

УДК 579.22+517.15

Л. И. САПУНОВА, А. Г. ЛОБАНОК, Л. В. ЕРХОВА, Л. Е. КАРТЫЖОВА, С. А. КУЛИШ

**ВЛИЯНИЕ ПРОДУЦИРУЮЩИХ ФИТАЗУ БАКТЕРИЙ *BACILLUS* SP. Ф-12
И *BACILLUS* SP. Ф-99 НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН РАСТЕНИЙ
И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОЧВЫ**

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

(Поступила в редакцию 23.10.13)

Введение. Фосфор – один из важнейших биогенных элементов, лимитирующих рост и развитие растений. Несмотря на то что занятые под сельскохозяйственные угодья почвы содержат огромные (400–1200 мг/кг) резервы фосфора, аккумулированного преимущественно в виде нерастворимых органических и неорганических соединений [1], концентрация доступного растениям минерала в почве обычно низка и в норме составляет около 1 ppm [2]. Традиционно для пополнения дефицита фосфора в агрокультуре применяют водорастворимые фосфорные удобрения, большая часть которых вскоре иммобилизуется и также становится недоступной растениям [1]. Решением проблемы могут стать микроорганизмы, которые солибилизируют неорганические и минерализуют нерастворимые органические фосфорсодержащие соединения, превращая их в усвояемые растениями формы [2].

Известны преимущественно ассоциированные с ризосферой растений представители родов *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Rhizobium*, которые высвобождают фосфаты из их водонерастворимых соединений и, как следствие, стимулируют рост растений [2–7]. Применение биопрепаратов, разрабатываемых на их основе, позволит не только повысить урожайность сельскохозяйственных культур, но также снизить экологическую нагрузку от излишнего использования фосфорных удобрений и частично решить экономические проблемы растениеводства.

Ранее нами из почв, прилегающих к животноводческой ферме, были изолированы бактерии *Bacillus* sp., активно гидролизующие фитат натрия [8, 9]. Указанное свойство, обусловленное продукцией фитазы, приводит к минерализации запасов органического фосфора, доступного растениям.

Цель настоящей работы – оценка способности выделенных штаммов *Bacillus* sp. 12 и *Bacillus* sp. 99 *in vitro* солибизировать нерастворимые в воде неорганические фосфаты, определение спектра синтезируемых ими внеклеточных ферментов и их влияния на прорастание семян тест-растений, оценить биохимические и микробиологические показатели почвы, интродуцированной исследуемыми культурами.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись штаммы Ф-12 и Ф-99 бактерий *Bacillus* species – высокоактивные продуценты внеклеточной фитазы [8, 9]. Бактериальные культуры хранятся в рабочей коллекции лаборатории ферментов Института микробиологии НАН Беларуси. В качестве тест-объекта использованы семена кресс-салата (*Lepidium sativum*).

Для поддержания бактериальных культур использовали пептонно-дрожжевой агар, включающий (г/л): пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; глюкозу – 0,5; NaCl – 0,05; агар-агар – 1,5; величина исходного значения pH среды – 7,3±0,1.

Глубинное выращивание бактерий проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на качалке (180–200 об/мин) при 28–30 °С в течение 48–72 ч.

Посевным материалом служили 2 об.% водной суспензии клеток бактерий ($ОП_{600} = 0,2±0,01$), выращенных на пептонно-дрожжевом агаре при 26–28 °С в течение 3 сут.

Бактерии выращивали в питательной среде следующего состава (г/л): пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 5,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; величина исходного значения pH среды – $7,0 \pm 0,1$. В качестве источников углеродного питания были использованы глюкоза (20 г/л) или пшеничные отруби (10 г/л) + глюкоза (10 г/л), в качестве источников фосфора – K_2HPO_4 в количестве 0,3 г/л, а также $FePO_4$, $AlPO_4$ и $Ca_3(PO_4)_2$ в количестве, эквивалентном содержанию фосфора в K_2HPO_4 .

