

Микробиологические процессы в переработке минерального сырья: растворение различных видов фосфатных руд под действием штамма *Trichoderma asperellum* GJS 03-35

С.К.Жиглецова¹, И.А.Дунайцев¹, Т.Н.Кондрашенко¹, А.В.Ариповский², М.В.Клыкова¹, Л.В.Коломбет¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;

²Научно-производственная компания ООО Фирма «А-БИО», Пущино, Московская область, Российская Федерация

Изучено растворение фосфатных руд девяти отечественных и наиболее крупных зарубежных месторождений различного генезиса под действием штамма *Trichoderma asperellum* №16, обладающего высокими антагонистическими свойствами против различных возбудителей болезней растений, а также ростостимулирующими свойствами. Доступность фосфатных руд воздействию *T. asperellum* зависела от происхождения руды и различалась более чем в 100 раз. Наиболее доступными оказались океанические осадочные фосфориты. Процесс растворения минерального фосфорного сырья под действием *T. asperellum* имеет сложный механизм, обусловленный как участием органических кислот, так и другими факторами, основным из которых является выброс протонов при поглощении клетками иона аммония.

Ключевые слова: фосфатные руды, фосфатрастворяющие микроорганизмы, *Trichoderma asperellum*, биофосфорные удобрения

Для цитирования: Жиглецова С.К., Дунайцев И.А., Кондрашенко Т.Н., Ариповский А.В., Клыкова М.В., Коломбет Л.В. Микробиологические процессы в переработке минерального сырья: растворение различных видов фосфатных руд под действием штамма *Trichoderma asperellum* GJS 03-35. Бактериология. 2022; 7(1): 32–39. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-32-39

Microbiological processing of mineral raw materials: dissolution of various types of rock phosphates by *Trichoderma asperellum* GJS 03-35

S.K.Zhigletsova¹, I.A.Dunaytsev¹, T.N.Kondrashenko¹, A.V.Aripovsky², M.V.Klykova¹, L.V.Kolombet¹

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

²Research and Production Company «A-BIO», Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

The dissolution of rock phosphates from 9 domestic and largest foreign deposits of various genesis by *Trichoderma asperellum* strain No 16, which has high antagonistic properties against various pathogens of plant diseases, as well as growth-stimulating properties, has been studied. The availability of rock phosphates to *T. asperellum* depended on their origin and varied by more than 100 times. The most accessible were oceanic sedimentary phosphorites. The process of dissolution of rock phosphates by *T. asperellum* has a complex mechanism due to both the participation of organic acids and other factors, the main of which is the emission of protons upon absorption of ammonium ion by cells.

Key words: rock phosphates, phosphate solubilizing microorganisms, *Trichoderma asperellum*, biophosphoric fertilizers

For citation: Zhigletsova S.K., Dunaytsev I.A., Kondrashenko T.N., Aripovsky A.V., Klykova M.V., Kolombet L.V. Microbiological processing of mineral raw materials: dissolution of various types of rock phosphates by *Trichoderma asperellum* GJS 03-35. Bacteriology. 2022; 7(1): 32–39. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-32-39

Для корреспонденции:

Жиглецова Светлана Константиновна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0000
E-mail: zhigletsova@obolensk.org

Статья поступила 23.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

For correspondence:

Svetlana K. Zhigletsova, PhD (Chemical Sciences), Senior Researcher, Department of Biological Technologies, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000
E-mail: zhigletsova@obolensk.org

The article was received 23.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

Грибы рода *Trichoderma* часто упоминаются в литературе в связи с повышением безопасности продуктов питания и экологической безопасности при борьбе с болезнями растений. Это связано с их способностью подавлять развитие широкого спектра фитопатогенов, не повреждая растений и не нанося вреда другим полезным объектам окружающей среды [1]. В результате многолетних исследований в ГНЦ ПМБ был выделен штамм №16 *Trichoderma viride* Pers ex S.F.Gray, позднее идентифицированный как *T. asperellum* Samuels, Lieckfelt et Nirenberg, GLS 03-35 [2, 3]. На основе этого штамма был разработан препарат Микол [4, 5]. Штамм и препарат обладают высокими антагонистическими свойствами против различных возбудителей болезней растений, а также ростостимулирующими свойствами.

Впервые нами было показано наличие способности у грибов вида *T. asperellum* и, в частности, у штамма *T. asperellum* Samuels, Lieckfelt et Nirenberg, GLS 03-35 высвобождать фосфор из трикальцийфосфата (ТКФ) – модельного аналога минеральных фосфатных руд [6, 7]. Обнаруженная способность особенно важна в связи с возможностью использования микроорганизмов для разработки биофосфорных удобрений, в которых эффективное высвобождение фосфора из руд происходит непосредственно в полевых условиях и не наносит вреда окружающей среде [8–12]. Таким образом, сочетание биологически и экономически важных свойств у отобранного гриба рода *Trichoderma* позволяет рассматривать его в качестве перспективного продуцента биопрепаратов комбинированного действия – пролонгированного биоудобрения с фунгицидными свойствами на основе фосфатной руды в качестве источника фосфора. Однако известно, что фосфатные руды могут различаться по доступности для одного микроорганизма более чем в 5 раз и под влиянием руды может изменяться даже механизм растворения фосфатов [13]. Поэтому **целью настоящего исследования** являлось изучение растворения различных типов фосфатных руд под воздействием штамма *T. asperellum* №16 GJS 03-35, необходимое для последующей разработки комбинированного биофосфорного удобрения на его основе.

