

УДК 579.64:631.46

**Фосфат-мобилизующая активность  
эндофитных штаммов *Bacillus subtilis*  
и их влияние на степень микоризации  
корней пшеницы**

**А.А. Егоршина<sup>а</sup>,**

**Р.М. Хайруллин<sup>а\*</sup>, М.А. Лукьянцев<sup>б</sup>,**

**З.М. Курамшина<sup>в</sup>, Ю.В. Смирнова<sup>в</sup>**

<sup>а</sup> Учреждение Российской академии наук

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН*

*Россия 450054, Уфа, пр. Октября, 71*

<sup>б</sup> ФГОУ ВПО Башкирский государственный аграрный университет

*Россия 450001, Уфа, ул. 50 лет Октября, 34*

<sup>в</sup> ГОУ ВПО Стерлитамакская государственная

*педагогическая академия им. Зайнаб Бишиевой*

*Россия 453103, Стерлитамак, ул. Ленина, 49<sup>1</sup>*

Received 3.06.2011, received in revised form 10.06.2011, accepted 17.06.2011

*Исследована способность 23 эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* к мобилизации труднорастворимых минеральных, а также органических фосфатов in vitro. Показано, что возможность обнаружения такой активности и её регистрируемый уровень зависели от вида среды, на которой культивировались бактерии. При использовании плотной питательной среды, содержащей нерастворимые фосфаты, штаммы, в целом, лучше всего растворяли фосфат железа. В эксперименте с использованием жидкой среды наблюдалась лучшая мобилизация бактериями фосфатов кальция и отсутствие способности растворять фосфаты железа и алюминия у большинства штаммов. Некоторые штаммы проявляли также фосфатазную активность, что указывает на их способность к разложению органических соединений фосфора. Показано, что обработка семян пшеницы эндофитными штаммами бактерий, мобилизующих фосфаты, снижает интенсивность колонизации корней микоризой, количество арбускул и везикул в корнях и другие показатели микоризации. На основании полученных данных нами впервые предложена гипотеза о том, что «растворение» фосфатов является одним из факторов, снижающих конкурентоспособность эндомикоризных грибов с фосфат-мобилизующими эндофитными бактериями, заселяющими внутренние ткани растений.*

\* Corresponding author E-mail address: krm62@mail.ru

<sup>1</sup> © Siberian Federal University. All rights reserved

*Ключевые слова:* эндофитные штаммы *Bacillus subtilis*, мобилизация фосфатов, микориза.

## Введение

Фосфор является одним из важнейших минеральных элементов в жизни растений, которые способны его поглощать только в форме неорганических фосфат-анионов, преимущественно в виде  $H_2PO_4^-$  (Lambers et al., 2008). Несмотря на высокое содержание общего фосфора в почве, его биодоступность, как правило, является лимитирующим фактором для роста, развития и продуктивности растений, что многими авторами характеризуется как «фосфорный парадокс» (Bielecki, 1973; Marschner, 1995; Lambers et al., 2006). Так, концентрация доступного для растений фосфора в почвенном растворе составляет около 1 мМ и редко достигает 10 мМ (Bielecki, 1973; Lambers et al., 2006). Связыванию фосфора с твердой фазой почвы, в основном, способствуют такие процессы, как осаждение и адсорбция, и в большинстве случаев их трудно отделить друг от друга (Afif et al., 1993).

В связи с этим внимание многих исследователей привлекает способность бактерий, стимулирующих рост растений (plant growth-promoting bacteria), повышать доступность труднорастворимых фосфатов, что считается одним из важнейших их свойств и основополагающим фактором использования перспективных микроорганизмов для создания так называемых биоудобрений (Thakuria et al., 2004; Pérez-García et al., 2011).