Определение количества неорганического фосфата и активности фитазы проводили в соответствии с [10]. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое при pH 5,5 и температуре 37 °C за 1 мин катализирует высвобождение из фитата натрия 1 мкмоль неорганических ортофосфатов.

Активность целлюлазы определяли согласно [11], за единицу которой принимали количество фермента, которое катализирует гидролиз натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы с образованием 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в пересчете на глюкозу) за 1 ч при 40 °C и pH 5,0.

Активность протеиназы определяли модифицированным методом Ансона [12]. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое катализирует высвобождение неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктов гидролиза белкового субстрата в количестве, соответствующем приросту оптической плотности (OP_{280}) реакционной среды на 0,01 при pH 8,0 и 37°C в течение 1 мин.

Активность ферментов выражали в расчете на 1 мл культуральной жидкости (ед/мл), на 1 мг сухой биомассы (ед/мг биомассы, продуцирующая способность), на 1 мг белка (ед/мг белка, удельная активность) или на 100 г почвы.

Количество биомассы рассчитывали из предварительно построенного графика, отражающего зависимость оптической плотности суспензии клеток бактерий (OP_{600}) от их сухого веса.

Белок определяли по [13] с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина, редуцирующие вещества – согласно [14], величину pH – потенциометрически.

Ростостимулирующее действие фильтратов культуральной жидкости *Bacillus* sp. Ф-12 и *Bacillus* sp. Ф-99 изучали на семенах кресс-салата в сравнении с контролем. Оценку влияния биостимуляторов на прорастание семян проводили в чашках Петри общепринятым методом [15]. Оценку жизнеспособности семян проводили по [16], способность прорастания (всхожести) – по [17]. Учитывали также длину проростков, их сырой и сухой вес согласно [15].

Для интродукции почвы использовали культуру *Bacillus* sp. Ф-99, выращенную глубинно в питательной среде с глюкозой и пшеничными отрубями при 26–28 °C в течение 3 сут. Во флаконы, содержащие 15 г почвы влажностью 40 %, стерильно добавляли 1,5 мл культуральной жидкости *Bacillus* sp. Ф-99 (опыт) или 1,5 мл инактивированной бесклеточной культуральной жидкости (контроль). Инкубацию проводили при температуре 20–24 °C в течение 20 сут. В контрольных и опытных образцах почвы в динамике определяли величину pH, содержание белка, редуцирующих веществ и неорганических фосфатов, активность фитазы, протеазы и целлюлазы, титр клеток.

Определение титра клеток *Bacillus* sp. Ф-99 проводили методом предельных разведений, приготовленных в асептических условиях из суспензии исследуемой почвы (1 г/100 мл стерильной дистиллированной воды), в чашках Петри с 20 мл агаризованной питательной среды, содержащей мясопептонный бульон и сусло в соотношении 1:1 (pH 5,8) при 26–28 °C в течение 3 сут.

Представленные результаты являются средним арифметическим данных опыта, выполненного в трех повторностях.

Результаты и их обсуждение. Известно, что бактерии рода *Bacillus* обладают свойством солибилизировать нерастворимые неорганические фосфаты, содержащиеся в почве в виде солей кальция, алюминия, железа и других металлов [3]. При интродукции фосфатмобилизующих микроорганизмов в почву в результате их быстрой адаптации и активного размножения в прикорневой зоне растений активизируется рост и развитие таких сельскохозяйственных культур, как пшеница, арахис, картофель, сорго, соя, галега, плодовые и др., повышается их продуктивность [18–22]. В связи с этим скрининг новых фосфатмобилизующих представителей рода *Bacillus*, изучение их физиолого-биохимических свойств и механизмов мобилизации труднодоступных минеральных и органических соединений фосфора позволит создать научно-практическую основу

для разработки новых высокоэффективных биопрепаратов, обеспечивающих потребность растений в легкоусвояемых источниках фосфорного питания и их высокую продуктивность.