Материалы и методы

Штамм *Trichoderma viride* Pers ex S.F.Gray №16, обладающий гиперпаразитической активностью по отношению к широкому спектру фитопатогенов, в том числе к грибам рода *Fusarium* [3, 4], получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии («ГКПМ-Оболенск»). По уточненной классификации этот штамм относится к виду *T. asperellum* Samuels et al. (в Коллекции Лаборатории ботаники и систематики, Белтсвилль, ему присвоен индекс GLS 03-35) [2, 4].

Оценку фосфатрастворяющих свойств штамма №16 *T. asperellum* проводили по накоплению фосфата в растворе при культивировании гриба в жидкой среде, содержащей нерастворимый фосфат, в качестве которого использовали различные фосфатные руды.

Для определения фосфатрастворяющей активности в жидкой среде культуру гриба вносили в стерильную минеральную среду следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0;

аммоний хлористый – 1,6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; фосфатная руда с содержанием P_2O_5 2,5 г, соответствующим содержанию P_2O_5 в $Ca_3(PO_4)_2$, который использовался в качестве модельного нерастворимого фосфата [6, 7]; микроэлементы – 20 мл/л. Состав раствора микроэлементов, %: сульфат железа ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) – 0,01; сульфат меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) – 0,1; сульфат марганца ($MnSO_4 \cdot 2H_2O$) – 0,01. Посевная доза во всех случаях составляла 0,5 мл жидкой культуры гриба, выращенной во встряхиваемой колбе [4]. Инкубирование вели в колбах вместимостью 750 мл с объемом среды 100 мл на качалке IRC-1U (Kühner, Швейцария) при скорости вращения 160–180 об./мин при температуре 28°C в течение 6 суток, отбирая пробы объемом 1,5–2 мл для измерений pH и содержания фосфатов. pH измеряли на pH-метре ThermOrion 710 (Thermo Fisher Scientific, США).

Перед определением количества фосфора в растворе пробу центрифугировали на микрофуге Minispin (Eppendorf, Германия) в течение 5 мин при 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 [14]. Измерение фосфора в растворе проводили в трех повторностях на спектрофотометре UNICO 2800 (United Products & Instruments, США). Каждый опыт повторяли дважды.

Определение метаболитов, обуславливающих фосфатрастворяющую активность штамма №16 *T. asperellum*, проводили методом газовой хроматографии. Для газохроматографического определения глюкозы и образующихся из нее метаболитов к супернатанту культуральной жидкости (КЖ), приготовленному так же, как для определения растворенного фосфора, прибавляли 10% (по объему) 0,3М раствора оксалата натрия. После удаления осадка оксалата кальция центрифугированием к аликвоте супернатанта, отвечающей приблизительно 200–500 мкг исходной глюкозы, прибавляли 250 мкг маннита (внутренний стандарт) в виде 0,25%-го водного раствора. Затем пробу высушивали в вакууме, и остаток силанизировали смесью 150 мкл сухого пиридина и 150 мкл бис(триметилсилил)трифторацетамида, содержащего 2% триметилхлорсилана. Хроматографирование пертриметилсилильных эфиров определяемых веществ проводили на хроматографе HP5890 (Hewlett-Packard, США) при использовании колонки с полидиметилсилоксановой фазой SPB-1 и пламенно-ионизационного детектора. Метод ввода пробы – с делением потока газа-носителя. Температурная программа – от 100°C (1 мин) до 290°C со скоростью 10°C/мин.

В работе использовали фосфатсодержащие руды различного состава и структуры из коллекции отдела биологических технологий ГНЦ ПМБ [9] (табл. 1). Для изучения биодоступности разных групп фосфатного сырья отбирали по 1–2 вида схожих по составу руд из определенных групп сырья. Из образцов всех исследованных руд на ситах выделяли фракции от 40 до 100 мкм и использовали в дозах, эквивалентных по фосфору стандартной дозе ТКФ при исследованиях в жидкой среде, составлявшей 9,0 г/л.

Результаты и обсуждение

Для изучения отобрали руды месторождений, активно разрабатываемых в настоящий момент или представляю-

Таблица 1. Характеристика образцов рудного фосфатного сырья																	
№ в опыте	Группа руд	Тип сырья	Месторождение	P ₂ O ₅	CaO	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	CO ₂	SO ₃	SiO ₂	K ₂ O	Na ₂ O	MgO	F	Cl	Орг. в-ва и др.	Основные и характерные минералы
				5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	Апатиты эндогенные	Апатит-бадделейт-магнетитовый	Ковдорское, РФ	37,55	53,68	0,16	0,29						2,44	0,93		0,18	Апатит, магнетит, бадделейт, форстерит, флогопит, пироксен, диопсид
2	Апатиты экзогенные	Апатитовый в корях выветривания	Новополтавское, Украина	33,47	52,93	0,44	0,0	8,53	0,0		0,05	0,32	1,02	2,46		н.о.	Апатит, гидрослюды, полевой шпат
3	Фосфориты экзогенные	Фосфориты океанического залегания	Со дна Японского моря	26,3	43,4	3,1	1,9	3,8	2,5	7,9		1,2	0,9	2,8		9,10	Фосфат (фторкарбонатапатит-курскит), карбонатно-глинистые и кремнистые минералы, пирит
4	Фосфориты морские	Фосфориты залегания	Шельф Намибии	25,62	38,64	1,79	3,31	3,80	Собш 1,19	12,3	0,89	2,2	1,6	2,55		1,00	Фосфориты со дна океана позднечетвертичные конкреции
5	Фосфориты экзогенные морские	Желваковский	Вятско-Камское, РФ	23,5	36,3	4,6	2,3	4,7		16,0		0,8	1,8	2,5		10,4	Фосфат, глауконит, кварц, кальцит, пирит, гидроксиды, гидрослюды
6	Фосфориты морские	Желваковский	Егорьевское, РФ	20,0	33,1	7,5	3,7	5,5		19,0		0,8	1,3	2,2		11,7	Фосфат, глауконит, кальцит, кварц, сидерит, гипс, пирит, гидроксиды железа
7	Фосфориты экзогенные морские	Ракушечниковый	Кабала, Эстония	28,45	43,53	0,96	0,78	5,23	1,05	15,18	0,07	0,49	1,7	2,58	0,97	6,31	Фосфат (франколит), доломит, кальцит, гипс, пирит, глауконит
8	Фосфориты экзогенные морские	Ракушечниковый	Кингисеппское, РФ	27,4	43,7	0,91	0,6	5,8		13,2		0,6	2,2	2,8		7,33	Фосфатизированные раковины, кварц с ожелезением, доломит, пирит, глауконит
9	Экзогенные континентальные	Остаточно-метасоматические коры выветривания	Озерское, РФ	35,7	51,5	1,0	1,1	1,2	1,2			0,2		3,3		2,96	Фосфат, вавелит, кальцит, кварц

