

УДК 579.64

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩИХ СОЛЕТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА СОИ**Смирнова И.Э., Баймаханова Г.Б., Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г., Спанкулова Г.А.***ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы,
e-mail: iesmirnova@mail.ru*

Засоленность почв является одной из наиболее важных сельскохозяйственных проблем во всем мире. Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) – это универсальная культура, помогающая снижать дефицит белка в продуктах питания. Однако соя относится к несолеустойчивым культурам, что сдерживает ее производство. Для повышения урожайности сои используют минеральные азотные и фосфорные удобрения, отрицательно влияющие на окружающую среду. Альтернативой минеральным удобрениям является использование фосфатмобилизирующих бактерий, способных переводить нерастворимые фосфаты почвы в доступную растениям форму. Однако многие фосфатмобилизирующие микроорганизмы не способны расти и мобилизовать фосфаты на засоленных почвах. Целями данного исследования были выделение из ризосферы сои солетолерантных фосфатмобилизирующих бактерий, их идентификация, изучение солеустойчивости, мобилизации фосфатов и способности влиять на рост сои в условиях солевого стресса. Из ризосферы растений сои, растущих на засоленных почвах, были выделены 32 изолята фосфатмобилизирующих бактерий, проведен первичный скрининг и отобраны 12 изолятов. Изучена их способность к росту при высоком солевом стрессе, отобраны 5 солеустойчивых изолятов. Установлено, что изоляты могут мобилизовать фосфаты при высоком солевом стрессе. Наиболее высокую эффективность проявили 3 изолята, у которых активность мобилизации при солевом стрессе снижалась на 28–30%. Проведена идентификация солетолерантных фосфатмобилизирующих бактерий молекулярно-генетическим методом Сенгера. Установлено, что штаммы бактерий относятся к родам *Pseudomonas* и *Bacillus*. Показано, что инокуляция семян сои бактериями смягчает негативное влияние засоления и стимулирует рост и развитие сои (сухой вес стеблей и корней увеличился в 2,0 раза, листьев – в 3,5 раза). Таким образом, выделены и идентифицированы новые штаммы солетолерантных фосфатмобилизирующих бактерий, стимулирующие рост и развитие растений сои в условиях солевого стресса.

Ключевые слова: фосфатмобилизирующие бактерии, солетолерантность, соя, инокуляция, стимуляция роста

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан, в рамках грантового проекта ИРН AP09259080.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHOSPHATE SOLUBILIZING SALT TOLERANT BACTERIA FOR STIMULATING OF SOYBEAN GROWTH**Smirnova I.E., Baimakhanova G.B., Faizulina E.R., Tatarkina L.G., Spankulova G.A.***Research and Production Center for Microbiology and Virology LLC, Almaty,
e-mail: iesmirnova@mail.ru*

Soil salinity is one of the most important agricultural problems worldwide. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is a multipurpose crop that helps reduce protein deficiency in food. However, soybeans are not salt-tolerant crops, which reduces their production. To increase the productivity of soybeans, chemical nitrogen and phosphorus fertilizers are used, which adversely affect the environment. An alternative to chemical fertilizers is the use of phosphate-solubilizing bacteria that can convert insoluble soil phosphates into a form available to plants. However, many phosphate-solubilizing microorganisms are unable to grow and solubilize phosphate on saline soils. The purpose of this study was to isolate salt-tolerant phosphate-solubilizing bacteria from the soybean rhizosphere, identify them, study salt tolerance, phosphate solubilization, and the ability to effect soybean growth under salt stress. From the rhizosphere of soybean plants growing on saline soils, 32 isolates of phosphate-solubilizing bacteria were isolated, primary screening was carried out, and 12 isolates were selected. Their ability to grow under high salt stress was studied, and five salt-tolerant isolates were selected. It has been found that isolates can solubilize phosphates under high salt stress. Three isolates showed the highest efficiency, in which the activity of solubilization under salt stress decreased by 28–30%. Identification of salt-tolerant phosphate-solubilizing bacteria was carried out by the molecular genetic method of Sanger. It has been established that bacterial strains belong to the genera *Pseudomonas* and *Bacillus*. It was found that the inoculation of soybean seeds with bacteria softens the negative impact of salinity and stimulates the growth and development of soybean (dry weight of stems and roots increased by 2.0 times, leaves by 3.5 times). Thus, new strains of salt-tolerant phosphate-solubilizing bacteria that stimulate the growth and development of soybean plants under salt stress conditions have been isolated and identified.