Одними из наиболее активных мобилизаторов фосфатов считаются представители родов *Pseudomonas* и *Bacillus* (Rodriguez et al., 1999). Бактерии рода *Bacillus* более перспективны в качестве компонентов биоудобрений, поскольку образуют споры, длительно сохраняющие жизнеспособность и устойчивые

к повреждающим воздействиям. С другой стороны, среди представителей этого таксона немного видов, являющихся патогенами и токсикогенами (например, *Bacillus anthracis*, *B. cereus* и некоторых других). Вместе с тем, часто для производства биоудобрений используют штаммы бактерий, способные не только повышать доступность для растений элементов питания в почве, но и подавлять развитие фитопатогенных грибов (Selosse et al., 2004; Pérez-García et al., 2011). При этом не исключено, что такие антагонистические бактерии, особенно эндофитные их штаммы, подавляют также развитие и микоризных грибов, играющих важную роль в обеспечении растений фосфатами.

В связи с этим целью работы стало исследование способности различных штаммов *Bacillus subtilis* к мобилизации фосфатов *in vitro*, а также их влияние на микоризацию корней пшеницы.

## Объекты, материалы и методы

### Объекты исследования

Изучали 23 штамма *Bacillus subtilis* Cohn, 19 из которых были выделены сотрудниками лаборатории биотехнологии Башкирского государственного аграрного университета из поверхностно-стерилизованных (внутренних) тканей растений пшеницы, т.е. согласно их характеристике – эндофиты. Видовая идентификация этих штаммов проводилась по культурально-морфологическим признакам и физиолого-биохимическим свойствам согласно определителю Берджи (под ред. Холт и др., 1997), а также методом сравнительного анализа длины рестрикционных фрагментов ДНК с идентифицированными

коммерческими штаммами. Четыре изученных штамма (26Д, 24Д, 11В и М1), также эндофитные, являются коммерческими. Штамм 26Д, представляющий собой основу биофунгицида фитоспорина-М (ООО НВП «БашИнком», Уфа), рассматривали в качестве эталона.

Бактерии культивировали при 37 °С на плотных и жидких питательных средах – мясо-пептонном агаре (МПА) и мясо-пептонном бульоне (МПБ) состава: мясная вода (0,5 кг мяса на 1 л воды), бактопептон – 1 %, NaCl – 0,5 %, в случае МПА добавляли 1,5 % агар-агар.

*Выявление фосфат-мобилизующей активности при росте бактерий на плотной питательной среде*

Способность штаммов *B. subtilis* к мобилизации неорганических фосфатов оценивали на среде Муромцева (глюкоза 10 г/л, аспарагин 1 г/л, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 г/л, MgSO<sub>4</sub> 0,2 г/л, кукурузный экстракт 0,02 г/л, агар 20 г/л; pH 6,8). Известно, что фосфаты удобрений адсорбируются и осаждаются в первую очередь катионами Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, и Al<sup>3+</sup> (Delgado, Torrent, 2000). Поэтому в качестве нерастворимых фосфатов в экспериментах мы использовали соль или Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, или FePO<sub>4</sub>, или AlPO<sub>4</sub>, которую в качестве единственного источника фосфора добавляли в среду в концентрации 5 г/л. Предварительно бактерии высевали газонем на МПА и инкубировали в термостате в течение суток при 37 °С. Затем вырезали агаровые блоки с культурой и помещали их на чашки со средой Муромцева. Появление прозрачных зон (гало) в случае растворения фосфатов наблюдали в течение 7-10 дней (Сэги, 1983). Фосфатмобилизующую активность бактерий оценивали количественно как площадь зон гало без вычета диаметра самого блока.

*Выявление фосфатмобилизующей активности при росте бактерий в жидкой питательной среде*

Способность бактерий растворять неорганические фосфаты оценивали также при культивировании в жидкой среде NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) состава: глюкоза 10 г/л, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5 г/л, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,25 г/л, KCl 0,2 г/л, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 г/л, неорганический фосфат (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, FePO<sub>4</sub> или AlPO<sub>4</sub>) 5 г/л, pH 7,0 (Mehta, Nautiyal, 2001). Для этого суточную культуру бактерий, полученную на МПА, смывали стерильным 0,9 %-ным раствором NaCl, получая суспензию клеток в концентрации 10<sup>9</sup> клеток/мл по эталону стандарта мутности. Этой суспензией инокулировали питательную среду NBRIP в конических колбах, которые затем помещали на шейкер при 37 °С и 200 об/мин. Среду без инокулята использовали в качестве контроля. Через 3 суток культуры бактерий центрифугировали при 27464 g, отбирали супернатант, в котором по методу Чирикова определяли содержание подвижных форм фосфора, растворимых в 0,5 М уксусной кислоте (ГОСТ 26204-91) (Минеев, 2001).