Таблица 2. **Продукция кислот (ГК и КГК) из глюкозы под действием *T. asperellum*, определенная по данным газовой хроматографии (ГХ) и рассчитанная по содержанию мобилизованного фосфора при растворении руд**

№ руды	Максимальная концентрация ГК по данным ГХ, г/л	Максимальная концентрация КГК по данным ГХ, г/л	Максимальная суммарная концентрация кислот по данным ГХ, г/л	Концентрация кислот, рассчитанная по растворенному фосфору, г/л
1	0,3	0,1	0,4	0,215
2	4,8	1,3	6,1	0
3	0,07	0,05	0,12	0,500
4	2,0	1,5	3,5	1,408
5	0,9	0,2	1,1	0,090
6	0,1	0,02	0,12	0,210
7	1,0	0,8	1,8	0,097
8	0,1	0,1	0,2	0,026
9	0	0	0	0,315

щих интерес в перспективе для промышленной разработки. Исследовали доступность 9 образцов фосфатных руд различной структуры и генезиса: желваковые, ракушечные, фосфориты морского генезиса – шельфовые, фосфориты континентальные остаточно-метасоматические и апатиты [15]. В Российской Федерации (РФ) главные фосфорные ресурсы представляют желваковые фосфориты и апатиты, составляющие соответственно 19,7 и 70,6% от всех запасов фосфора в РФ [15]. Основные характеристики использованных руд и их состав представлены в табл. 1.

Результаты по динамике высвобождения фосфора из руд под действием штамма №16 *T. asperellum* представлены на рис. 1. Для удобства восприятия данные разнесены на две условные группы – более и менее реакционно способные типы рудного сырья.

Как следует из рис. 1, фосфатные руды по доступности для штамма №16 *T. asperellum* различаются более чем в 100 раз, и динамика высвобождения фосфора индивидуальна практически для каждой руды. Так, быстрее остальных растворялись океанические шельфовые фосфориты (№№ 3, 4), но намибийский (№4) растворялся в полтора раза быстрее и конечное значение растворенного фосфора для него более чем в 2 раза выше, чем для фосфоритов со дна Японского моря (№3). Желваковая егорьевская руда (№6) заметно растворялась только в первые сутки, затем процесс стабилизировался, а вятская желваковая руда растворялась в течение 3 суток, однако к 6-м суткам количество фосфора в растворе упало более чем вдвое. Медленно, но в течение всего срока наблюдения растворялись ракушечный кингип-

сепский фосфорит (№8) и ковдорский апатит (№1). Последний факт особенно замечателен, поскольку апатиты являются более концентрированным и более распространенным в РФ фосфорсодержащим сырьем, чем фосфориты.

По своей доступности для штамма №16 *T. asperellum* заметно выделялись океанические фосфориты, особенно намибийский, который за 6 суток перевел в растворимое состояние более 18% фосфора от значения, полученного для модельного ТКФ [7]. Наименее доступным оказался новополтавский апатит (№2). Он практически не растворялся под действием гриба и, более того, вызывал гибель культуры.

Различие в доступности фосфорсодержащих руд, по-видимому, прежде всего обусловлено их структурой. Практически полностью аморфными по структуре являются океанические шельфовые фосфориты, поэтому они и легче всех растворялись, что соответствует данным для других микроорганизмов [9]. Ракушечные и желваковые фосфориты включают формирования частично аморфной структуры, что также облегчает их растворение. Апатитовые руды представляют собой в основном кристаллические образования вулканического генезиса и с точки зрения структуры являются наименее растворимыми. Очевидно, что различие в растворимости ковдорского (№1) и новополтавского (№2) апатитов обусловлено их элементарным составом: в последнем, например, в 2,5 раза больше фтора (табл. 1).