Keywords: phosphate-solubilizing bacteria, salt tolerance, soybean, inoculation, growth stimulation

The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, within the framework of the grant project IRN AP09259080.

Засоленность почв является одной из наиболее важных сельскохозяйственных проблем во всем мире. Сокращение площадей посевов из-за засоленности почв сильно влияет на развитие сельскохозяйственного хозяйства [1]. Одной из причин засоленно-

сти почв является изменение климата. Глобальное потепление вызывает дефицит пресной воды и приводит к использованию минерализованной воды для орошения, что обуславливает еще большую их засоленность [2]. Во всем мире площадь засоленных почв

растет с каждым годом, что оказывает все большее влияние на сельское хозяйство, биоразнообразие и окружающую среду. Являясь сильным абиотическим стрессом, засоленность вызывает до 70% потери урожая культур [3]. Одной из основных культур, помогающих снижать дефицит белка в продуктах питания, является соя (*Glycine max* (L.) Merr.). Однако соя относится к не-солеустойчивым культурам, и засоленность почв является одним из основных факторов, сдерживающих ее производство [4]. Засоленность почв отрицательно влияет на развитие растений сои из-за осмотических явлений, токсичности ионов солей и изменения физико-химических свойств почвы. Для повышения продуктивности сои на засоленных почвах применяют химические азотные и фосфорные удобрения. Эти удобрения дают положительный эффект, но при этом отрицательно влияют на окружающую среду [5]. Фосфор является одним из основных питательных элементов растений, он участвует в фотосинтезе, синтезе ферментов и образовании АТФ. Также фосфор необходим клубеньковым бактериям – симбионтам сои, которые при дефиците фосфора не могут образовывать клубеньки и фиксировать азот [6]. Доказано, что засоленность почв существенно снижает биодоступность фосфора [7]. Поэтому поиск недрогих и экологически чистых путей повышения доступности фосфора на засоленных почвах является актуальным. Альтернативой минеральным фосфорным удобрениям представляется использование фосфатмобилизующих бактерий, способных переводить нерастворимые фосфаты почвы в растворимую доступную растениям форму, улучшать их фосфорное питание и стимулировать рост [8]. Однако многие фосфатмобилизующие микроорганизмы не способны расти и мобилизовать фосфаты на засоленных почвах. Большинство из них обладают низкой устойчивостью к засолению и не подходят в качестве инокулянтов для применения на засоленной почве [9].

Целями данного исследования были выделение из ризосферы сои солеустойчивых фосфатмобилизующих бактерий, их идентификация, изучение солеустойчивости, мобилизации фосфатов и способности влиять на рост сои в условиях солевого стресса.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований служили изоляты фосфатмобилизующих бактерий, выделенные из почв ризосферы сои, растущей на засоленных полях в Алматинской об-

ласти Казахстана в июне-июле 2021 года. Тип почвы серозем обыкновенный, основные агрохимические показатели: гумус – 1,1%, легкогидролизуемый азот – 56,8 мг/кг почвы, подвижный фосфор – 20,8 мг/кг почвы и подвижный калий – 457,1 мг/кг. Реакция водного раствора почвы pH 8,9.

Выделение фосфатмобилизующих бактерий проводили на агаризованной среде NBRIP с добавлением 10% NaCl. Среда NBRIP содержит нерастворимый трикальцийфосфат в виде мелкодисперсного осадка, придававшего среде равномерную мутность. При росте на этой среде фосфатмобилизующие бактерии образуют зоны растворения фосфатов (зоны гало). Изучение фосфатмобилизующей активности бактерий проводили по методике Сеги [10].

Солеустойчивость фосфатмобилизующих бактерий определяли в жидкой среде NBRIP, содержащей 100, 250 и 500 мМ NaCl. Рост бактерий определяли на спектрофотометре (PD-303, «ApeI», Japan) при 540 нм. Оценку роста бактерий проводили по шкале, где «-» отсутствие роста, «+» наличие роста, добавление «+» указывает на интенсивность роста.