Проведенные нами исследования показали, что штаммы Ф-12 и Ф-99 *Bacillus* sp. помимо фитатов [8, 9] усваивают также неорганический фосфор из его нерастворимых в воде соединений – FePO_4 , AlPO_4 и $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Из исследованных веществ наиболее благоприятным источником фосфора, обеспечивающим обильный рост бактерий на агаризованных средах и формирование крупных, размером 1,5–2,0 мм, колоний, оказался FePO_4 . В меньшей мере солиобилизации поддавался AlPO_4 и практически не утилизировался $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, о чем в первом случае свидетельствовал рост бактерий на агаризованных средах в виде колоний размером не более 0,5 мм, во втором – в виде редких точечных колоний.

Сопоставимые результаты получены также при выращивании штаммов *Bacillus* sp. Ф-12 и *Bacillus* sp. Ф-99 в жидкой среде с глюкозой, включающей нерастворимые соли ортофосфорной кислоты (табл. 1). Согласно полученным данным, наиболее благоприятным источником фосфора, обеспечивающим активный рост исследуемых культур, независимо от длительности их выращивания, был FePO_4 , наименее – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Т а б л и ц а 1. Влияние минеральных солей фосфора на рост *Bacillus* sp. Ф-12 и *Bacillus* sp. Ф-99 в жидкой среде с глюкозой и синтез внеклеточной протеазы

| Вариант среды | Длительность культивирования, сут | <i>Bacillus</i> sp. Ф-12 | | | <i>Bacillus</i> sp. Ф-99 | | |
|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------|-------------|--------------------------|-----------|-------------|
| | | Белок, мг/мл | Протеаза: | | Белок, мг/мл | Протеаза: | |
| | | | ед/мл | ед/мг белка | | ед/мл | ед/мг белка |
| FePO_4 | 2 | 0,01 | 0,01 | 1,00 | 0,01 | 0,02 | 2,0 |
| | 3 | 0,01 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 |
| AlPO_4 | 2 | 0,03 | 0,04 | 1,33 | 0,03 | 0,05 | 1,67 |
| | 3 | 0,03 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0 |
| $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 2 | 0,05 | 0,99 | 19,80 | 0,05 | 1,01 | 20,20 |
| | 3 | 0,05 | 3,84 | 76,80 | 0,05 | 4,24 | 84,80 |
| K_2HPO_4 | 2 | 0,09 | 3,95 | 43,89 | 0,10 | 5,08 | 50,80 |
| | 3 | 0,10 | 7,10 | 71,00 | 0,12 | 9,75 | 81,25 |

И наоборот, уровень внеклеточной протеолитической активности культур повышался в ряду $\text{FePO}_4 \rightarrow \text{AlPO}_4 \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Так, максимум синтеза протеазы у *Bacillus* sp. Ф-12 и *Bacillus* sp. Ф-99 при использовании FePO_4 или AlPO_4 в качестве источника фосфора составлял всего 0,01–0,02 и 0,03–0,04 ед/мл соответственно и приходился на вторые сутки их культивирования. Наличие в среде $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ способствовало более активной продукции фермента, максимальный уровень накопления которого у *Bacillus* sp. Ф-12 достигал 3,84 ед/мл, у *Bacillus* sp. Ф-99 – 4,24 ед/мл на третьи сутки роста. При этом обе культуры в условиях опыта не продуцировали фитазу и целлюлазу.

Т а б л и ц а 2. Влияние минеральных солей фосфора на рост *Bacillus* sp. Ф-12 и *Bacillus* sp. Ф-99 в жидкой среде с глюкозой и пшеничными отрубями и синтез внеклеточных ферментов