Как было показано нами ранее [7], *T. asperellum* значительно лучше растворяет модельное сырье – ТКФ, содержащее такое же количество фосфора, что и исследованные руды, и концентрация фосфора в растворе при аналогичных

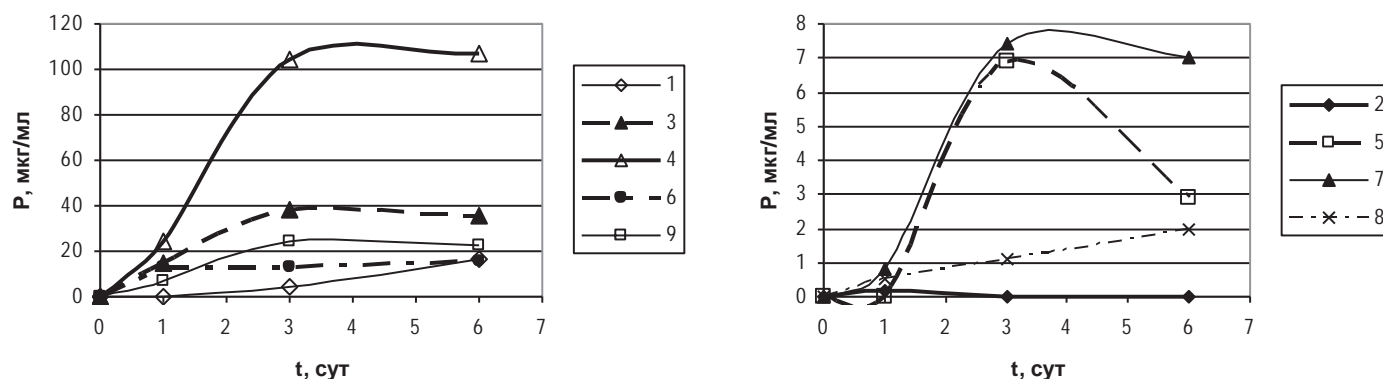


Рис. 1. Высвобождение фосфора в растворимое состояние из различных руд под действием штамма №16 *T. asperellum* (номера руд соответствуют табл. 1).

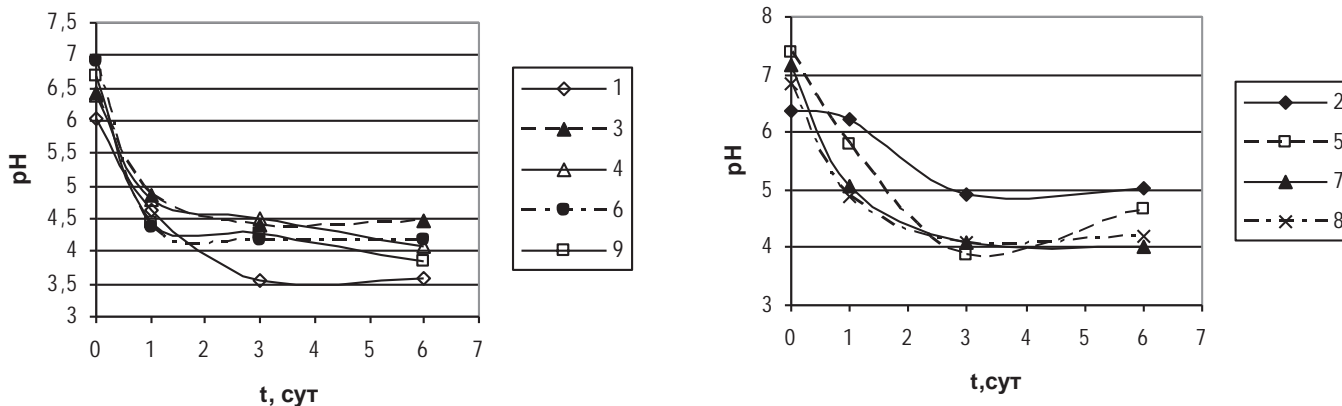


Рис. 2. Изменение pH при высвобождении фосфора в растворимое состояние из различных руд под действием штамма №16 *T. asperellum* (номера руд соответствуют табл. 1).

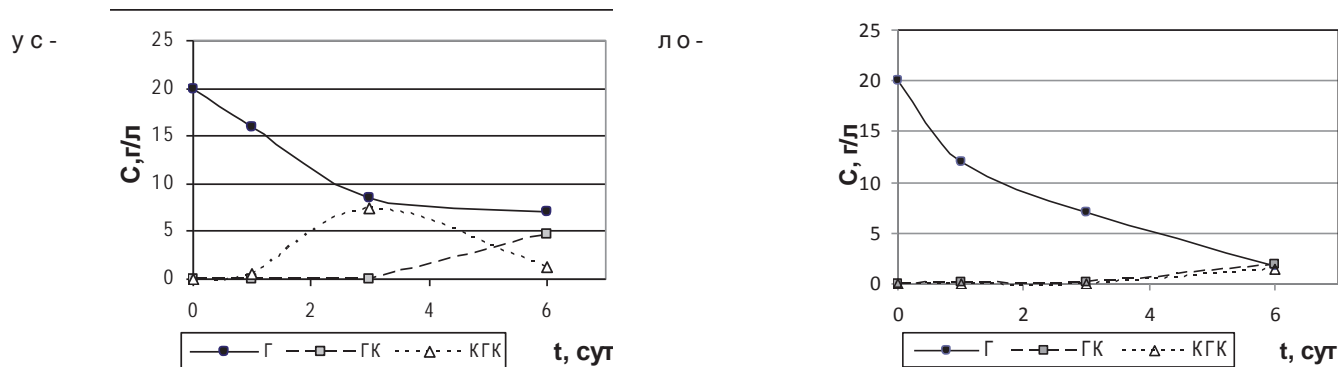


Рис. 3. Изменение концентраций глюкозы (Г), глюконовой (ГК) и кетоглюконовой (КГК) кислот при высвобождении фосфора под действием *T. asperellum* из новополтавского апатита (а) и намибийского шельфового фосфорита (б).