Ризобии идентифицировали молекулярно-генетическим методом Сенгера путем секвенирования гена 16S рРНК. Геномную ДНК выделяли из суточной культуры бактерий с помощью наборов PureLink® Genomic DNA Kits (Invitrogen, США). Бактерии идентифицировали путем изучения последовательности участка гена 16S rRNA с универсальными праймерами [11]. Секвенирование фрагментов гена 16S rRNA бактерий проводили на автоматическом секвенаторе 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по протоколу производителя (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol Applied Biosystems, USA). Для циклического секвенирования производства использовали набор от Protocol Applied Biosystems, США. Результаты секвенирования обрабатывали с помощью программы SeqA (Applied Biosystems). Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей генов 16S rRNA проводили с помощью программы BLAST в международной базе данных банка генов NCBI, США. Филогенетический анализ осуществляли с помощью программы MEGA6. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили по алгоритму ClustalW. Для построения филогенетических деревьев использовали метод NJ (Neighbor-Joining).

Влияние фосфатмобилизирующих бактерий на рост сои определяли в условиях засоления почвы. Стерильные семена сои инокулировали суспензией бактерий (1×10^8 КОЕ/мл) в течение 2 часов при 23°C. После этого высевали в сосуды на 5000 мл с засоленной почвой по 3 растений на сосуд (агрехимические параметры почвы приведены выше). Через 3 месяца растения собирали, высушивали корни, стебли и листья до постоянного веса и определяли их сухой вес.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 10.0, var. 6.0 [12]. Различия считались значимыми при $p < 0,05$, значения представлены как среднее значение (M) \pm стандартное отклонение (\pm SEM).

Результаты исследований и их обсуждение

Из ризосферы здоровых растений сои, растущих на засоленных почвах, было собрано 56 образцов почв. На среде NBRIP с 10% NaCl были выделены 32 изолята бактерий, демонстрирующих четкие зоны мобилизации фосфатов (зоны гало). Проведен первичный скрининг изолятов и отобраны 12 бактерий, которые образовывали большую зону мобилизации фосфатов. Изучены их основные морфологические и биохимические признаки (табл. 1).

Установлено, что колонии изолятов были круглые с плоским или выпуклым профилем, ровным краем, диаметром 1,0–3,5 мм. Цвет колоний был белый, кремовый и жел-

тый. При исследовании морфологии клеток установлено, что бактерии были как спорообразующими, так и неспорообразующими, имели палочковидную форму, были подвижными, грамположительными и грамтрицательными. Исследование биохимических свойств показало, что изоляты были аэробами, имели разную способность использовать соединения углерода, образовывать индол, сероводород и разжижать желатину. По основным морфологическим и биохимическим признакам выделенные изоляты были отнесены к родам *Bacillus* и *Pseudomonas*.

Изучение устойчивости изолятов к солевому стрессу проводили при равных концентрациях NaCl (100, 250 и 500 mM) в среде культивирования. В таблице 2 приведены данные 12 наиболее солеустойчивых изолятов.

Выявлено, что изоляты обладали разной устойчивостью к солевому стрессу (табл. 2). При концентрации NaCl 100 mM росли все изоляты, а при концентрации 500 mM NaCl – только пять из них. Изоляты ФТ2, ФТ4, ФМ9, ФМ12 и ФС11 отобраны как наиболее солеустойчивые и были использованы в дальнейшей работе.

Важным показателем для применения фосфатмобилизирующих бактерий на засоленных почвах является их способность к мобилизации фосфатов при солевом стрессе. В связи с этим были проведены эксперименты по изучению активности мобилизации фосфатов при различной степени засоленности. Полученные данные приведены в таблице 3.

Таблица 1

Морфологические признаки солетолерантных фосфатмобилизирующих изолятов

Изоляты	Характеристика колоний					Характеристика клеток		
	Форма	Край	Профиль	Цвет	Размер, мм	Подвижность	Форма	Грамм +/-
ФТ1	круглая	ровный	плоский	белый	2–3	+	палочки	+
ФТ2	круглая	ровный	выпуклый	желтый	1–2	–	палочки	–
ФТ15	круглая	ровный	плоский	желтый	3–4	–	палочки	–
ФТ4	круглая	ровный	выпуклый	белый	1–3	+	палочки	+
ФМ9	круглая	ровный	выпуклый	кремовый	1–3	+	палочки	+
ФМ12	круглая	ровный	плоский	белый	2–3	+	палочки	+
ФЛ27	круглая	ровный	плоский	желтый	2–3,5	–	палочки	+
ФУ36	круглая	ровный	плоский	кремовый	1–3	+	палочки	–
ФС11	круглая	ровный	выпуклый	белый	2–3,5	+	палочки	+
ФТ34	круглая	ровный	выпуклый	кремовый	2–3	–	палочки	+
ФМ22	круглая	ровный	выпуклый	желтый	2–3	+	палочки	–
ФМ19	круглая	ровный	выпуклый	кремовый	1–3	+	палочки	–

Таблица 2

Скрининг солеустойчивости изолятов бактерий

Изоляты	Концентрация NaCl в среде, mM		
	100	250	500
ФТ1	++	+	–
ФТ2	++++	+++	++
ФТ15	++	+	–
ФТ4	+++	+++	++
ФМ9	++++	+++	++
ФМ12	++++	+++	+++
ФЛ27	++	+	–
ФУ36	+++	+	–
ФС11	++++	+++	+++
ФТ34	++	+	–
ФМ22	+++	+	–
ФМ19	+++	+	–

Примечание: «–» отсутствие роста; «+» наличие роста; дополнительный «+» указывает на интенсивность роста изолятов.

Таблица 3

Фосфатмобилизующая активность изолятов при солевом стрессе

Изоляты	Концентрация NaCl в среде, mM			
	0	100	250	500
	Диаметр зоны мобилизации фосфатов, мм			
ФТ2	32,6±0,2	26,6±0,7	21,9±0,1	15,8±0,2
ФТ4	37,4±0,1	33,4±0,2	28,4±0,3	26,9±0,3
ФМ9	32,9±0,4	28,9±0,1	22,9±0,1	15,9±0,1
ФМ12	36,2±0,2	30,2±0,4	26,8±0,2	24,8±0,1
ФС11	36,2±0,2	32,5±0,2	27,7±0,2	25,7±0,2

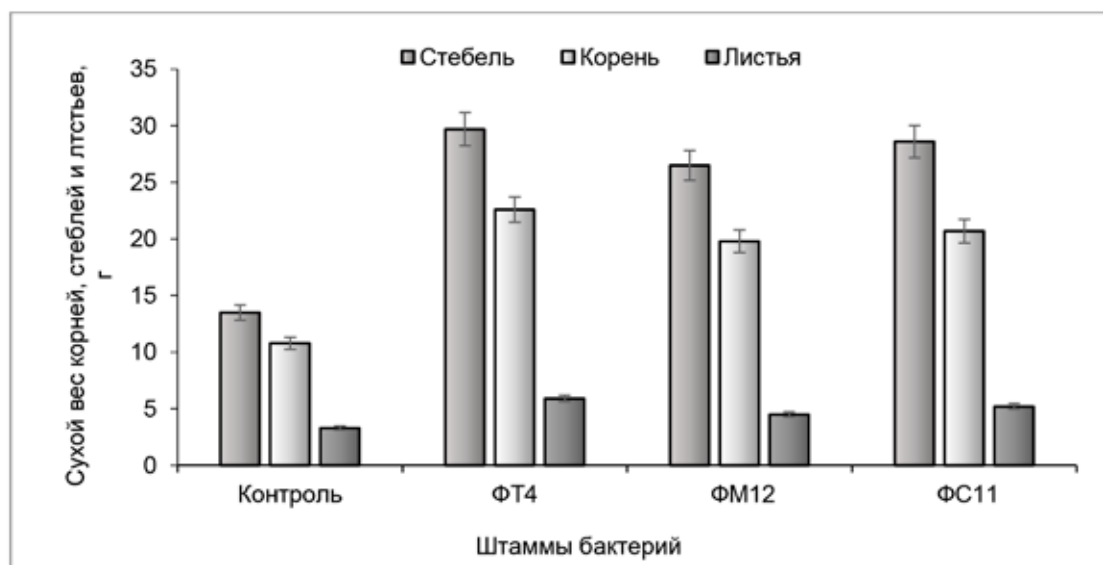
Примечание: $p < 0,05$; $n = 5$.