| Вариант среды | Длительность культивирования, сут | <i>Bacillus</i> sp. Ф-12 | | | | | | | <i>Bacillus</i> sp. Ф-99 | | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------|-------------|-----------|-------------|---------|-------------|--------------------------|------------|-------------|-----------|-------------|---------|-------------|
| | | Белок, мг/мл | Целлюлаза: | | Протеаза: | | Фитаза: | | Белок, мг/мл | Целлюлаза: | | Протеаза: | | Фитаза: | |
| | | | ед/мл | ед/мг белка | ед/мл | ед/мг белка | ед/мл | ед/мг белка | | ед/мл | ед/мг белка | ед/мл | ед/мг белка | ед/мл | ед/мг белка |
| FePO_4 | 2 | 0,45 | 0,21 | 0,47 | 18,51 | 41,13 | 0,04 | 0,09 | 0,50 | 0,54 | 1,08 | 20,35 | 41,85 | 0,05 | 0,10 |
| | 3 | 0,51 | 0,07 | 0,14 | 9,84 | 19,29 | 0 | 0 | 0,68 | 0,21 | 0,31 | 11,73 | 17,45 | 0 | 0 |
| AlPO_4 | 2 | 0,23 | 0,07 | 0,30 | 21,24 | 92,35 | 0,04 | 0,17 | 0,34 | 0,27 | 0,79 | 24,75 | 80,76 | 0,05 | 0,15 |
| | 3 | 0,49 | 0,01 | 0,02 | 8,95 | 0,37 | 0 | 0 | 0,67 | 0,05 | 0,07 | 10,48 | 15,92 | 0 | 0 |
| $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 2 | 0,36 | 0,10 | 0,28 | 24,29 | 67,47 | 0,48 | 1,33 | 0,47 | 0,53 | 1,13 | 27,65 | 58,61 | 0,59 | 1,26 |
| | 3 | 0,58 | 0,02 | 0,03 | 22,51 | 38,81 | 0,23 | 0,40 | 0,70 | 0,50 | 0,71 | 25,60 | 36,89 | 0,25 | 0,36 |
| K_2HPO_4 | 2 | 0,89 | 0,45 | 0,51 | 65,80 | 73,93 | 2,40 | 2,70 | 0,69 | 0,83 | 1,20 | 81,00 | 117,39 | 2,70 | 3,91 |
| | 3 | 0,90 | 0,40 | 0,44 | 62,50 | 69,44 | 2,25 | 2,50 | 0,72 | 0,75 | 1,04 | 75,90 | 105,42 | 2,60 | 3,61 |

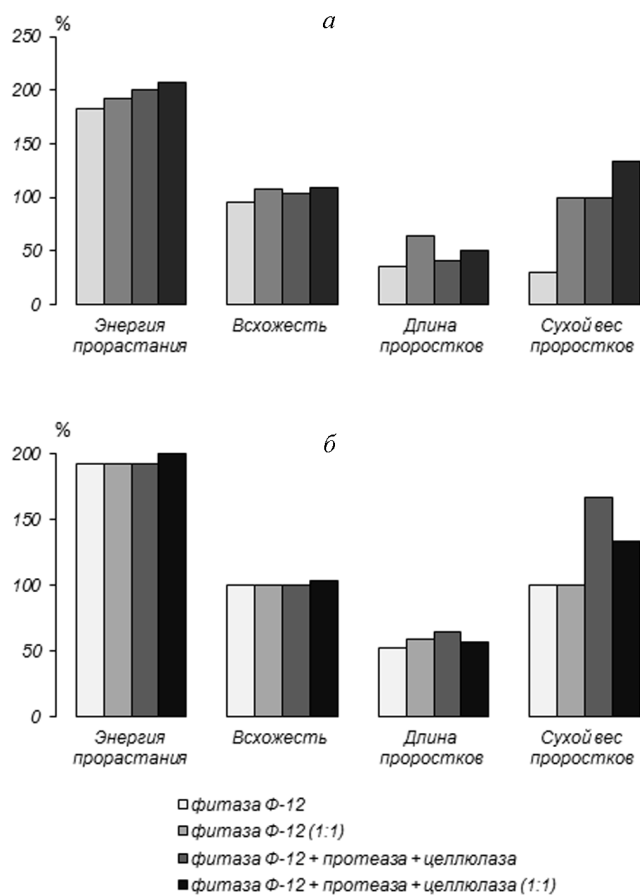


Рис. 1. Влияние внеклеточных ферментов *Bacillus* sp. Φ-12 (а) и *Bacillus* sp. Φ-99 (б) на ростовые процессы семян кресс-салата