виях достигала 590 мкг/мл. Как следует из рис. 1, такого уровня мобилизации фосфора при растворении рудного сырья не было достигнуто ни в одном случае за весь период наблюдения (6 суток).

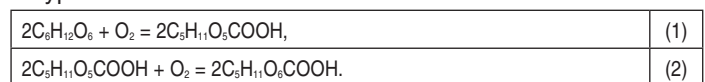
Изменения pH, наблюдавшиеся в процессах высвобождения фосфора из различных руд под действием *T. asperellum* шт. №16, не были так значительны, как изменения концентраций перешедшего в раствор фосфора, и в основном носили схожий характер (рис. 2): закисление в первые 1–3 суток до pH 3,5–5,0 и к 6-м суткам – стабилизация.

Отклонения наблюдали в трех случаях. Для вятской желваковой руды (№5) после закисления в течение первых трех суток происходило заметное повышение pH к 6-м суткам, что коррелировало с падением содержания фосфора в растворе для этой руды (рис. 1б). Для намибийского (№4) и континентального остаточного метасоматического озерского (№9) фосфоритов снижение pH наблюдали в течение всего периода наблюдения. Для варианта №9 также наблюдали прямую корреляцию изменения pH с растворением фосфора в течение всего опыта.

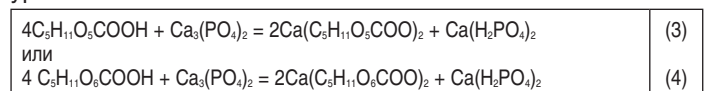
Сопоставление динамики высвобождения фосфора в раствор из руд и изменения pH (рис. 1, 2) позволяет сделать вывод, что высвобождение фосфора из руд, как и из ТКФ, определяется образованием кислых продуктов.

Из литературы известно, что основным механизмом, с помощью которого микроорганизмы переводят в раствор фосфаты, является образование различных органических кислот из углеводного субстрата [16–18]. Наиболее распростра-

ненным процессом как для бактерий, так и для грибов является образование глюконовой и кетоглюконовой кислот из глюкозы с помощью фермента глюкозодегидрогеназы [19]. Некоторые бактерии почти стехиометрически окисляют глюкозу последовательно до соответствующих кислот [20–22] по уравнениям



Образовавшиеся кислоты (глюконовая и кетоглюконовая) обуславливают растворение минерального фосфата по уравнениям



Для изучения механизма растворения руд под действием штамма №16 *T. asperellum* исследовали основные метаболиты, образующиеся в ходе процесса.

Как показал газохроматографический анализ, при растворении руд основными метаболитами, осуществлявшими мобилизацию фосфора, в отличие от растворения ТКФ [7], являлись глюконовая и кетоглюконовая кислоты (рис. 3). Однако определяющую роль в процессе растворения фосфатов, очевидно, играли структура и состав руды, а не количество продуцируемых микроорганизмом кислот. В качестве иллюстрации последнего утверждения на рис. 3 представлена динамика изменения концентраций кислот при высвобождении фосфора из двух руд, наиболее и наименее активно растворявшихся под действием *T. asperellum* – новополтав-

ского апатита (№2 на рис. 1б) и намибийского шельфового фосфорита (№4 на рис. 1а).

Как видно из рис. 3, в присутствии новополтавского апатита, практически не растворявшегося под действием *T. asperellum* (рис. 1б), в растворе находилось значительно больше кислот, чем в присутствии наиболее активно растворявшегося океанического фосфорита с шельфа Намибии (рис. 1а), хотя величины рН для обоих видов руд различались мало (рис. 2). Для остальных руд, кроме №9, изменение концентраций глюкозы, глюконовой и кетоглюконовой кислот под действием *T. asperellum* имело вид, сходный по характеру изменений с динамикой растворения намибийского шельфового фосфорита на рис. 3б.

В табл. 2 приведены данные по максимальной продукции кислот для каждого вида руды, определенные методом газовой хроматографии, а также рассчитанные по уравнениям (3) и (4), исходя из количества фосфора, перешедшего в раствор. Как видно из табл. 2, ни для одной руды не наблюдали равенства концентрации суммы глюконовых кислот, обнаруженных в растворе и рассчитанных по растворенному фосфору в соответствии с уравнениями (3) и (4). Такое равенство фиксировали ранее при изучении высвобождения фосфора из нерастворимого сырья под действием бактерий, осуществляющих самый эффективный механизм [8, 22]. Однако для штамма №16 *T. asperellum* для шести руд (№№ 1, 2, 4, 5, 7, 8) наблюдали избыток кислот примерно от 2 до 20 раз, а для двух руд (№№ 3, 6) – недостаток кислот от 2 до 5 раз. В случае озерской руды (№9) глюконовые кислоты вообще не обнаружили. Кроме того, при самом эффективном механизме вся глюкоза в среде переходит в кислоты, а в присутствии штамма №16 *T. asperellum* в кислоты превращалось <30% исходной глюкозы. Тем не менее очевидно, что в присутствии штамма №16 *T. asperellum* при растворении руд глюконовые кислоты играли существенную роль.

Очевидно, что ферментные системы, осуществляющие прямое окисление глюкозы в кислоты, активируются в присутствии руд определенного состава и структуры. Однако этот процесс сложен и трудно предсказуем, поскольку среди руд, способствующих продукции кислот, есть и наиболее, и наименее растворимые под действием штамма №16 *T. asperellum*.