Их данных таблицы 3 следует, что изоляты способны к мобилизации фосфатов в условиях солевого стресса. Однако с увеличением концентрации NaCl в среде активность мобилизации снижалась. Показано, что у двух изолятов (ФТ2 и ФМ9) при концентрации 500 mM NaCl активность мобилизации снижалась на 52–53%, у изолятов ФТ4, ФМ12 и ФС11 – только на 28–30%. Эти данные показывают, что солевой стресс не оказывал сильного воздействия на мобилизацию фосфатов изолятами ФТ4, ФМ12 и ФС11 и они являются солеустойчивыми.

Молекулярно-генетическую идентификацию изолятов ФТ2, ФТ4, ФМ9, ФМ12 и ФС11 проводили методом Сенгера, путем секвенирования 16S rRNA гена и сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S rRNA со штаммами

из базы данных GenBank NCBI. Показано, что в филогенетическом отношении штаммы ФТ2, ФТ4, ФМ9 наиболее близки к роду *Pseudomonas*, видам *Pseudomonas rhizosphaerae* ФТ2, *Ps. koreensis* ФТ4 и *Ps. sp.* ФМ9, штаммы ФМ12 и ФС11 относятся к роду *Bacillus* и определены как виды *Bacillus pumilus* ФМ12 и *B. sp.* ФС11.

При отборе штаммов бактерий для применения в сельском хозяйстве одним из важных показателей является способность стимулировать рост и развитие агрокультур. Изучение влияния солетолерантных фосфатмобилизующих бактерий на рост сои проводили на сильнозасоленной почве. В опытах использовали штаммы ФТ4, ФМ12 и ФС11, контролем служили семена без обработки. Полученные результаты представлены на рисунке.



Влияние инокуляции солетолерантными фосфатмобилизующими бактериями на сухой вес растений сои

Установлено, что инокуляция семян солетолерантными фосфатмобилизующими бактериями существенно снижала негативное влияние солевого стресса на растения сои. По сравнению с контролем в вариантах с инокуляцией растений были более зелеными, высокими и крепкими. При этом сухой вес растений существенно увеличился: корней – в 1,9–2,1 раза, стеблей – в 2,0–2,2 раза, листьев – в 2,5–3,5 раза по сравнению с контролем (рисунок). Установлено, что штамм *Ps. koreensis* FT4 оказывал наиболее высокое стимулирующее влияние на рост и развитие растений сои.

Заключение

Из ризосферы растений сои, растущих на засоленных почвах, были выделены 32 изолята фосфатмобилизующих бактерий. Проведен первичный скрининг и отобраны 12 солеустойчивых и наиболее активных изолятов бактерий. Были изучены их основные морфологические и биохимические признаки. Изучена способность изолятов к росту при высоком солевом стрессе. Отобраны пять изолятов – FT2, FT4, FM9, FM12 и FC11. Важным показателем для применения в сельском хозяйстве является способность бактерий к мобилизации фосфатов в условиях засоления. Установлено, что изоляты могут мобилизовать фосфаты при высоком солевом стрессе. Наиболее высокую мобилизацию фосфатов проявили три изолята – FT4, FM12 и FC11, у которых активность мобилизации при солевом стрессе

снижалась на 28–30%. Проведена идентификация солетолерантных фосфатмобилизующих изолятов бактерий молекулярно-генетическим методом Сенгера. Показано, что штаммы бактерий относятся к роду *Pseudomonas* (*Ps. rhizosphaerae* FT2, *Ps. koreensis* FT4 и *Ps. sp.* FM9) и к роду *Bacillus* (*Bacillus pumilus* FM12 и *B. sp.* FC11). Исследование влияния солетолерантных фосфатмобилизующих бактерий на рост и развитие растений сои показало, что предпосевная инокуляция бактериями семян сои смягчала негативное влияние засоления: инокулированные растения имели более высокую длину стебля и корней и большее число листьев по сравнению с неинокулированными растениями. Так, сухой вес стеблей и корней увеличился в 2 и более раза, листьев – до 3,5 раза.

Таким образом, выделены и идентифицированы новые штаммы солетолерантных фосфатмобилизующих бактерий. Предпосевная инокуляция семян сои этими бактериями стимулирует рост и развитие растений сои в условиях высокого солевого стресса. Применение новых штаммов бактерий имеет большой потенциал при выращивании сои на засоленных почвах, так как их использование в качестве инокулянтов смягчает негативное влияние засоления и помогает растениям выживать в стрессовых условиях. Кроме того, применение солетолерантных фосфатмобилизующих бактерий в качестве биоудобрения позволит снизить дозы минеральных фосфорных удобрений.

Список литературы

1. Ullah A., Bano A., Khan N. Climate change and salinity effects on crops and chemical communication between plants and plant growth-promoting microorganisms under stress // *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2021. Vol. 5. DOI:10.3389/fsufs.2021.618092.
2. Mohanavelu A., Naganna S.R., Al-Ansari N. Irrigation induced salinity and sodicity hazards on soil and groundwater: an overview of its causes, impacts and mitigation strategies // *Agriculture*. 2021. Vol. 5, No. 11. P. 983. DOI: 10.3390/agriculture11100983.
3. Nawaz A., Shahbaz M., Asadullah I.A., Marghoob M.U., Imtiaz M., Mubeen F. Potential of salt tolerant PGPR in growth and yield augmentation of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions // *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.02019.
4. Silva B., Batista B., Lobato A. Anatomical changes in stem and root of soybean plants submitted to salt stress. *Plant Biology*. 2021. Vol. 23. P. 57-65.
5. Guignard M.S., Leitch A.R., Acquisti C., Eizaguirre C., Elser J.J., Hessen D.O., Jeyasingh P.D., Neiman M., Richardson A.E., Soltis P.S., Soltis D.E., Stevens C.J., Trimmer M., Weider L.J., Woodward G., Leitch I.J. Impacts of Nitrogen and Phosphorus: From genomes to natural ecosystems and agriculture // *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2017. Vol. 5. P. 70. DOI: 10.3389/fevo.2017.00070.
6. Li H., Wang X., Liang Q., Lyu X., Li S., Gong Z., Dong S., Yan C., Ma C. Regulation of phosphorus supply on nodulation and nitrogen fixation in soybean plants with dual-root systems. *Agronomy*. 2021. Vol. 11. P. 2354. DOI: 10.3390/agronomy11112354.
7. Dey G., Banerjee P., Sharma R.K., Maity J.P., Etesami H., Shaw A.K., Huang Y.-H., Huang H.-B., Chen C.-Y. Management of phosphorus in salinity-stressed agriculture for sustainable crop production by salt-tolerant phosphate-solubilizing bacteria // *Agronomy*. 2021. Vol. 11. P. 1552. DOI: 10.3390/agronomy11081552.
8. Timofeeva A., Galyamova M., Sedykh S. Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture. *Plants*. 2022. Vol. 11. P. 2119. DOI: 10.3390/plants11162119.
9. Joshi G., Kumar V., Brahmachari S.K. Screening and identification of novel halotolerant bacterial strains and assessment for insoluble phosphate solubilization and IAA production // *Bulletin of the National Research Centre*. 2021. Vol. 45. P. 83. DOI: 10.1186/s42269-021-00545-7.
10. Сеги Ю. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1983. 162 с.
11. Winand R., Bogaerts B., Hoffman S., Lefevre L., Delvoye M., Van Braekel J., Fu Q., Roosens N.H., De Keersmaecker S.C., Vannest K. Targeting the 16S rRNA Gene for bacterial identification in complex mixed samples: Comparative Evaluation of Second (Illumina) and Third (Oxford Nanopore Technologies) generation sequencing technologies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21. P. 298. DOI: 10.3390/ijms21010298.
12. Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA 10. Var. 6. М.: Hotline-Telecom, 2016. 288 с.