Проведена оценка влияния внеклеточных ферментов *Bacillus* sp. Φ-12 и *Bacillus* sp. Φ-99 на прорастание семян кресс-салата. Согласно полученным результатам (рис. 1), обработка семян кресс-салата как исходными, так и разбавленными в 2 раза бесклеточными фильтратами культу-

По данным литературы, пшеничные отруби стимулируют синтез протеазы, целлюлазы и фитазы микроорганизмами различных систематических групп. Как видно из приведенных в табл. 2 экспериментальных данных, дополнительное к глюкозе введение в среду этого компонента, богатого белком, целлюлозой и органическим фосфором, не только стимулировало синтез протеазы, но также индуцировало образование целлюлазы и фитазы.

Уровень продукции последней штаммами Φ-12 и Φ-99 *Bacillus* sp. в средах с пшеничными отрубями на фоне $FePO_4$ и $AlPO_4$ на вторые сутки их роста составлял 0,04 и 0,05 ед/мл, на фоне $Ca_3(PO_4)_2$ повышался более чем в 10 раз и достигал 0,48 и 0,59 ед/мл. Продление сроков культивирования исследуемых культур до трех суток приводило при наличии в среде $Ca_3(PO_4)_2$ к частичной, а в случае $FePO_4$ и $AlPO_4$ – к полной инактивации ферментных белков. Возможно, выявленный именно в присутствии $Ca_3(PO_4)_2$ более высокий уровень внеклеточной протеазы и фитазы у бактерий *Bacillus* sp. Φ-12 и *Bacillus* sp. Φ-99 объясняется ролью кальция как кофактора исследуемых ферментных белков.

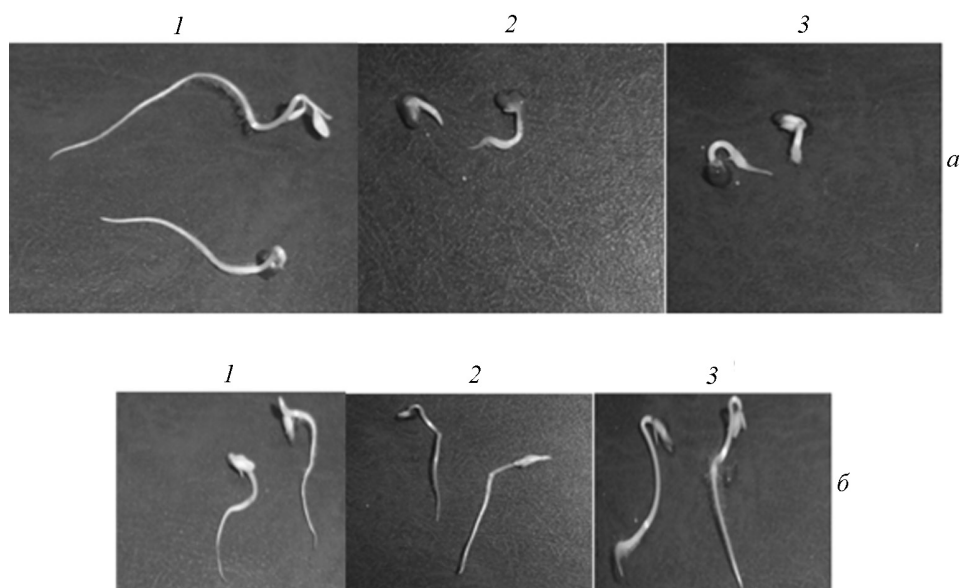


Рис. 2. Влияние обработки фитазой (а) и комплексом фитазы, протеазы, целлюлазы (б) *Bacillus* sp. Φ-12 на прорастание семян кресс-салата: 1 – контроль, 2 и 3 – соответственно исходный и разбавленный 1:1 фильтрат культуральной жидкости