Хотя в настоящее время образование органических кислот признано в качестве основного механизма мобилизации фосфатов из минеральных источников под действием микроорганизмов, в большинстве случаев не наблюдается полного соответствия растворенного фосфора содержанию образовавшихся органических кислот [16–18]. Для объяснения этого несоответствия было выдвинуто предположение, что при недостатке или даже в отсутствии продукции органических кислот высвобождение фосфора может быть обусловлено выбросом протонов, сопровождающим дыхание или ассимиляцию NH_4^+ [23, 24]. В нашем исследовании в трех случаях наблюдался недостаток суммы глюконовых кислот для мобилизации обнаруживаемого в растворе фосфора (для руд №№ 3, 6 и 9 в табл. 2). При этом в растворе присутствовало не более 40 мкг/мл, или 1,29 ммоль/л фосфора (рис. 1а). Поглощение даже десятой части имеющегося в среде аммония уже могло дать более чем достаточное

количество протонов (3 ммоль/л) для мобилизации обнаруживаемого количества фосфора. Таким образом, полученные данные подтверждают известный по литературным источникам факт, что в присутствии различных руд могут реализовываться различные механизмы высвобождения фосфатов для одного и того же микроорганизма [13].

Другие виды грибов рода *Trichoderma*, как и все микроорганизмы, также менее активны при растворении фосфатных руд по сравнению с растворением ТКФ. Так, в присутствии *T. viridae* (NFCCI 1999) из руды (месторождение и состав в работе не указаны) переходило в раствор на 40% меньше фосфора, чем из ТКФ [25]. В присутствии *T. isridae* и *T. harzianum* из нигерийской руды, состав которой также не указан, высвобождалось соответственно в 2 и в 40 раз меньше фосфора, чем из ТКФ [26]. Состав органических кислот был изучен только для *T. isridae* в присутствии одной руды. При этом наблюдали избыток кислот по отношению к растворенному фосфору, однако при растворении руды изменялся их качественный и количественный состав: не обнаруживались глутаровая и яблочная кислоты, но появлялась лимонная [26].

Максимальные значения концентраций растворенного фосфора для рудного сырья под действием штамма *T. asperellum* №16 составляли 0,2–107 мкг/мл (рис. 1). Для сравнения, в сходных условиях наиболее активные из известных в мировой практике бактериальные штаммы при растворении руд высвобождали фосфора >500 мкг/мл [9, 22]. Таким образом, штамм *T. asperellum* №16 проявлял более низкие фосфатрастворяющие свойства, чем наиболее активные из известных до сих пор микроорганизмов. В то же время по сравнению с другими грибами рода *Trichoderma* исследуемый штамм №16 *T. asperellum* проявляет довольно высокую фосфатрастворяющую активность при сходных условиях.

Наиболее важным в проведенных исследованиях является доказательство возможности высвобождения растворимого фосфора под действием штамма №16 *T. asperellum* из всех типов исследованных руд (океанические шельфовые, желваковые, апатитовые, ракушечные, остаточные метасоматические). Хотя в использовавшихся лабораторных условиях все исследованные руды были существенно слабее подвержены воздействию штамма №16 *T. asperellum*, чем ТКФ, следует отметить, что лабораторное определение доступности фосфорных руд воздействию микроорганизмов значительно отличается от процессов, происходящих в природных условиях. В природе существенно ниже аэрация, а также, как правило, ниже концентрация питательных веществ. Поэтому все процессы происходят значительно медленнее, чем в лаборатории. Однако *in situ*, при постоянном восполнении питательных веществ и поддержании условий размножения микроорганизмов, высвобождение фосфатов из минерального сырья под воздействием микроорганизмов может происходить весьма длительное время. Многочисленные литературные данные показали, что внесенные в почву фосфоритные руды полностью растворялись в течение нескольких лет [27]. Поэтому применение штамма №16 *T. asperellum* совместно с доступными рудами может быть перспективно для создания биофосфорного удобрения и, тем самым, улучшения фосфорного питания растений.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Zin NA, Badaluddin NA. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Ann Agricult Sci*. 2020;65:168–78.
2. Samuels GJ, Lieckfeldt E, Nirenberg HI. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conodia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*. 1999;51:71-88.
3. Kolombet LV, Sokolov MS, Chuprina VP, Schisler DA, Samuels GJ. Preparation on the basis of *Trichoderma asperellum* in the system of biological protection of wheat from *Fusarium* ear scab. *Agriculture and life sciences. Proc. of Eighth Intern. Workshop on Trichoderma and Gliocladium*. April 2004. Hangzhou, China. *J of Zhejiang University*. 2004;30(4):394-5.
4. Коломбет ЛВ, Жиглецова СК, Дербышев ВВ, Ежов ДВ, Косарева НИ, Быстрова ЕВ. Изучение Микофунгицида на основе *Trichoderma viride* – препарата для борьбы с болезнями растений. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2001;37(1):110-4.
5. Коломбет ЛВ. Обоснование оптимальных доз биопрепарата для озимой пшеницы. *Агро XXI*. 2006;7-9:40-44.
6. Дунайцев ИА, Коломбет ЛВ, Жиглецова СК, Быстрова ЕВ, Бесаева СГ, Клыкова МВ, Кондрашенко ТН. Фосфатмобилизирующие микроорганизмы – антагонисты фитопатогенов. *Микология и фитопатология*. 2008;42(3):264-9.
7. Коломбет ЛВ, Дунайцев ИА, Жиглецова СК. Комбинация свойств микроорганизмов – новый подход к созданию биопрепаратов для растениеводства. *Бактериология*. 2016;1(1):54-61. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-54-61
8. Goldstein AN. Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Velazquez E and Rodriguez-Barrueco C (eds.), Springer, 2007, pp. 91-96.
9. Дунайцев ИА. Выделение фосфатсольбилизирующих микроорганизмов и изучение возможности их использования в промышленности и сельском хозяйстве. Дисс. ... канд. биол. наук. Оболенск, 2010, 186 с.
10. Дунайцев ИА, Старшов АА, Перельгин ВВ, Клыкова МВ, Кондрашенко ТН. Эффективность экспериментальных образцов микробиологических фосфорных удобрений на ячмене. *Агро XXI*. 2008;1-3:35-6.
11. Дунайцев ИА, Сомов АН, Вирысов СН, Старшов АА, Кондрашенко ТН, Клыкова МВ, Жиглецова СК. Эффективность использования фосфатрастворяющих микроорганизмов в составе гранулированных биоудобрений с фосфатной рудой. *Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ*. 2016;(117):251-68.
12. Дунайцев ИА, Старшов АА, Сомов АН, Клыкова МВ, Жиглецова СК. Использование фосфатрастворяющих бактерий и арбускулярного микоризного гриба *Glomus intraradices* для повышения мобилизации фосфора из фосфоритной руды. *Агрохимия*. 2017;(9):82-9. DOI: 10.7868/S0002188117090095
13. Reyes I, Baziramakenga R, Bernier L, Antoun H. Solubilisation of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol Biochem*. 2001;33:1741-7.