*Выявление наличия активности фосфатазы*

Для обнаружения фосфатазной активности культуры штаммов на агаровых блоках (как описано выше для теста на среде Муромцева) помещали на индикаторную среду GYEXP (15 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 100 мМ MOPS (морфолинпропансульфоновая кислота pH 7,0), 0,5 мМ FeCl<sub>3</sub>, 1 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 %-й агар), с добавлением 0,2 %-й глюкозы, 0,1%-ного дрожжевого экстракта, по 25 мкг/мл L-триптофана, L-метионина, L-лизина, а также 1 мкг/мл тиамина, 5 мкг/мл хлорамфеникола и 50 мкг/мл XP (5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфат, натриевая соль), и

инкубировали при 37 °С в течение 16 ч. При наличии активности фосфатазы культура бактерий приобретала синюю окраску, свидетельствующую о высвобождении фосфат-аниона из молекулы 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфата, выступающего в данном случае в качестве субстрата для фосфатазы. При отсутствии фосфатазной активности окраска не проявлялась (Рауне, Jackson, 1991).

*Оценка влияния инокуляции растений эндофитными штаммами бактерий на колонизацию корней везикулярно-арбускулярной микоризой*

Семена мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казахстанская 10 обрабатывали суспензией спор бактерий *B. subtilis* из расчета 20 л с титром  $10^8$  КОЕ/мл на 1 т семян. Через сутки после обработки на каждую делянку площадью 80×80 см на одинаковую глубину (4-5 см) вручную высевали по 150 откалиброванных семян. Опыты проводили в трехкратной повторности. Варианты располагали случайным образом. Почва участка – выщелоченный чернозем. Через 10 недель после посева с каждой делянки отбирали по 50 растений вместе с корневой системой, которую затем отделяли, промывали в проточной воде и окрашивали по методу Трувелло (Trouvelot et al., 1986) трипановым синим для визуализации структур везикулярно-арбускулярной микоризы. По методике этих же авторов оценивали частоту встречаемости микоризы, степень колонизации микоризой, распространенности арбускул и везикул.

*Статистические расчеты*

Эксперименты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Micro-

soft Office Excel. В таблицах приведены средние значения и их стандартные отклонения.

**Результаты**

Оценка способности эндофитных штаммов *B. subtilis* мобилизовать фосфаты на плотной среде Муромцева показала, что все они могут растворять фосфат железа, а большинство – и фосфат кальция (кроме штаммов М1, НТ, 118РН, 962РН) (табл. 1). Ни один штамм не был способен растворять фосфат алюминия. Фосфат кальция активнее растворяли штаммы 89РН, 922РН, 49РН (по убыванию), фосфат железа – штаммы 121РН, 922РН, 171РН. Таким образом, согласно результатам этого эксперимента штамм 922РН обладал наиболее выраженной общей фосфатмобилизующей активностью.

В экспериментах с культивированием штаммов в жидкой среде NBRIP мобилизация фосфата кальция происходила активнее, чем фосфатов железа и алюминия, а растворение  $AlPO_4$  – в целом лучше, чем  $FePO_4$  (табл. 1), что согласуется с данными литературы (Ahn, 1993). При этом важно отметить, что мобилизация фосфатов железа, наблюдаемая у всех штаммов на плотной среде Муромцева, в эксперименте хорошо проявилась только у штамма 832РН, в то время как остальные бактерии оказались практически неспособными к растворению этого соединения. Данные по мобилизации  $Ca_3(PO_4)_2$  позволили выделить группу «штаммов-лидеров» (11ВМ, 118РН, 162РН, 24Д, 11В), состав которой отличался от выявленного на плотной питательной среде. Фосфат алюминия активнее других растворяли штаммы 871РН, 962РН.