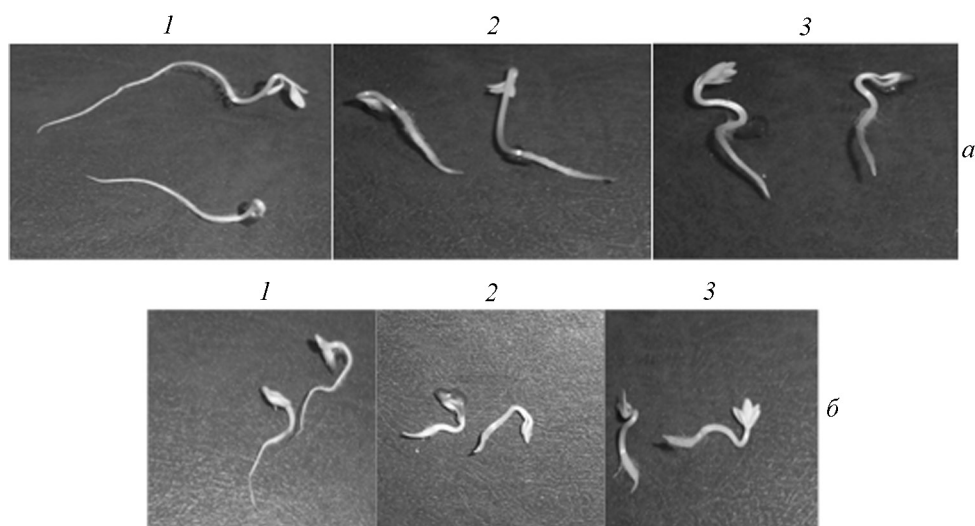


Рис. 3. Влияние обработки фитазой (а) и комплексом фитазы, протеазы, целлюлазы (б) *Bacillus* sp. Φ-99 на прорастание семян кресс-салата: 1 – контроль, 2 и 3 – соответственно исходный и разбавленный 1:1 фильтрат культуральной жидкости

ральных жидкостей *Bacillus* sp. Φ-12 (рис. 1, а) и *Bacillus* sp. Φ-99 (рис. 1, б) приводила по сравнению с контролем (инактивированными культуральными жидкостями) к повышению на 83–108 % энергии их прорастания. При этом обработка либо не влияла на всхожесть семян, либо повышала ее на 4–9 %, преимущественно при наличии в составе исследуемых ферментных комплексов протеазы и целлюлазы. Исключение составила исходная культуральная жидкость *Bacillus* sp. Φ-12 с фитазной активностью: обработка ею семян приводила к снижению показателя их всхожести на 4 %.

Оказалось также, что во всех вариантах опыта скорость роста проростков кресс-салата в длину существенно сокращалась и в среднем составляла 65 % от контрольного показателя (рис. 1). При этом, однако, формировались более крепкие проростки, которые по весу соответствовали контрольным или превосходили их на 33–67 % (рис. 2 и рис. 3). Исключением стали обработанные фитазой *Bacillus* sp. Φ-12 (рис. 1, а) проростки кресс-салата, длина и сухой вес которых в условиях опыта оказались минимальными и составили соответственно только 35 и 30 % от контроля. Максимальным положительным эффектом, состоящим в повышении энергии прорастания семян кресс-салата на 100 %, всхожести – на 4 % и сухого веса проростков на 67 % характеризуется фильтрат культуральной жидкости *Bacillus* sp. Φ-99 (рис. 1, б).

Т а б л и ц а 3. Биохимическая характеристика почвы, интродуцированной *Bacillus* sp. Φ-99

| Показатель | Длительность инокуляции, сут | | | | | |
|------------------------------|------------------------------|----------|----------------------|----------|-----------------------|----------|
| | 0 | | 10 | | 20 | |
| | опыт | контроль | опыт | контроль | опыт | контроль |
| Величина pH почвы | 7,35 | 7,10 | 7,60 | 7,15 | 8,00 | 7,20 |
| Титр клеток, КОЕ/100 г почвы | 3,5·10 ⁶ | 0 | 19,5·10 ⁶ | 0 | 385,0·10 ⁶ | 0 |
| Белок, мг/100г почвы | 0,89 | 0,67 | 3,33 | 0,73 | 12,89 | 0,70 |
| РВ, мг/100г почвы | 59,33 | 12,67 | 71,78 | 13,08 | 80,22 | 12,75 |
| Фосфор, мг/100 г почвы | 8,7 | 8,5 | 12,4 | 8,6 | 22,7 | 8,4 |
| Целлюлаза, ед/100 г почвы | 6,3 | 0 | 15,9 | 0 | 32,0 | 0 |
| Протеаза, ед/100 г почвы | 2,9 | 0 | 13,3 | 0 | 73,30 | 0 |
| Фитаза, ед/100 г почвы | 21,3 | 0 | 30,9 | 0 | 56,0 | 0 |

Для установления возможности использования штамма *Bacillus* sp. Φ-99 в качестве интродукта, стимулирующего рост растений, *in vitro* проведена оценка его жизнеспособности и ферментативной активности в почве. Как видно из представленных в табл. 3 результатов, при интродукции в почву численность *Bacillus* sp. Φ-99 через 20 дней превышает исходный показатель

более чем в 100 раз. При этом штамм синтезирует внеклеточные ферментные белки, о чем свидетельствует повышение ферментативной активности почвы и увеличение содержания в ней фосфора, редуцирующих веществ и белка. Так, через 10 дней после интродукции культуры исследуемых бактерий в почву уровень ее целлюлазной и протеолитической активностей повышается по сравнению с исходным значением в 2,5 раза, фитазной активности – в 1,5 раза, а через 20 дней – соответственно в 5,1; 23,5 и 2,6 раза. В опытном образце почвы отмечается также повышение содержания растворимого белка, редуцирующих веществ и фосфора соответственно в 3,7; 2,5 и 1,4 раза на 10-е сутки после интродукции *Bacillus* sp. Ф-99 и в 14,5; 25,3 и 2,6 раза – на 20-е сутки.

Заключение. Отобранные нами штаммы *Bacillus* sp. Ф-12 и Ф-99 утилизируют нерастворимые в воде органические (фитат натрия) и неорганические фосфорсодержащие соединения в виде ортофосфатов кальция, железа и алюминия и синтезируют внеклеточные ферменты, гидролизующие полимеры растительной клеточной стенки – фитазу, протеазу, целлюлазу. Обработка культуральными жидкостями исследуемых бактерий семян кресс-салата повышает энергию их прорастания, всхожесть, сухой вес проростков. Причем максимальный эффект на указанные процессы оказывает штамм *Bacillus* sp. Ф-99, который при интродукции в почву характеризуется высокой жизнеспособностью. Показателем его метаболической активности является повышение протеолитической, фитазной и целлюлазной активностей почвы, а также увеличение содержания в ней фосфора, редуцирующих веществ и белка.

Принимая во внимание полученные результаты, в качестве модели для оценки жизнеспособности, ферментативной активности и взаимоотношений с микрофлорой в ризосфере растений отобран штамм *Bacillus* sp. Ф-99. Можно предположить, что синтез штаммом *Bacillus* sp. Ф-99 комплекса гидролитических ферментов, расщепляющих соответствующие полимеры растительных клеточных стенок, может обеспечивать ему *in vivo* конкурентные преимущества перед аборигенной микрофлорой и служить дополнительным аргументом в пользу использования бактерий в качестве инокулянта, стимулирующего рост растений.