14. Пупышев АБ. Стабильный реактив для одностадийного определения неорганического фосфата. *Лабораторное дело*. 1991;(9):12-6.
15. Левин БВ, Ангелов АА. Экологическая классификация фосфатного сырья. *Химическая промышленность сегодня*. 2003;(6):41-9.
16. Banik S, Dey BK. Phosphate solubilizing microorganisms of a lateritic soil. I. Solubilization of inorganic phosphates and production of organic acids by microorganisms. *Zentralblatt Bacteriol Abt*. 1981;136:478-86.
17. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv*. 1999;17:319-39.
18. Sharon JA, Hathwaik LT, Glenn GM, Imam SH, Lee CC. Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. *J Soil Sci Plant Nutr*. 2016;16(2):525-36.
19. Duine JA. Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *Eur J Biochem*. 1991 Sep 1;200(2):271-84. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16183.x
20. Elfari M, Ha SW, Bremus C, Merfort M, Khodaverdi V, Herrmann U, Sahn H, Görlich H. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005 Mar;66(6):668-74. DOI: 10.1007/s00253-004-1721-4
21. Song OR, Lee SJ, Lee YS, Lee SC, Kim KK, Choi YL. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Braz J Microbiol*. 2008 Jan;39(1):151-6. DOI: 10.1590/S1517-838220080001000030
22. Воложанцев НВ, Дунайцев ИА, Дятлов ИА, Жиглецова СК, Калмантаев ТА, Киреев ГВ, и др. Экологичные средства борьбы с патогенами человека, животных и растений. Под ред. Дятлова ИА. М.: ООО Буки Веди; 2019, 232 с.
23. Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem*. 1992;24:389-95.
24. Illmer P, Schinner F. Solubilisation of inorganic calcium phosphates: solubilisation mechanisms. *Soil Biol Biochem*. 1995;27:257-63.
25. Mahamuni SV, Wani PV, Patil AS. Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere of sugarcane & sugar beet using TCP & RP solubilization. *Asian J Biochem Pharm Res*. 2012;2:237-44.
26. Akintokun AK, Akande GA, Akintokun PO, Popoola TOS, Babalola AO. Solubilization of insoluble phosphate by organic acid-producing fungi isolated from Nigerian soil. *Int J Soil Sci*. 2007;2:301-7.
27. Шильников ИА, Кирпичников НА, Белоцветова ОЮ. Эффективность применения молотых фосфатных руд при постоянном известковании дерново-подзолистой суглинистой почвы. *Агрохимия*. 1998;(5):58-67.

References

1. Zin NA, Badaluddin NA. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Ann Agricult Sci*. 2020;65:168–78.
2. Samuels GJ, Lieckfeldt E, Nirenberg HI. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conodia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*. 1999;51:71-88.
3. Kolombet LV, Sokolov MS, Chuprina VP, Schisler DA, Samuels GJ. Preparation on the basis of *Trichoderma asperellum* in the system of biological protection of wheat from *Fusarium* ear scab. *Agriculture and life sciences. Proc. of Eighth Intern. Workshop on Trichoderma and Gliocladium*. April 2004. Hangzhou, China. *J of Zhejiang University*. 2004;30(4):394-5.
4. Kolombet LV, Zhigletsova SK, Derbyshev VV, Ezhov DV, Kosareva NI, Bystrova EV. Izuchenie Mikofungitsida na osnove *Trichoderma viride* – preparata dlya bor'by s boleznyami rastenii. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2001;37(1):110-4. (In Russian).
5. Kolombet LV, Sokolov MS. Rapid testing of antifungal, growth-regulating, and phytotoxic effects of seed fungicides. *Agricultural Chemistry*. 2006;7-9:40-4. (In Russian).

