pseudomonas species* 181a (далее штамм №181a), ранее выделенные нами и депонированные в коллекцию «ГКПМ-Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ [19-20].

Приготовление биомассы ФРМ. Биомассу ФРМ выращивали в процессе периодического глубинного культивирования в лабораторном ферментере New Brunswick Scientific Microferm общим объемом 15 л. Основой питательной среды служил ферментативный гидролизат рыбной муки (содержание аминного азота 0,12 %), в качестве источника углерода использовали глюкозу в количестве 1,5 %. Посевной материал выращивали в начальных колбах (ночная культура) и засевали в количестве 10 % по объёму. Процесс выращивания культур вели при поддержании pH $7.0 \pm 0,1$ и содержании растворенного кислорода 20-40 % от насыщения в течение 10-12 час до стационарной фазы роста, наступление которой фиксировали по оптической плотности при 590 нм. Концентрация жизнеспособных клеток в культуральной жидкости (КЖ) к концу процесса составляла $5-10 \times 10^9$ КОЕ/мл.

Полученную КЖ каждого штамма делили на 2 порции, одну из которых после концентрирования в центрифуге Beckman J-21C (США) использовали для получения сухой биомассы и приготовления гранул контактно-конвективным способом, а другую часть использовали для изготовления микрогранул с помощью распылительного высушивания. Для получения

высушенной биомассы сконцентрированную КЖ каждого штамма лиофилизировали с помощью установки Virtis VT-4k (США).

Приготовление гранулированных форм биоудобрений. В составе гранулированных форм фосфорных удобрений использовалась фосфоритная мука Егорьевского месторождения (ЕФМ), поскольку ранее было показано, что из промышленно добываемых отечественных фосфатных руд она наиболее доступна воздействию микроорганизмов [15]. Содержание P_2O_5 в ЕФМ - 19,6 %, размер частиц 50-100 мкм.

Как известно, растворение минеральных фосфатов и фосфатных руд, в том числе, связано в основном с воздействием органических кислот, прежде всего глюконовой и кетоглюконовой, продуцируемых микроорганизмами в результате окисления углеводов [4-8]. Поэтому в составе гранулированных форм использовали крахмал и глюкозу в качестве источника углерода. Крахмал также являлся связующим компонентом.

Удобрение в виде гранул готовили с помощью контактно-конвективного высушивания. Для приготовления гранул первоначально смешивали предварительно простерилизованные картофельный крахмал, глюкозу и ЕФМ. Затем вносили биомассу одной из культур. При приготовлении гранул, не содержащих микроорганизмы, вместо биомассы вносили эквивалентное количество дистиллированной воды. После тщательного перемешивания сырую массу выкладывали слоем до 5 мм на лист фильтровальной бумаги. Образцы высушивали при комнатной температуре в течение 3-х суток. После высушивания образцы разламывали на части и пропускали через фильтры мясорубки с отверстиями диаметром 5 мм. Полученный продукт представлял собой гранулы серого цвета неправильной формы со средним размером около 3 мм.

Приготовление микрогранул удобрений проводили на основе процесса распылительной сушки. В приемную емкость распылительной сушилки Mini Spray Dryer 190 (Buchi, Швейцария) загружали подготовлен-

ную ЕФМ, предварительно обработанную раствором крахмала с последующим высушиванием в сушильном шкафу. В процессе сушки в приемной емкости из порошка фосфорного сырья создавалось подобие «кипящего слоя», на частицы которого налипали высушиваемые клетки. Массовое соотношение минерал/биомасса определяли по приросту массы порошка обработанной руды после сушки.

Полученные образцы сухой биомассы и гранулированных форм удобрений хранились в закрытых емкостях при температуре +4 °С.

Остаточную влажность всех образцов биоудобрений определяли гравиметрическим методом после высушивания при 105 °С.

Содержание жизнеспособных клеток во всех образцах биоудобрений определяли стандартным методом серийных разведений с последующим подсчетом числа выросших колоний на ГРМ-агаре.

Определение фосфатрастворяющей активности образцов препаратов в жидкой среде. Оценку фосфатрастворяющих (ФР) свойств проводили по накоплению фосфата в растворе при инкубации исследуемого препарата в жидкой среде, не содержащей других источников фосфора. Использовали минеральную среду (МС) следующего состава, г/л: аммоний хлористый – 1,6; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2; K_2SO_4 – 1,0; NaCl – 1,0; микроэлементы – 20 мл/л. Состав раствора микроэлементов, %: $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,01; $CuSO_4 \times 5H_2O$ – 0,1; $MnSO_4 \times 2H_2O$ – 0,01. При исследовании ФР свойств сухой биомассы использовали МС с добавлением глюкозы и руды в количестве 10,0 и 1,9 г/л, соответственно. В качестве контроля использовали МС с добавлением тех же количеств руды и глюкозы без внесения микроорганизмов.

Инкубирование вели в колбах вместимостью 750 мл с объемом среды 100 мл на качалке New Brunswick (США) при скорости вращения 100 об/мин и температуре 28 °С в течение 5 суток, отбирая пробы объемом 1,5-

2,0 мл для измерений pH и содержания растворенных фосфатов. Величину pH измеряли на pH-метре ThermOrion 710 (Cole-Parmer, США).

Перед определением количества фосфора в растворе пробу центрифугировали на микрофуге Minispin (Eppendorf, Германия) в течение 4 мин при скорости вращения 10000 об/мин. В полученном супернатанте количество растворенного фосфора определяли с помощью одностадийного метода по интенсивности окраски его молибденового комплекса с твином 80 при длине волны 350 нм [21]. Измерение фосфора в растворе проводили в трех повторностях. Каждый опыт повторяли дважды.

Лабораторные вегетационные испытания готовых форм биоудобрений проводили при выращивании бархатцев отклоненных (*Tagetes patula*). Растения чувствительны к недостатку фосфора, кроме декоративных целей используются также в пищевой промышленности и медицине [22-23]. Субстратом для растений служила супесчаная почва с низким содержанием доступного фосфора (менее 3 мг P₂O₅/100 г почвы по Кирсанову) и pH 6,8. Предварительно почву тщательно перемешивали и просеивали через сито с размером ячеек 2,5 мм, затем стерилизовали автоклавированием в течение 2 часов при давлении 2 атм. В качестве сосудов для выращивания использовали темные полиэтиленовые горшки вместимостью 1,5 л. Навеска почвы для каждого горшка составляла 1,55 кг сухой почвы. Каждый вариант имел 4-х кратную повторность (4 горшка).

Посев проводили по 10 семян на каждый горшок. Глубина посева – 0,5 см. Для максимального выравнивания всех растений после появления всходов в каждом горшке оставили по одному растению.

Источники минерального питания азота и калия вносили дробно в течение вегетационного периода в виде растворов солей. Фосфор вносили в составе готовых форм удобрений и одной ЕФМ однократно перед посевом, перемешивая с почвенной навеской каждого горшка. В качестве положительного контроля использовали химическое удобрение - двойной су-

перфосфат (Буйский химический завод, Россия, 44 % P_2O_5). Суммарное внесение элементов питания во всех вариантах, кроме контроля без внесения дополнительного источника фосфора и вариантов с внесением одной биомассы, за весь вегетационный период составило (г/кг сухой почвы): N – 0,15; K_2O – 0,1; P_2O_5 – 0,1.

На протяжении всего вегетационного периода для освещения использовали тепличные светильники ДРЛФ 400 в количестве 7 штук. Фото-период поддерживался с помощью электронного таймера: день/ночь – 16 ч/8 ч. Температура в помещении составляла 24-26 °С в дневное время и 20-21 °С в ночное. Полив растений проводили дистиллированной водой в равных дозах для каждого варианта. Влажность почвы поддерживали на уровне 65-70 % от полной влагоемкости. Горшки с растениями располагали на поверхности столов в полностью рандомизированной последовательности. Общий срок проведения вегетационного эксперимента составил 107 календарных дней.

После завершения вегетационного эксперимента проводили уборку растений вместе с корневой системой. Корни отделяли от земли, промывая водой, затем растения высушивали до постоянной массы при комнатной температуре 20-22 °С.

Содержание фосфора в цветах, листьях и корнях растений по отдельности определяли в соответствии с [21] после измельчения и минерализации серной кислотой и перекисью водорода при нагревании.

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки данных использовали дисперсионный анализ по модели однофакторного эксперимента с рандомизированными повторениями. Расчеты выполняли с помощью надстройки «Пакет анализа» программы «Microsoft Excel» при 0,05 уровне значимости. Вычисление наименьшей существенной разницы (НСР) проводили в соответствии с [24].

Результаты и обсуждение

С помощью трех способов высушивания – контактно-конвективного (гранулы), распылительного (микрогранулы) и лиофильного (биомасса) - были приготовлены 8 образцов удобрений (таблица 1). Характеристики приготовленных удобрений представлены в таблице 1. При всех трех использованных способах сушки приготовленные образцы удобрений имели низкую остаточную влажность (4,8-7,0 %) и высокое содержание жизнеспособных клеток ($1-2 \times 10^9$ КОЕ/г).

Таблица 1. Характеристики приготовленных препаратов удобрений

№ варианта	Форма препарата	№ штамма	Содержание ЕФМ	Влажность, %	КОЕ, 10^9 /г	
					после приготовления	через 12 мес. после хранения при +4°C
1	гранулы	181a	42,2	6,9	2,0	0,69
2	гранулы	305	43,1	7,0	1,6	0,54
3	гранулы	-	44,2	6,9	-	
4	микрогранулы	181a	48,2	6,0	1,1	0,02
5	микрогранулы	305	49,5	5,4	1,2	0,012
6	микрогранулы	-	48,8	5,7	-	
7	Лиофилизированная биомасса	181a	-	4,8	2,9	1,4
8	Лиофилизированная биомасса	305	-	5,3	4,6	2,0

В жидкой МС среде исследовалась способность приготовленных образцов удобрений переводить фосфор в растворимое состояние. На рис. 1 представлены данные по динамике перевода фосфора в раствор и изменению при этом величины рН среды. Как следует из рис. 1а, микроорганизмы в составе сухой негранулированной биомассы более активно переводили в раствор фосфор из добавленной в среду руды, чем те же микроорганизмы в составе гранулированных форм. Однако на 5-е сутки инкубации в присутствии чистой биомассы содержание фосфора в растворе упало ниже, чем в присутствии гранул.

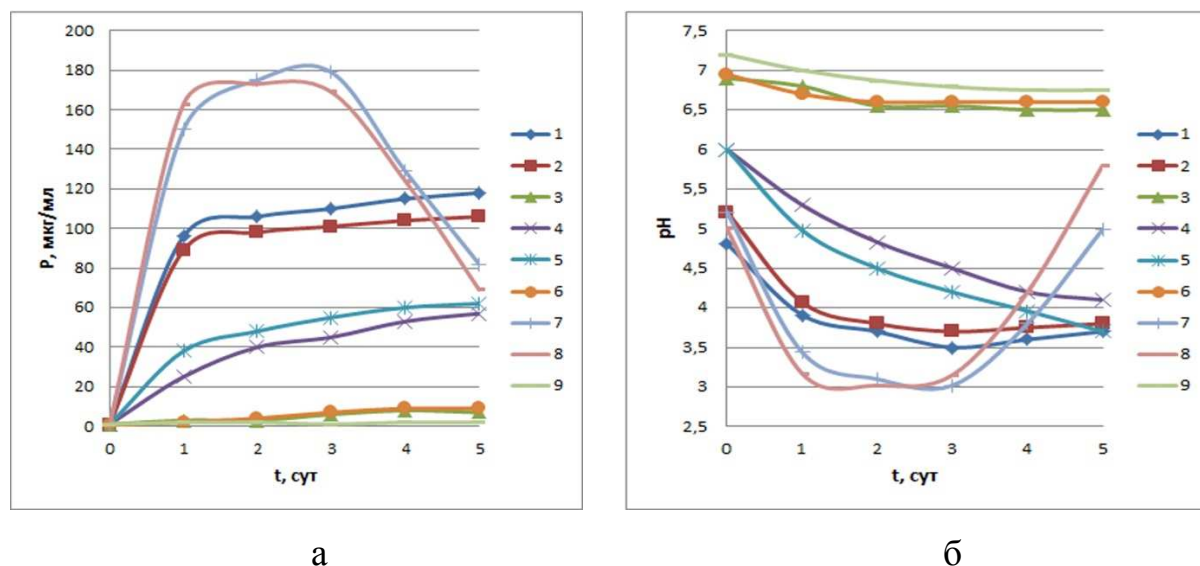


Рис.1. Изменение содержания фосфора (а) и величины рН (б) в водной среде в присутствии образцов удобрений: №№1-8 соответствуют номерам образцов в таблице 1, №9 – образец ЕФМ.

Из микрогранул фосфор выходил медленнее, чем из гранул, что можно объяснить отсутствием в их составе глюкозы, более легко окисляемой, чем крахмал. В отсутствие микроорганизмов (образцы №№3,6 и 9) растворения руды практически не было отмечено.

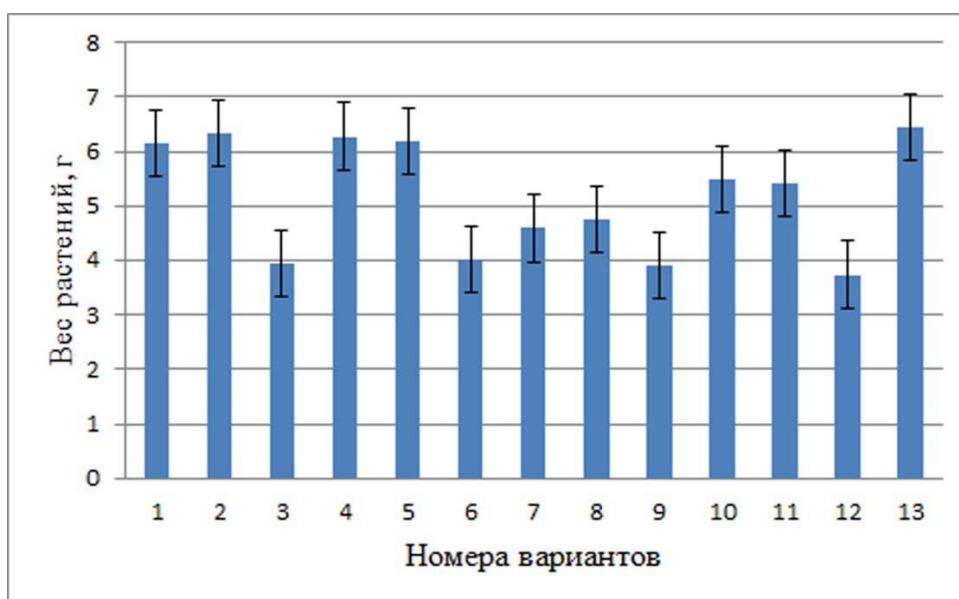
Сопоставление рис. 1а и 1б позволяет прояснить картину происходящих процессов. После падения величины рН ниже 6 начинается активное растворение фосфатов. Однако низкое значение рН замедляет рост ФР бактерий, и при достижении рН 3-4 не только тормозится их рост, но и начинается активное потребление фосфатов самими микроорганизмами, возможно, для нейтрализации кислой среды [8, 25]. Этот момент соответствует перегибу кривых для образцов чистой биомассы (№№7 и 8). После этого рН среды начинал расти, а содержание фосфатов в растворе – снижаться.

Как было показано ранее, растворение фосфатов под действием штаммов №№181а и 305 связано с образованием из глюкозы глюконовой и кетоглюконовой кислот [15]. Из сопоставления кривых на рис.1 очевидно, что хотя свободные клетки в составе высушенной биомассы быстрее окисляли глюкозу, чем иммобилизованные клетки в составе гранул, но это при-

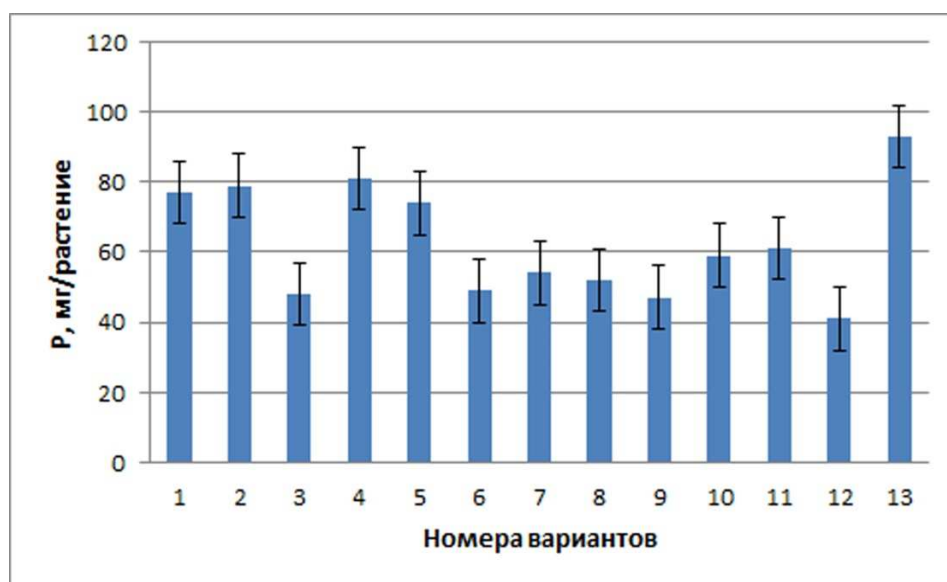
водило и к быстрому снижению рН до 3,0, что привело к изменению процессов метаболизма, повышению рН и, соответственно, снижению фосфатов в растворе. Для гранулированных форм картина была более оптимистична с точки зрения эффективности растворения фосфатов: содержание фосфатов в среде продолжало медленно увеличиваться до конца наблюдения (5 суток).

Таким образом, из приведенных результатов изучения солубилизирующей способности экспериментальных препаратов гранулированных биофосфорных удобрений можно заключить, что ФРМ в составе приготовленных гранулированных форм не потеряли способность растворять минеральные фосфаты.

Результаты лабораторных вегетационных испытаний образцов удобрений на бархатцах приведены на рис. 2. Как показано на рис. 2а, все удобрения, содержавшие микроорганизмы, в том числе и без руды, достоверно повышали сухой вес растений в контроле без удобрений (№12). Внесение одной руды (№9) и гранулированных форм с рудой, но без ФРМ (№№3 и 6), повышало вес растений, но различия при этом не были достоверны. Обе готовые формы биофосфорных удобрений (№№1,2 и 4,5) повышали сухой вес растений до того же уровня, что и химическое удобрение - двойной суперфосфат (№ 13). Обе формы достоверно превышали эффективность руды (№9) и биомассы (№№7 и 8) при использовании последних в качестве биоудобрений как по отдельности, так и совместно (№№10 и 11). Эффективность применения одной биомассы достоверно превышала эффективность использования одной руды. Между двумя штаммами и двумя гранулированными формами достоверных различий по сухому весу растений отмечено не было.



а



б

Рис.2. Результаты лабораторных вегетационных испытаний образцов удобрений на бархатцах при внесении различных удобрений: а - сухой вес растений; б - содержание фосфора в растениях;

Вариант №№1-8 соответствуют вариантам в таблице 1; №9 –ЕФМ; №№10,11 - биомасса штаммов №№ 181а и 305 внесена совместно с ЕФМ; №12 - контроль без удобрений; №13 – двойной суперфосфат. Планки погрешностей соответствуют НСР.

Как следует из сравнения рис. 2а и 2б, влияние вида удобрения на содержание фосфора в растениях в целом имело такой же характер, как и на сухой вес растений. Однако по содержанию фосфора не наблюдалось

достоверных отличий между внесением биомассы и руды вместе и по отдельности, и, наоборот, по содержанию фосфора вариант с суперфосфатом достоверно превосходил экспериментальные образцы гранулированных биофосфорных удобрений.

Очевидно, что внесение одной руды практически не сказалось на весе и содержании фосфора в растениях из-за нейтрального характера использовавшейся почвы. В работах [26-27] при инокуляции одной биомассой ФРМ также получили больший прирост веса растений, чем при использовании одной руды.

При использовании гранулированных форм биофосфорных удобрений сухой вес растений вырос по сравнению с контролем без удобрений на 64-70 %, а содержание фосфора - на 81-98 % (рис.2). Полученные данные согласуются с данными работы [13], в которой при использовании альгинатных гранул ФРМ с рудой и органическими добавками сухой вес растений сои вырос на 65-66%, а содержание фосфора в растениях – на 99-109 %. В качестве ФРМ в этой работе использовали *Pseudomonas striata* и *Bacillus polymyxa*.

Экспериментальные образцы гранулированных форм удобрений и высушенная биомасса хранились при +4 °С в течение 12 месяцев. Гранулированные препараты сохраняли свою структуру и не образовывали комков. За год хранения количество жизнеспособных клеток значительно сократилось, однако все же оставалось на приемлемом для практического использования уровне (таблица 1). Хуже сохранялись препараты, полученные распылительным высушиванием (средняя выживаемость клеток около 1,5 %), значительно лучше – после контактно-конвективного высушивания (средняя сохраняемость 32 %). В единственной работе, посвященной хранению гранул на основе *Burkholderia* sp. и фосфатной руды с добавлением рисовых отрубей и глины жизнеспособность клеток падала гораздо быст-

рее. Уже за 3 месяца хранения при 4 °С величина КОЕ падала на 2,5-4,5 порядка [28].

Выводы

Предложены две гранулированные формы фосфорных биоудобрений на основе фосфоритной руды тонкого помола и двух высокоактивных фосфатрастворяющих штаммов: *Acinetobacter species* 305 и *Pseudomonas species* 181a.

ФРМ в составе приготовленных гранулированных форм не теряют способность растворять минеральные фосфаты и стабильнее высвобождают фосфор, чем сухая биомасса ФРМ. Кроме того, гранулированные формы ФРМ технологически более предпочтительны, чем сухая биомасса, так как они не пылят, их легко дозировать, они хорошо распределяются в почве и быстро начинают действовать вследствие высокой дисперсности фосфатного сырья.

В лабораторном вегетационном эксперименте на бархатцах отклоненных (*Tagetes patula*) показано, что обе готовые формы биоудобрений повышали сухой вес растений до того же уровня, что и химическое удобрение - двойной суперфосфат, но уступали ему по повышению концентрации фосфора в растениях. Обе формы превышали эффективность руды и биомассы при использовании последних в качестве биоудобрений как по отдельности, так и совместно. Эффективность применения одной биомассы превышала эффективность использования одной руды.

Между двумя штаммами и двумя гранулированными формами достоверных различий, как по сухому весу растений, так и по содержанию в них фосфора отмечено не было.

Из приведенных результатов изучения эффективности экспериментальных образцов гранулированных биофосфорных удобрений можно заключить, что они пригодны для повышения биодоступности фосфора для

растений путем перевода фосфатов из руд в доступную для растений форму.

В течение года хранения при 4 °С гранулированные формы биофосфорных удобрений сохраняли свою структуру и не слеживались. Средняя сохраняемость живых клеток в микрогранулах составила около 1,5 %, а в гранулах - 32 %.

Подходы, описанные в данной работе, могут быть положены в основу последующих разработок эффективных биофосфорных удобрений. Дальнейшие исследования в этом направлении помогут более подробно изучить свойства таких удобрений и повысить их качество, прежде всего жизнеспособность клеток ФРМ.

Список использованных источников

1. Cordell D. 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. - V.84. - P.747-775.
2. Elser J. P cycle: a broken biogeochemical cycle /J. Elser, E. Bennett // *Nature*. - 2011. - V.478. - P.29-31.
3. Sample E. C., Soper R. J., Racz G. J. Reactions of phosphate fertilizers in soils // *The role of phosphorus in agriculture* / Khasawneh F.E., Sample E.C., Kamprath E.J. (Eds). - Madison, WI: American Society of Agronomy, 1980. - P.263-310.
4. Муромцев Г. С. Роль почвенных микроорганизмов в фосфорном питании растений / Г. С. Муромцев, Г. Н. Маршунова, В. Ф. Павлова, Н. В. Зольникова // *Успехи микробиологии*. - 1985. - Т.20. - С.174-198.
5. Пиковская Р. И. Мобилизация фосфатов в почве в связи с жизнедеятельностью некоторых видов микробов / Р. И. Пиковская // *Микробиология*. - 1948. - Т.17. - С.362-370.
6. Rodríguez H. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion / H. Rodríguez, R. Fraga // *Biotechnology Advances*. - 1999. - V. 17. - P. 319-339.
7. Gyaneshwar P. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plant / P. Gyaneshwar, N. Kumar, L. J. Parekh, P. S. Poole // *Plant Soil*. - 2002. - V.245. - P.83-93.
8. Saghir Khan M. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review / M. Saghir Khan, A. Zaidi, P. A. Wani // *Agron. Sustain. Dev.* - 2007. - V.27(1). - P.29-43.
9. Figueiredo M. D. V. B. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications / M. D. V. B. Figueiredo, L. Seldin, F. F. de Araujo, R. D. L. R. Mariano // *Plant growth and health promoting bacteria*. - 2010. - V.18. - P.21-43.

10. Bashan Y. 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. – V.278. – P.1-33.
11. Vassilev N. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes / N. Vassilev, M. Vassileva // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2003. - V. 61. - P.435–440.
12. Zayed G. Bio-active composts from rice straw enriched with rock phosphate and their effect on the phosphorous nutrition and microbial community in rhizosphere of cowpea G. Zayed, H. Abdel-Motaal // *Biores. Technol.* - 2005. - V.96. - P.929-935.
13. Viveganandan G. Efficacy of a rock phosphate based soil implant formulation of phosphobacteria in Soybean (*Glycine max* Men-ill) / G. Viveganandan, K. S. Jauhri // *Indian. J. Biotechnol.* – 2002. - V.1 – P.180–187.
14. Schoebitz M. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review / M. Schoebitz, M. D. López, A. Roldán // *Agron. Sustain. Dev.* - 2013. – V.33. – P.751–765.
15. Дунайцев И. А. Выделение фосфатсолубилизирующих микроорганизмов и изучение возможности их использования в промышленности и сельском хозяйстве: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Дунайцев Игорь Анатольевич. - Оболенск, 2010. – 186 с.
16. Жиглецова С. К. Возможности применения микроорганизмов для решения задач экологической и продовольственной безопасности / С. К. Жиглецова, И. А. Дунайцев, С. Г. Бесаева // *Агрохимия*. – 2010. – №6. – С.83-96.
17. Дунайцев И. А. Фосфатмобилизирующие микроорганизмы – антагонисты фитопатогенов / И. А. Дунайцев, Л. В. Коломбет, С. К. Жиглецова, Е. В. Быстрова, С. Г. Бесаева, М. В. Клыкова, Т. Н. Кондрашенко // *Микология и фитопатология*. – 2008. – Т. 42, №3. – С.264-269.
18. Дунайцев И.А. Эффективность экспериментальных образцов микробиологических фосфорных удобрений на ячмене / И.А. Дунайцев, А.А. Старшов, В.В. Перельгин, М. Клыкова, Т.Н. Кондрашенко // *Agro XXI*, 2008. – № 1-3. – С. 35-36.
19. Пат. 2451069 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А01N 63/00. Фосфатрастворяющий штамм *Pseudomonas species* 181a с фунгицидными свойствами / Дунайцев И. А., Клыкова М. В., Кондрашенко Т. Н., Сомов А. Н., Старшов А. А., Аитов Р. С., Дятлов И. А. Оpubл. 20.05.2012.
20. Пат. 2451068 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А01N 63/00. Фосфатрастворяющий штамм *Acinetobacter species* с фунгицидными свойствами. Дунайцев И. А., Клыкова М. В., Кондрашенко Т. Н., Жиглецова С. К., Старшов А. А., Бойко А. С., Дятлов И. А. Оpubл. 20.05.2012.
21. Пупышев А. Б. Стабильный реактив для одностадийного определения неорганического фосфата / А. Б. Пупышев // *Лабораторное дело*. – 1991. – № 9. – С.12-16.
22. Priyanka D. A brief study on marigold (*Tagetes species*): a review / D. Priyanka, T. Shalini, V. K. Navneet // *Int. Res. J. Pharmacy*. – 2013. – V.4(1). – P.43–48.
23. Ahmad M. Fertilization enhances growth, yield, and xanthophyll contents of marigold / M. Ahmad, M. Asif, A. Amjad, S. Ahmad // *Turk. J. Agric. For.* 35. – 2011. – P.641-648.
24. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований), 5-е изд. / Б.А. Доспехов. - М: Агропромиздат, 1985. - 352 с.
25. Ahuja A. Isolation of as starch utilizing, phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization / A. Ahuja, S. B. Ghosh, S. F. D'Souza // *Biores. Technol.* – 2007. – V.98. – P.3408-3411.

26. Kucey R. M. N. Increased yields and phosphorus uptake by westar canola (*Brassica napus* L.) inoculated with a phosphate-solubilizing isolate of *Penicillium bilaji* / R. M. N. Kucey, M. E. Leggett // *Can. J. Soil Sci.* – 1989. - V.69. - P.425-432.

27. Panhwa Q. Application of potential phosphate-solubilizing bacteria and organic acids on phosphate solubilization from phosphate rock in aerobic rice / Q. A. Panhwar, S. Jusop, U. A. Naher, R. Othman, M. I. Razi // *The Scientific World Journal.* - 2013, Article ID 272409, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/272409>.

28. Anandham R. Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia sp.* in nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation / R. Anandham, K. H. Choi, P. I. Gandhi, W. J. Yim, S. J. Park, K. A. Kim, M. Madhaiyan, T. M. Sa // *World J. Microbiol. Biotechnol.* - 2007. - V.23. - №8. - P.1121-1129.

References

1. Cordell D. 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. –V.84. – P.747-75.

2. Elser J. P cycle: a broken biogeochemical cycle /J. Elser, E. Bennett // *Nature.* - 2011. – V.478. – P.29-31.

3. Sample E. C., Soper R. J., Racz G. J. Reactions of phosphate fertilizers in soils // *The role of phosphorus in agriculture* / Khasawneh F.E., Sample E.C., Kamprath E.J. (Eds). – Madison, WI: American Society of Agronomy, 1980. – P.263–310.

4. Muromtsev G. S. Rolh pochvennykh mikroorganizmov v fosfornom pitanyi rasteniy / G. S. Muromtsev, G. N. Marshunova, V. F. Pavlova, N. V. Zolhnikova // *Uspekhi mikrobiologii.* – 1985. – T.20. – S.174-198.

5. Pikovskaya R. I. Mobilizatsiya fosfatov v pochve v svyazi s zhiznedeyzhestnostiyu nekotorykh vidov mikrobov / R. I. Pikovskaya // *Mikrobiologiya.* – 1948. – T.17. – S.362-370.

6. Rodríguez H. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion / H. Rodríguez, R. Fraga // *Biotechnology Advances.* – 1999. – V. 17. – P. 319–339.

7. Gyaneshwar P. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plant / P. Gyaneshwar, N. Kumar, L. J. Parekh, P. S. Poole // *Plant Soil.* – 2002. – V.245. – P.83–93.

8. Saghir Khan M. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review / M. Saghir Khan, A. Zaidi, P. A. Wani // *Agron. Sustain. Dev.* - 2007. – V.27(1). - P.29-43.

9. Figueiredo M. D. V. B. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications / M. D. V. B. Figueiredo, L. Seldin, F. F. de Araujo, R. D. L. R. Mariano // *Plant growth and health promoting bacteria.* - 2010. – V.18. – P.21-43.

10. Bashan Y. 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. – V.278. – P.1-33.

11. Vassilev N. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes / N. Vassilev, M. Vassileva // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2003. - V. 61. - P.435 –440.

12. Zayed G. Bio-active composts from rice straw enriched with rock phosphate and their effect on the phosphorous nutrition and microbial community in rhizosphere of cowpea G. Zayed, H. Abdel-Motaal // *Biores. Technol.* - 2005. - V.96. - P.929-935.

13. Viveganandan G. Efficacy of a rock phosphate based soil implant formulation of phosphobacteria in Soybean (*Glycine max* Men-ill) / G. Viveganandan, K. S. Jauhri // *Indian. J. Biotechnol.* – 2002. - V.1 – P.180–187.

14. Schoebitz M. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review / M. Schoebitz, M. D. López, A. Roldán // *Agron Sustain Dev.* - 2013. – V.33. – P.751–765.

15. Dunaitsev I. A. Vydeleniye fosfatsolubiliziruyushchikh mikroorganizmov i izucheniye vozmozhnosti ikh ispolzovaniya v promyshlennosti i sel'skom khozyaistve: diss. ... kand. biol. nauk: 03.02.03 / Dunaitsev Igorh Anatolievich. - Obolensk, 2010. – 186 s.

16. Zhigletsova S. K. Vozmozhnosti primeneniya mikroorganizmov dlya resheniya zadach ekologicheskoy i prodovol'stvennoy bezopasnosti / S. K. Zhigletsova, I. A. Dunaitsev, S. G. Bessaeva // *Agrokhimia.* – 2010. – №6. – S.83-96.

17. Dunaitsev I. A. Fosfatmobilisuyushchiye mikroorganizmy – antagonisty fitopatogenov / I. A. Dunaitsev, L. V. Kolombet, S. K. Zhigletsova, E. V. Bystrova, S. G. Bessaeva, M. V. Klykova, T. N. Kondrashenko // *Mikologiya i fitopatologiya.* – 2008. – T. 42, №3. – S.264-269.

18. Dunaitsev I. A. Effektivnosth eksperimentalnykh obraztsov mikrobiologicheskikh fosfornykh udobreniy na yachmenie // I. A. Dunaitsev, A. A. Starshov, V. V. Perelyguin, M. V. Klykova, T. N. Kondrashenko // *Agro XXI*, 2008. – № 1-3. – S. 35-36.

19. Pat. 2451069 Rossiiskaya Federatsiya, MPK C12N 1/20, A01N 63/00. Fosfatrastvoryajushchiy shtamm *Pseudomonas* species 181a s fungitsidnymi svoistvamy / Dunaitsev I. A., Klykova M. V., Kondrashenko T. N., Somov A. N., Starshov A. A., Aitov R. S., Dyatlov I. A. Opubl. 20.05.2012.

20. Pat. 2451068 Rossijskaya Federatsiya, MPK C12N 1/20, A01N 63/00. Fosfatrastvoryajushchiy shtamm *Acinetobacter* species s fungitsidnymi svoistvamy / Dunaitsev I. A., Klykova M. V., Kondrashenko T. N., Zhigletsova S. K., Starshov A. A., Boiko A. S., Dyatlov I. A. Opubl. 20.05.2012.

21. Pupyshev A. B. Stabilny reaktiv dlya odnostadynogo opredeleniya neorganicheskogo fosfata / A. B. Pupyshev // *Laboratornoye delo.* – 1991. – № 9. – S.12-16.

22. Priyanka D. A brief study on marigold (*Tagetes* species): a review / D. Priyanka, T. Shalini, V. K. Navneet // *Int. Res. J. Pharmacy.* – 2013. – V.4(1). – P.43–48.

23. Ahmad M. Fertilization enhances growth, yield, and xanthophyll contents of marigold / M. Ahmad, M. Asif, A. Amjad, S. Ahmad // *Turk. J. Agric. For.* 35. – 2011. – P.641-648.

24. Dospekhov B. A. Metodika polevogo opyta (s osnovamy statisticheskoi obrabotki rezultatov issledovaniy), 5-ye izd. / B. A. Dospekhov. - M: Agropromizdat, 1985. - 352 s.

25. Ahuja A. Isolation of a starch utilizing, phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization / A. Ahuja, S. B. Ghosh, S. F. D'Souza // *Biores. Technol.* – 2007. – V.98. – P.3408-3411.

26. Kucey R. M. N. Increased yields and phosphorus uptake by westar canola (*Brassica napus* L.) inoculated with a phosphate-solubilizing isolate of *Penicillium bilaji* / R. M. N. Kucey, M. E. Leggett // *Can. J. Soil Sci.* – 1989. - V.69. - P.425-432.

27. Panhwa Q. Application of potential phosphate-solubilizing bacteria and organic acids on phosphate solubilization from phosphate rock in aerobic rice / Q. A. Panhwar, S. Jusop, U. A. Naher, R. Othman, M. I. Razi // *The Scientific World Journal.* - 2013, Article ID 272409, 10 pages; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/272409>.

28. Anandham R. Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia* sp. in nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation / R. Anandham, K. H. Choi, P. I. Gandhi, W. J. Yim, S. J. Park, K. A. Kim, M. Madhaiyan, T. M. Sa // *World J. Microbiol. Biotechnol.* - 2007. - V.23. - №8. - P.1121-1129