Литература

1. Singh B., Satyanarayana T. Process Biochem. 2011. Vol. 46. P. 1391–1398.
2. Jorquera M., Martinez F., Maruyama O., Marschner P. // Microbes Environ. 2008. Vol. 23, № 3. P. 182–191.
3. Rodríguez H., Fraga R. // Biotechnol. Adv. 1999. Vol. 17. P. 319–339.
4. Cao L., Yakupitiyage A., Li D., Diana J., Luo Z. // Enzyme Microb. Technol. 2007. Vol. 40. P. 497–507.
5. Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S. // Microbiol. Research. 2008. Vol. 163. P. 173–181.
6. Kannapiran E., Ravindran J. // J. Basic Microbiol. 2012. Vol. 52. P. 91–98.
7. Mohammadi K. // Resour. Environ. 2012. Vol. 2. P. 80–85.
8. Шляхотко Е. А., Сапунова Л. И. Микробиологическая биотехнология – наукоемкое направление современных знаний: Conf. Şt. Intern., Chişinău, Moldova, 6-8 iul. 2011. Ch.: «Elena-V. I.» SRL. 2011. P. 231–232.
9. Шляхотко Е. А., Сапунова Л. И. Биология – наука XXI века: Материалы Междунар. конф. Москва, 24 мая 2012 г. М., 2012. С. 1061–1063.
10. Препараты ферментные. Методика выполнения измерений фитазной активности: МВИ. МН 3234-2009. Октябрьский, 2009.
11. Препараты ферментные. Методика выполнения измерений β-глюканазной, ксиланазной, целлюлазной активностей: МВИ. МН 3235-2009. 2009.
12. Петрова И. С., Винюнайте М. М. // Прикладная биохим. и микробиол. 1980. Т. 2, вып. 2. С. 322–327.
13. Bradford M. M. // Annal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
14. Miller G. L. // Anal. Chem. 1959. Vol. 31, N 3. P. 426–428.
15. Возняковская Ю. М. Микрофлора растений и урожай. М., 1969.
16. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения жизнеспособности: ГОСТ 12039-82. Введ. 01.07.1983.
17. Зерно. Методы определения энергии прорастания и способности прорастания: ГОСТ 10968-88. Введ. 01.07.1988.
18. Broadbent P., Baker K. F., Franks N., Holland J. // Phytopathol. 1977. Vol. 67. P. 1027–1034.
19. Capper AL, Campbell R. // J. Appl. Bacteriol. 1986. Vol. 60. P. 155–160.
20. Kloepper J. W., Lifshitz K., Zablotowicz R. M. // Trends Biotechnol. 1989. Vol. 7. P. 39–43.
21. Haefner S., Knietsch A., Scholten Ed., Braun J. // App. Microbiol. Biotechnol. 2005. Vol. 68. P. 588–597.
22. Banerjee S., Palit R., Sengupta C., Standing D. // Australian J. Crop Sci. 2010. Vol. 4. P. 378–383.

L. I. SAPUNOVA, A. G. LOBANOK, L. V. YARKHOVA, L. E. KARTYZHOVA, S. A. KULISH

**EFFECT OF PHYTASE PRODUCING BACTERIA *BACILLUS* SP. F-12 AND *BACILLUS* SP. F-99
ON GERMINATION OF PLANT SEEDS AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF SOIL**

Summary

Physiological-biochemical characteristics of strains *Bacillus* sp. Ф-12 and *Bacillus* sp. Ф-99 and their influence *in vitro* on germination of test plant seeds and biochemical properties of soil were investigated. It was found that bacteria in submerged culture actively solubilized sodium phytate and FePO_4 , and to a lesser extent – AlPO_4 и $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ to produce phytase, protease and cellulase. It was shown that treatment of garden cress (*Lepidium sativum*) seeds with cultural liquids of *Bacillus* sp. Ф-12 and *Bacillus* sp. Ф-99 raised rate and power of germination, shortened the length of seedlings and increased their weight. It was also established *in vitro* that titer of bacteria introduced into soil tended to rise 100-fold by the following 20 days. The action of bacterium *Bacillus* sp. Ф-99 resulted in increase of soil enzymatic activity and elevated contents of phosphorus, reducing substances and protein.