Анализ наличия фосфатазной активности у эндофитных штаммов бацилл показал, что в отличие от способности к растворению минеральных фосфатов фосфатазная активность наблюдалась лишь у штаммов 26Д,

Таблица 1. Растворение фосфатов штаммами *B. subtilis* в разных средах (эксперименты выполнены в трёх повторностях)

Штамм	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		FePO <sub>4</sub>		AlPO <sub>4</sub>		Активность фосфатазы
	Плотная среда*	Жидкая среда**	Плотная среда	Жидкая среда	Плотная среда	Жидкая среда	
26Д	139±9,3	2,18	191±9,5	нс***	0	1,38	+
24D	132±11,7	2,23	179±16,3	нс	0	1,31	+
11В	95±4,8	2,23	166±7,1	нс	0	1,38	-
М1	0	2,13	105±3,7	нс	0	1,23	-
НТ	0	2,10	112±8,1	нс	0	1,38	-
НТ2	103±8,6	1,91	105±4,5	нс	0	1,23	-
11ВМ	140±9,9	2,41	135±13,2	нс	0	1,23	+
11РН	108±4,2	1,95	157±12,7	нс	0	нс	+
49РН	156±12,9	2,04	138±6,9	нс	0	1,31	-
89РН	182±12,4	1,95	135±10,7	нс	0	нс	-
112РН	95±7,7	1,86	162±13,2	нс	0	нс	+
118РН	0	2,23	196±14,0	нс	0	нс	+
121РН	125±6,2	2,04	315±21,4	нс	0	нс	+
122РН	121±8,8	1,91	129±6,3	нс	0	нс	-
141РН	91±5,3	2,00	133±14,6	нс	0	1,23	+
161РН	81±6,7	2,00	135±8,1	нс	0	нс	-
162РН	135±10,7	2,23	195±15,8	нс	0	нс	+
171РН	113±10,1	1,82	203±19,4	нс	0	1,23	+
811РН	121±9,2	1,91	160±12,7	нс	0	нс	+
832РН	133±5,4	2,18	181±11,7	1,33	0	нс	-
871РН	101±8,8	1,95	105±7,1	нс	0	1,54	-
922РН	156±10,6	2,00	252±18,0	нс	0	нс	-
962РН	0	2,10	161±10,4	нс	0	1,46	-

\* Оценка по методу зон гало, мм<sup>2</sup>.

\*\*Средняя кратность превышения концентрации фосфатов в сравнении с контрольной средой.

\*\*\* Разница с контролем незначительна.

24D, 11ВМ, 11РН, 89РН, 112РН, 121РН, 141РН, 162РН, 171РН, 811РН (табл. 1).

При конкуренции за заселение растительных тканей эндофитные бактерии могут раньше проникать в корни растений, чем эндомикоризные грибы, взаимоотношения которых с растениями зависят от уровня фосфорного питания хозяев. В связи с этим мы исследовали влияние двух эндофитных штаммов (11ВМ и 26Д) на способность растений пшеницы к формированию везикулярно-

арбускулярной микоризы. Штамм 11ВМ был выбран нами как перспективный в качестве основы нового биопрепарата с комплексной биологической активностью, а штамм 26Д – эталоном сравнения, так как он является основой известного коммерческого биофунгицида Фитоспорин-М.

Обработка семян пшеницы бациллами заметно снижала все показатели микоризации корней (табл. 2). Частота встречаемости микоризы (т.е. доля растений, сформировав-

Таблица 2. Показатели микоризации корней пшеницы при инокуляции семян эндофитными фосфат-мобилизующими штаммами *B. subtilis* (эксперименты выполнены в трех повторностях), %

Показатели микоризации	Контроль	<i>B.subtilis</i> 11ВМ	<i>B.subtilis</i> 26Д
Частота встречаемости микоризы в корневой системе	99,5±0,2	90,7±2,0	82,1±1,8
Интенсивность колонизации микоризой в корневой системе	20,5±1,1	2,6±0,2	1,7±0,1
Изобилие арбускул в корневой системе	11,7±1,0	0,1±0,01	0,1±0,04
Изобилие везикул в корневой системе	2,7±0,3	0,1±0,02	0,1±0,01
Интенсивность колонизации микоризой в корневом фрагменте	20,4±1,7	1,9±0,1	2,0±0,1
Изобилие арбускул в микоризованной части корневого фрагмента	42,9±3,1	3,1±0,2	1,5±0,1
Изобилие везикул в микоризованной части корневого фрагмента	11,6±1,6	2,3±0,4	3,2±0,5

ших микоризу) под воздействием исследованных штаммов, тем не менее, сохранялась на достаточно высоком уровне по сравнению с другими показателями. Хорошо известно, что в различных экспериментах при одинаковом числе растений, инфицированных фитопатогенными грибами или имеющих микоризу в корнях, степень распространения грибных микроорганизмов в тканях может быть различной, что определяется ответной реакцией растений на внедрение этих чужеродных агентов и, безусловно, зависит также от обработки растений различными фунгицидными препаратами. Действительно, при инокуляции семян бактериями такие параметры, как интенсивность колонизации микоризой, изобилие арбускул и везикул, отражающие степень развития гриба в симбиозе, были примерно в 10 раз ниже в сравнении с неинокулированными растениями.

### Обсуждение

Во многих агроэкосистемах общее содержание фосфора в почве постоянно увеличивается, однако 80-90 % фосфатов, вносимых в виде удобрений, сорбируются на почвенных

частицах, поэтому фосфор как элемент питания остается малодоступным для растений (Jones, 1998a; Gerke et al., 2000). Для повышения его доступности растениям разрабатываются биоудобрения на основе штаммов микроорганизмов, способных мобилизовать нерастворимые почвенные фосфаты. Хотя почвенные или ризосферные бактерии предлагаются в качестве основы таких удобрений (Соколова и др., 2008), данных о фосфатмобилизующей активности эндофитных штаммов бактерий, способных проникать во внутренние растительные ткани и длительное время существовать в них, не нанося вреда самому растению-хозяину, в известной нам литературе не имеется.

Нами выявлено, что на твердой питательной среде все изученные штаммы *B.subtilis* способны растворять фосфат железа и фосфат кальция (кроме штаммов М1, НТ, 118РН, 962РН) и не могут мобилизовать фосфат алюминия (табл. 1). Отсутствие способности некоторых штаммов к мобилизации фосфатов кальция может являться артефактом, поскольку известно, что осаждение цитрата и оксалата кальция мешает обнаружению зоны

гало, несмотря на растворение фосфата (Hinsinger, 2001; Fankem et al., 2006). Также имеются данные, что фосфат кальция мобилизуется микроорганизмами лучше, чем другие нерастворимые фосфаты, поскольку в этом процессе значительную роль играет снижение рН среды, в то время как при растворении фосфатов железа и алюминия важны процессы хелатообразования с участием анионов, преимущественно, ди- и трикарбоновых кислот (Selosse et al., 2004; Pradhan, Sukla, 2006). В связи с этим можно полагать, что применение метода, основанного на образовании зон гало, недостаточно для выявления фосфат-мобилизующих микроорганизмов, поскольку многие изоляты, не продуцирующие видимые зоны гало на агаризованных средах, могут растворять значительные количества фосфатов в жидкой среде (Gupta et al., 1994).

В экспериментах с культивированием бактерий в жидких средах  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  переходил в растворимые формы фосфата активнее, чем фосфат железа и алюминия, а  $\text{AlPO}_4$  – в целом лучше, чем  $\text{FePO}_4$ . При этом растворенный фосфат-ион был обнаружен нами и в контрольной среде (табл. 1). Очевидно, что растворение данных солей фосфатов сопровождается появлением в питательном растворе и катионов металлов (алюминия, железа), что может вести не только к нарушению метаболической активности бактерий, но и к их гибели. Тем не менее, на основании полученных данных можно заключить, что исследуемые бактерии были жизнеспособны и мобилизовали труднорастворимые фосфаты кальция, железа, а некоторые также и алюминия в водной фазе. Полученные сведения позволяют предположить, что в природе при дефиците влаги в почве (ризосфере) фосфор в течение некоторого времени может оставаться доступным для растений благодаря активности бацилл, способных мобилизовать

его из форм, связанных с кальцием или железом, но не с алюминием. Можно полагать, что при наличии свободной воды в почве (ризосфере) с участием бацилл преимущественно мобилизуется только фосфат кальция. Полученные данные позволяют также высказать предположение, что известкование кислых почв способствует не только повышению рН почвенного раствора, но и лучшему усвоению фосфатсодержащих удобрений растениями благодаря наличию фосфатмобилизующей активности почвенных бацилл.

Известно, что органические кислоты, секретирующиеся почвенными микроорганизмами (Hinsinger, 2001; Fankem et al., 2006), могут способствовать переходу в почвенный раствор как минеральных, так и органических фосфатов, после чего становится возможным ферментативное освобождение фосфатной группы фосфатазами (Lambers et al., 2006; Plassard, Dell, 2010). Фосфатазная активность выявлена нами у штаммов 26Д, 24Д, 11ВМ, 11РН, 89РН, 112РН, 121РН, 141РН, 162РН, 171РН, 811РН (табл. 1). Отсутствие фосфатазной активности у других штаммов можно объяснить тем, что для всех неконститутивных ферментов группы фосфатаз характерно подавление транскрипции их генов свободным неорганическим фосфатом (Mouga et al., 2001), который, по-видимому, содержится в МПА. В связи с этим интересна работа итальянских исследователей, в которой мутантный штамм *Sinorhizobium meliloti* RD64 – суперпродуцент индолилуксусной кислоты, на среде с ограниченным содержанием фосфора не только был способен растворять его минеральные малоподвижные формы, но и обладал высокой активностью кислой фосфатазы, выделяя яблочную и янтарную кислоты (Bianco, Defez, 2010). Поэтому не исключено, что эндофитные штаммы бактерий при локализации внутри растительных тканей, содержащих

растительный фитогормон индолилуксусную кислоту, а также фосфаты в меньшей концентрации, чем в почвенном растворе, могут синтезировать фосфатазы и одновременно увеличивать подвижность минеральных фосфатов, например, за счет продукции органических кислот.

Однако, на наш взгляд, дополнительная проверка штаммов на возможность индукции у них фосфатазной активности *in vitro* не имеет смысла, поскольку в ризосфере полное отсутствие доступных фосфат-анионов представляется крайне маловероятным даже в условиях фосфорного голодания растения-хозяина (Hinsinger, 2001).

Мобилизация фосфатов и наличие фосфатазной активности у эндофитных штаммов *B. subtilis* позволяет предположить существенное значение этих микроорганизмов в обеспечении растения фосфором (Gyaneshwar et al., 2002; Pérez-García et al., 2011). Однако в естественных условиях ситуация может складываться иным образом. Во-первых, при недостатке фосфора растения синтезируют и выделяют фосфатазы, а в составе корневых экссудатов также присутствуют органические кислоты, что затрудняет оценку вклада аналогичных микробных соединений в обеспечение растений фосфором (Lambers et al., 2006). Во-вторых, специфика занимаемой эндофитами экологической ниши внутри растительных тканей делает практически невозможным прямое длительное участие этих бактерий в обеспечении растений фосфором из почвы. И, наконец, до 90 % наземных растений формируют симбиозы с микоризообразующими грибами, в результате чего фосфорное питание растений-хозяев заметно улучшается (Selosse et al., 2004).

Известно, что при достаточном уровне фосфорного питания растения слабо формируют микоризу (Rouached et al., 2010). Это

отчасти объясняется тем, что в корневых экссудатах у растений при различном уровне фосфорного питания состав фенольных соединений, являющихся сигнальными молекулами для активации прорастания ростковых трубок микоризных грибов, отличается, что и определяет степень колонизации растения грибом (Hammond, White, 2008).

Как уже отмечалось, микробы – мобилизаторы фосфатов, могут способствовать повышенному содержанию их подвижных форм в почве и обеспечению растений ими. Исходя из этого, можно предположить, что у бактерий, которые на начальных этапах формирования ассоциации с растениями хотя бы некоторое время обитают в ризосфере, способность к мобилизации фосфатов является одним из факторов конкуренции с микоризными грибами, подобно тому, как продукция сидерофоров бактериями выступает преимуществом при конкуренции с грибами за ионы железа и других металлов. Такой механизм может быть одним из существенных «ограничителей» излишней колонизации растений микоризой и контроля эндофитными бактериями интенсивности микоризации тканей корня. Подобной гипотезы мы не встречали в литературе, так же как и экспериментальных данных, подтверждающих или опровергающих её.

Правомерность такой гипотезы демонстрируют результаты полевого эксперимента по изучению влияния инокуляции семян эндофитными штаммами бацилл на распространение и развитие микоризы в корнях растений. Обработка семян пшеницы бациллами заметно снижала все показатели микоризации корней, за исключением частоты встречаемости микоризы в корневой системе, которая снижалась незначительно (табл. 2). Это позволяет предполагать, что исследованные эндофиты практически не влияют на способ-



ность растений к формированию микоризы на начальных этапах становления взаимоотношений между растением и грибом. Однако крайне низкие (по сравнению с контролем) показатели интенсивности колонизации микоризой, избытия арбускул и везикул в корневой системе в целом могут быть следствием включения стойких защитных реакций растительным организмом в ответ на внедрение эндофитных бактерий (Мубинов, Хайруллин, 2006).

Наблюдаемый эффект негативного влияния эндофитных бактерий на микотрофность корней пшеницы, по-видимому, выступает

комплексным показателем проявления различной биологической активности бацилл, например антагонистической, поскольку известно о способности исследуемых штаммов подавлять рост фитопатогенных грибов *in vitro* (Хайруллин и др., 2009). Вместе с тем полученные данные о способности эндофитов к мобилизации нерастворимых фосфатов могут служить первым подтверждением предложенной выше гипотезы. В связи с этим нами планируются более детальные исследования возможных типов взаимоотношений эндофитных бактерий с микоризными грибами.

### Список литературы

- Минеев В.Г. (2001) Практикум по агрохимии. 2-е изд. М.: Изд-во МГУ, 689 с.
- Мубинов И.Г., Хайруллин Р.М. (2006) Роль оксидаз в регуляции уровня активных форм кислорода и реакциях пшеницы на инокуляцию эндофитным штаммом *Bacillus subtilis*. Тезисы Второго международного симпозиума «Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете». Казань. С. 93–94.
- Определитель бактерий Берджи (1997) Под. ред. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П., Стейли Дж., Уильямс С., М.: Мир, Т.1-2.
- Соколова М.Г., Акимова Г.П., Нечаева Л.В. (2008) Изменение физиологических характеристик роста растений под воздействием ризосферных бактерий. Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». 1: 68-71.
- Сэги Й. (1983) Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 162 с.
- Хайруллин Р.М., Минина Т.С., Иргалина Р.Ш., Загребин И.А., Уразбахтина Н.А. (2009) Эффективность новых эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* в повышении устойчивости пшеницы к болезням. Вестник Оренбургского государственного университета. 2: 133-137.
- Afif E., Matar A., Torrent J. (1993) Availability of phosphate applied to calcareous soils of West Asia and North Africa. Soil Sci. Soc. Am. J. 57: 756-760.
- Bianco C., Defez R. (2010) Improvement of phosphate solubilization and medicago plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. Applied and Environmental Microbiology. 76: 4626-4632.
- Bielecki R.L. (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. Ann. Rev. Plant Physiol. 24: 225–252.
- Fankem H., Nwaga D., Deubel A., Dieng L., Merbach W., Etoa F.X. (2006) Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. African J. Biotechnol. 56: 2450-2460.
- Gyaneshwar P. Naresh Kumar G., Parekh L.J., Poole P.S. (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant Soil. 238: 83-93.

- Hammond J.P., White P.J. (2008) Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *J. Exp. Bot.* 59: 93–109.
- Hinsinger P. (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil.* 237: 173-195.
- Lambers H., Shane M.W., Cramer M.D., Pearse S.J., Veneklaas E.J. (2006) Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann. Bot.* 98: 693-713.
- Lambers H., Chapin F.S., Pons T.L. (2008) *Plant Physiological Ecology*. Second Edition. Springer, 604 p.
- Marschner H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. London, Academic Press, 889p.
- Mehta S., Nautiyal C.S. (2001) An efficient method for quantitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* 43: 51-56.
- Moura R.S., Martin J.F., Martin A., Liras P. (2001). Substrate analysis and molecular cloning of the extracellular alkaline phosphatase of *Streptomyces griseus*. *Microbiol.* 147: 1525-1533.
- Payne M.S., Jackson E.N. (1991) Use of alkaline phosphatase fusion to study protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173: 2278-2282.
- Pérez-García A., Romero D., de Vicente A. (2011) Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological application of *Bacilli* in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22: 1-7.
- Plassard C., Dell B. (2010) Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiol.* 30: 1129-1139.
- Pradhan N., Sukla L.B. (2006) Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African J. Biotechnol.* 5: 850-854
- Rodriguez J.B., Self J.R., Soltanpour P.N. (1999) Optimal conditions for phosphorus analysis by the ascorbic acid-molybdenum blue method. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58: 866-870.
- Rouached H., Arpat A.B., Poirier Y. (2010) Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. *Mol Plant.* 3: 288-299.
- Selosse M.-A., Baudoin E., Vandenkoornhuysse P. (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *C. R. Biologies.* 327: 639–648.
- Thakuria D., Talukdar N.C., Goswami C., Hazarika S., Boro R.C., Khan M.R. (2004) Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Curr. Sci.* 86: 978-685.
- Trouvelot A., Kough C., Gianinazzi-Pearson V. (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (eds.) *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. INRA Press, Paris, p. 217-221.

## **Phosphate-Mobilizing Activity of the Endophytic *Bacillus subtilis* Strains and their Effect on wheat Roots Micorrhization Ratio**

**Anna A. Egorshina<sup>a</sup>,  
Ramil M. Khairullin<sup>a</sup>, Mikhail A. Lukyantsev<sup>b</sup>,  
Zilya M. Kuramshina<sup>c</sup> and Yuliya V. Smirnova<sup>c</sup>**

<sup>a</sup> *Institute of Biochemistry and Genetics  
71 Prospekt Oktyabrya, Ufa, 450054 Russia*

<sup>b</sup> *Bashkir State Agrarian University  
34 50-letiya Octyabrya St., Ufa, 450001 Russia*

*Sterlitamak State Pedagogical Academy named Zainab Biishevoy*

<sup>c</sup> *49 Lenin st., Sterlitamak, 453103 Russia*

---

*The ability of 23 endophytic *Bacillus subtilis* strains to mobilize sparingly soluble mineral and organic phosphates in vitro has been researched. Detection of such activity and its ratio has been shown to be depended on the methods used. When solid medium with insoluble phosphates has been used most of strains solubilized iron phosphate better than the others. In experiments with liquid media the best mobilization of calcium phosphate has been observed but bacteria didn't solubilize iron and aluminum phosphates except a few strains. Some strains displayed phosphatase activity so one can assume their ability to degrade organic phosphorus compounds. For the first time we advance a hypothesis that phosphate solubilization could be one of the factors reducing the efficiency of endomycorrhiza fungi competition with phosphate-mobilizing endophytic bacteria colonizing internal plant tissues. Wheat grain treatment with endophytic phosphate-mobilizing strains has been shown to reduce some parameters of root mycorrhization confirming authors' hypothesis.*

*Keywords: endophytic *Bacillus subtilis* strains, phosphate mobilization, mycorrhiza.*

---