6. Dunaitsev IA, Kolombet LV, Zhigletsova SK, Bysirova EV, Besaeva SC, Klykova MV, Kondrashenko TN. Phosphate releasing microorganisms with antagonistic activity against phytopathogenic microorganisms. *Mycology and Phytopathology*. 2008;42(3):264-9. (In Russian).
7. Kolombet LV, Dunaitsev IA, Zhigletsova SK. Combined properties of microorganisms – new approach to designing bioformulations for plant growing. *Bacteriology*. 2016;1(1):54-61. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-54-61 (In Russian).
8. Goldstein AH. Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Velazquez E and Rodriguez-Barrueco C (eds.), Springer, 2007, pp. 91-96.
9. Dunaitsev IA. Vydelenie fosfatsolyubiliziruyushchikh mikroorganizmov i izuchenie vozmozhnosti ikh ispol'zovaniya v promyshlennosti i sel'skom khozyaistve. Diss. Obolensk, 2010, 186 p. (In Russian).
10. Dunaitsev IA, Starshov AA, Perelygin VV, Klykova MV, Kondrashenko TN. Effektivnost' eksperimental'nykh obraztsov mikrobiologicheskikh fosfornykh udobrenii na yachmene. *Agro XXI*. 2008;(1-3):35-6. (In Russian).
11. Dunaitsev IA, Somov AN, Viryasov SN, Starshov AA, Kondrashenko TN, Klykova MV, Zhigletsova SK. The efficacy of using phosphate solubilizing microorganisms in granular biofertilizers with phosphate ore. *Scientific Journal of KubSAU*. 2016;(117):251-68. (In Russian).
12. Dunaytsev IA, Starshov AA, Somov AN, Klykova MV, Zhigletsova SK. Use of phosphate solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* for improving phosphorus mobilization from rock phosphate. *Agricultural Chemistry*. 2017;(9):82-9. DOI: 10.7868/S0002188117090095 (In Russian).
13. Reyes I, Baziramakenga R, Bernier L, Antoun H. Solubilisation of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol Biochem*. 2001;33:1741-7.
14. Pupyshv AB. Stabil'nyi reaktiv dlya odnostadiinogo opredeleniya neorganicheskogo fosfata. *Laboratornoe delo*. 1991;(9):12-6. (In Russian).
15. Levin BV, Angelov AA. Ekologicheskaya klassifikatsiya fosfatnogo syr'ya. *Khimicheskaya promyshlennost' segodnya*. 2003;(6):41-9. (In Russian).
16. Banik S, Dey BK. Phosphate solubilizing microorganisms of a lateritic soil. I. Solubilization of inorganic phosphates and production of organic acids by microorganisms. *Zentralblatt Bacteriol Abt*. 1981;136:478-86.
17. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv*. 1999;17:319-39.
18. Sharon JA, Hathwaik LT, Glenn GM, Imam SH, Lee CC. Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. *J Soil Sci Plant Nutr*. 2016;16(2):525-36.
19. Duine JA. Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *Eur J Biochem*. 1991 Sep 1;200(2):271-84. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16183.x
20. Elfari M, Ha SW, Bremus C, Merfort M, Khodaverdi V, Herrmann U, Sahn H, Görisch H. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005 Mar;66(6):668-74. DOI: 10.1007/s00253-004-1721-4
21. Song OR, Lee SJ, Lee YS, Lee SC, Kim KK, Choi YL. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Braz J Microbiol*. 2008 Jan;39(1):151-6. DOI: 10.1590/S1517-838220080001000030
22. Volozhantsev NV, Dunaitsev IA, Dyatlov IA, Zhigletsova SK, Kalmantaev TA, Kireev GV, et al. *Ekologichnye sredstva bor'by s patogenami cheloveka, zhivotnykh i rastenii*. Edited by I.A.Dyatlov. Moscow: "Buki Vedi" Publ.; 2019, 232 p. (In Russian).
23. Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem*. 1992;24:389-95.
24. Illmer P, Schinner F. Solubilisation of inorganic calcium phosphates: solubilisation mechanisms. *Soil Biol Biochem*. 1995;27:257-63.
25. Mahamuni SV, Wani PV, Patil AS. Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere of sugarcane & sugar beet using TCP & RP solubilization. *Asian J Biochem Pharm Res*. 2012;2:237-44.
26. Akintokun AK, Akande GA, Akintokun PO, Popoola TOS, Babalola AO. Solubilization of insoluble phosphate by organic acid-producing fungi isolated from Nigerian soil. *Int J Soil Sci*. 2007;2:301-7.
27. Shil'nikov IA, Kirpichnikov NA, Belotsvetova OYu. Effektivnost' primeneniya molotykh fosfatnykh rud pri postoyannom izvestkovanii dornovo-podzolistoi suglinistoi pochvy. *Agricultural Chemistry*. 1998;(5):58-67. (In Russian).

Информация об авторах:

Дунайцев Игорь Анатольевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Кондрашенко Татьяна Николаевна, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ариповский Александр Викторович, кандидат химических наук, инженер, Научно-производственная компания ООО Фирма «А-БИО»

Клыкova Марина Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Колombet Любовь Васильевна, доктор биологических наук, заведующая научной частью, ученый секретарь ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Igor A. Dunaytsev, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of Department of Biological Technologies, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Tatyana N. Kondrashenko, Researcher of Department of Biological Technologies, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Alexander V. Aripovsky, PhD (Chemical Sciences), Engineer of the Research and Production Company «A-BIO»

Marina V. Klykova, PhD (Biological Sciences), Researcher of Department of Biological Technologies, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Lyubov V. Kolombet, PhD, DSc (Biological Sciences), Scientific Secretary, Head of Science Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology