

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ БАКТЕРИАЛЬНЫХ
ШТАММОВ *PANTOEA BRENNERI* ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
СОДЕРЖАНИЯ БИОДОСТУПНЫХ ФОРМ ФОСФОРА В ПОЧВЕ****Д. С. Бульмакова, Л. В. Сокольников, А. Д. Сулейманова**

Реферат. Исследования проводили с целью определения роли штаммов почвенных бактерий *Pantoea brenneri* в повышении биодоступности почвенного фосфора и оценки биотехнологического потенциала штаммов для использования в качестве биоудобрений. Почвенные микрокосмы создавали в четырех вариантах: инокулированная нестерильная почва (30 г + 5 мл суспензии *P. brenneri*, $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл); контроль с нестерильной почвой (30 г + 5 мл 0,9% NaCl); инокулированная стерильная почва (30 г + 5 мл суспензии *P. brenneri*, $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл); контроль со стерильной почвой (30 г + 5 мл 0,9% NaCl). Микрокосмы инкубировали в течение 15 суток, образцы отбирали в начале и конце инкубации. Фосфатмобилизацию штаммов *P. brenneri* в почве подтверждает повышение уровня экспрессии генов *gdh* (глюкозодегидрогеназа) и *pho* (фосфатаза), продукты которых участвуют в солюбилизации и минерализации труднодоступных соединений фосфора. Экспрессия целевых генов в стерильной почве была выше, чем в нестерильной, в зависимости от времени инкубации и используемого штамма: в отношении гена *gdh* – в среднем в 1,2...1,9 раз, гена *pho* – в среднем в 1,3...1,7 раз. Внесение суспензии штаммов в почву способствовало увеличению числа биодоступных форм фосфора в стерильной почве в среднем на 22...27%, в нестерильной – на 15...18%. Штаммы *P. brenneri* сохраняли выживаемость в почве на протяжении всего эксперимента, что характеризует их способность к конкуренции с нативной почвенной микрофлорой. На 5 сутки инкубации отмечали 6...8-кратное увеличение числа КОЕ/г почвы, по сравнению с начальной точкой (0 сутки), а на 15 сутки величина этого показателя превышала исходную величину в среднем в 3...4 раза.

Ключевые слова: фосфатмобилизация, минерализация, солюбилизация, биопрепараты, *Pantoea brenneri*.

Введение. Фосфор (P) – один из основных макроэлементов, необходимых для нормального функционирования растений на всех этапах роста и развития. Однако низкую биодоступность фосфора в почвах считают значительным препятствием для роста и продуктивности сельскохозяйственных культур во многих регионах мира [1].

Общепринятое решение этой проблемы – внесение минеральных фосфорных удобрений – характеризуется низкой эффективностью, поскольку лишь незначительная часть (не более 25%) внесенного фосфора усваивается растениями, в то время как остальная часть переходит в недоступные формы [2]. Ситуацию усугубляет негативное воздействие избыточного применения фосфорных удобрений на окружающую среду. В связи с этим возрастает интерес к разработке и применению экологически безопасных и эффективных стратегий улучшения фосфорного питания растений. Одним из перспективных направлений считают использование потенциала почвенных микроорганизмов, способных мобилизовать недоступные формы фосфора. Фосфатмобилизующие микроорганизмы преобразуют неорганические (Pi) и органические (Po) соединения фосфора в доступные для растений формы посредством механизмов солюбилизации и минерализации [3]. К ним отнесены представители различных родов, таких как *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter* и др. Использование фосфатмобилизующих микроорганизмов в качестве биоудобрений представляет собой экологически обоснованную альтернативу

минеральным фосфорным удобрениям [4]. Помимо участия в круговороте фосфора фосфатмобилизующие микроорганизмы способны синтезировать фитогормоны, сидерофоры, антибактериальные и противогрибковые метаболиты, индуцировать системную резистентность растений, способствуя их благоприятному росту и обеспечивая устойчивость к различным абиотическим и биотическим стрессам [1].

Одна из широкоизученных групп фосфатмобилизующих бактерий – представители рода *Pantoea* из семейства *Enterobacteriaceae*, обладающих множеством биотрансформационных свойств и характеризующихся широкой экологической адаптивностью [5, 6, 7]. В проведенных нами ранее исследованиях, объектами которых были почвенные изоляты *Pantoea brenneri*, показаны множественные положительные эффекты бактерий на рост и жизнедеятельность растений. Так, установлена способность к выделению ионов аммония и цианидов, секреции комплекса гидролитических ферментов, фиксации азота, синтезу фитогормонов и сидерофоров, определена ингибирующая активность в отношении широкого спектра фитопатогенных микроорганизмов [8, 9]. Для штаммов *P. brenneri* показана способность к разложению органических и неорганических труднорастворимых фосфоросодержащих соединений в условиях *in vitro*, а в их геноме идентифицированы гены, продукты которых вовлечены в метаболизм фосфора, включая 3-фитазу, глюкозо-1-фосфатазу, щелочную фосфатазу, глюкозодегидрогеназу и др. [10].

Несмотря на активное изучение фосфатмобилизирующих микроорганизмов как основы для создания биоудобрений, одним из основных препятствий для их широкого применения в агропроизводстве остаётся несоответствие результатов, полученных в лабораторных условиях, с эффективностью в полевых испытаниях. Большинство исследований проводится *in vitro* на искусственных питательных средах, что не всегда отражает метаболизм и физиологическую активность бактерий в естественной почвенной среде [11]. Таким образом, исследования, направленные на изучение функционирования фосфатмобилизирующих микроорганизмов в условиях, максимально приближенных к естественным, приобретают особую значимость.

Цель исследования – определение роли штаммов почвенных бактерий *P. brenneri* в повышении биодоступности почвенного фосфора и оценка биотехнологического потенциала штаммов для использования в качестве биоудобрений.

Условия, материалы и методы. Объектом исследований были бактериальные штаммы *P. brenneri* (3.2 и 3.5.2), выделенные ранее из образцов почв Республики Татарстан [12, 13].

Эксперименты проводили в условиях почвенных микрокосмов. Образцы почвы отбирали в конце сентября 2023 года с глубины 15 см на сельскохозяйственном поле культуры картофеля личного подсобного хозяйства (г. Казань, Республика Татарстан, 55.740608 широты и 49.269000 долготы). Отобранные образцы помещали в стерильные ёмкости и транспортировали в лабораторию. Для подготовки к эксперименту почву высушивали при температуре +20°C, просеивали через сито с диаметром ячеек 2 мм и выдерживали при +4°C в течение одной недели, после чего помещали в горшки по 30 г. Почвенные микрокосмы создавали в четырех вариантах с трехкратной повторностью: 1) инокулированная почва (живая) – к 30 г нестерильной почвы добавляли 5 мл суспензии бактериальных клеток *P. brenneri* ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) в стерильном физиологическом растворе (0,9% NaCl); 2) контроль (живая почва) – к 30 г нестерильной почвы добавляли 5 мл стерильного физиологического раствора (0,9% NaCl); 3) инокулированная почва (стерильная) – к 30 г стерильной почвы добавляли 5 мл суспензии бактериальных клеток *P. brenneri* ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) в стерильном физиологическом растворе (0,9% NaCl); 4) контроль (стерильная почва) – к 30 г стерильной почвы добавляли 5 мл стерильного физиологического раствора (0,9% NaCl). Стерилизацию почвы проводили путем автоклавирования при 121°C и 1 атм. в течение 30 минут, повторяя цикл пять раз. Подготовленные микрокосмы инкубировали в течение 15 суток при температуре +28...30°C с 16-часовым световым периодом и интенсивностью освещения 2000 люкс/м². Образцы почвы

отбирали в начале (T0) и в конце (T15) инкубации с помощью стерильных инструментов. Полученные образцы хранили при -20°C до проведения анализа.

Для анализа экспрессии генов, продукты которых участвуют в метаболизме фосфора, из образцов почвы выделяли суммарную РНК с помощью набора RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Экспрессию генов, кодирующих фосфатазы (*pho*) и глюкозодегидрогеназу (*gdh*), оценивали методом количественной ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) с помощью набора OneTub RT-PCR SYBR (Евроген, Россия) и амплификатора Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Для амплификации использовали следующие праймеры: *pho*: 5'-ATGCGCGACCGAAAGACC-3' (прямой) и 5'-TGCTGGCGACGAGACGAA-3' (обратный); *gdh*: 5'-CAGGTAAGTAAACCGGCATT-3' (прямой) и 5'-TACGCTGTTTCCACACCAC-3' (обратный). Программа проведения количественной ОТ-ПЦР включала следующие этапы: обратная транскрипция (55°C – 15 мин), инактивация ревертазы и активация полимеразы (95°C – 1 мин), 50 циклов (денатурация: 95°C – 15 сек, отжиг праймеров: 67,5°C – 20 сек, элонгация и измерение флуоресценции: 72°C – 20 сек), кривая плавления (55...95°C с шагом 0,5°C). Нормализацию уровней экспрессии целевых генов проводили по отношению к уровню экспрессии референтного гена *leuS* (ген лейцин-тРНК-лигазы). Для амплификации *leuS* использовали следующие праймеры: 5'-CCGGTCGATCAGTATGTGGG-3' (прямой) и 5'-TTGGAGTTAACCAGACCGGC-3' (обратный). Результаты ОТ-ПЦР анализировали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ на основе значений порога цикла (Ct). Сначала рассчитывали ΔCt путем вычитания среднего значения Ct референтного гена из среднего значения Ct целевого гена, а затем рассчитывали значение $\Delta\Delta Ct$ вычитанием значений ΔCt контроля (без внесения в почву штаммов) из опыта (с внесением штаммов). Все образцы анализировали в трех повторностях, включая отрицательные контроли без матрицы и ревертазы.

В образцах почвы, отобранных из микрокосмов, определяли количество подвижных форм фосфора. Экстракцию фосфора проводили по методу Олсена [14], применимому для анализа как кислых, так и карбонатных почв. Для этого 1 г почвы инкубировали в 20 мл 0,5 М раствора гидрокарбоната натрия (рН 8,5) при комнатной температуре в течение 30 минут. Полученную суспензию обесцвечивали добавлением 0,5 г активированного угля и фильтровали через плотный фильтр. Фильтрат нейтрализовали 10%-ным раствором соляной кислоты. Количество свободных фосфатов в полученных образцах определяли колориметрически по методу Грейнера [15], основанному на способности неорганических фосфатов

в кислой среде образовывать с молибдатом аммония соединение желтого цвета – фосфорномолибденовокислый аммоний. Для проведения анализа в пробирки вносили 100 мкл фильтрата и добавляли 750 мкл свежеприготовленного реагента, состоящего из 10 мМ раствора гептамолибдата аммония, 5 М раствора серной кислоты и ацетона в соотношении 1:1:2. Затем в пробирки добавляли 50 мкл 1 М раствора лимонной кислоты. Оптическую плотность образцов измеряли на спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США) при длине волны 355 нм. Для определения содержания свободных фосфатов строили градуировочный график на основе 9 мМ раствора дигидрофосфата калия различных концентраций. Уровень pH в образцах почвы, отобранных из микрокосмов, определяли следующим образом: к навеске почвы в стеклянной колбе добавляли воду в соотношении 1:2,5 и перемешивали в течение 10 минут. Измерение pH в полученной суспензии проводили с помощью pH-метра (Mettler Toledo, Швейцария).

Оценивали жизнеспособность штаммов *P. brenneri* в микрокосмах в динамике методом почвенных разведений. Для этого из микрокосмов на 0, 5, 10 и 15 суток инкубации отбирали 1 г почвы, которую разводили в 99 мл стерильной водопроводной воды. Полученную почвенную суспензию разводили серийно и высевали поверхностным методом на плотную питательную среду Лурия-Бертани (LB) (триптон – 10 г/л, хлорид натрия – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, агар микробиологический – 15 г/л). Чашки Петри с посевами инкубировали при +30 °C в течение 24 ч. Для визуализации колоний использовали штаммы *P. brenneri*, экспрессирующие зеленый

флуоресцентный белок (GFP) под контролем плазмиды pFPV25.1_mut3. Среднее количество КОЕ (N) в 1 г почвенной суспензии рассчитывали по формуле:

$$N = c / ((n_1 + 0,1 \times n_2) \times d),$$

где c – сумма подсчитанных колоний на всех чашках, n_1 – количество чашек первого разведения, n_2 – количество чашек второго разведения, d – коэффициент первого разведения, 0,1 – коэффициент, учитывающий кратность первого и второго разведения.

Эксперименты проводили в трех биологических и трех аналитических повторах. Достоверную разницу между группами анализировали с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия Тьюки. Уровень значимости составлял $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. На первом этапе исследований оценивали экспрессию вовлеченных в метаболизм фосфора генов *gdh* (глюкозодегидрогеназа) и *pho* (фосфатаза) у штаммов *P. brenneri* (3.2 и 3.5.2) в почвенных микрокосмах в динамике. Внесение суспензии исследуемых бактерий как в нестерильную, так и в стерильную почву приводило к увеличению экспрессии целевых генов. При этом к 15-м суткам инкубации наблюдали снижение уровня экспрессии, по сравнению с началом эксперимента, как гена *gdh* (в среднем в 1,3...2,1 раза), так и гена *pho* (в среднем в 1,3...1,6 раза), в зависимости от варианта почвы и используемого штамма (рис. 1). Такое снижение может быть обусловлено уменьшением количества внесенных бактериальных клеток или снижением их метаболической активности в ходе эксперимента, что согласуется с данными, представленными в ряде публикаций [11, 16].

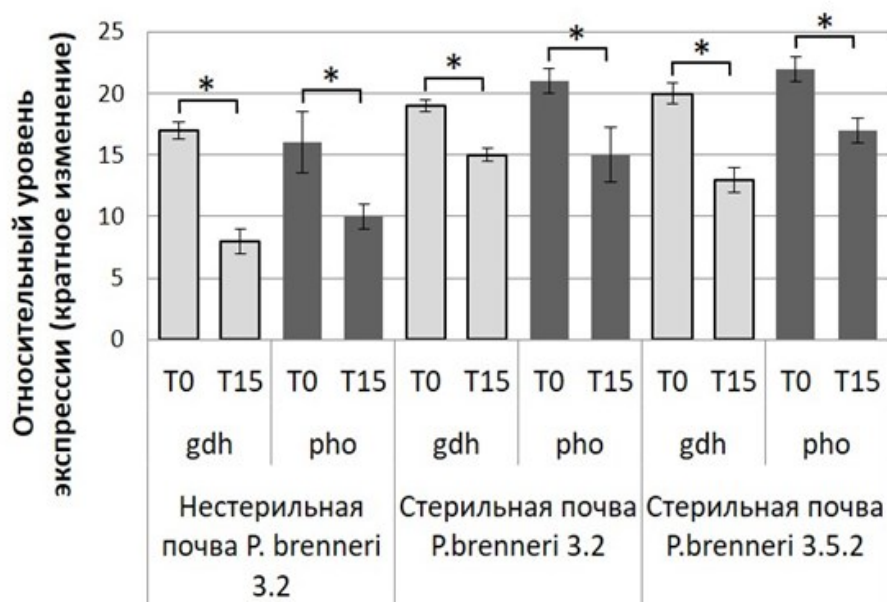


Рис. 1 – Изменение уровня экспрессии генов фосфатазы (*pho*) и глюкозодегидрогеназы (*gdh*) в нестерильной и стерильной почве, инокулированной штаммами *P. brenneri* 3.2 и *P. brenneri* 3.5.2, на начало (0 сут, T0) и конец (15 сут, T15) эксперимента (*различия внутри групп, обозначенных квадратной скобкой (экспрессия отдельных генов на 0 сут и 15 сут), достоверные при $p < 0,05$)

При этом на протяжении всего эксперимента экспрессия целевых генов в вариантах со стерильной почвой была выше, чем в вариантах с нестерильной почвой: в отношении гена *gdh* – в среднем в 1,2...1,9 раз, в отношении гена *pho* – в среднем в 1,3...1,7 раз в зависимости от времени инкубации и используемого штамма. Вероятно, в нестерильной почве процессы адаптации внесенных штаммов *P. brenneri* к новым условиям и конкуренция с нативной почвенной микрофлорой влияли на физиологические процессы в клетках, в том числе на мобилизацию фосфатов. Таким образом, результаты, полученные в ходе эксперимента со стерильной почвой, подтверждают, что наблюдаемое увеличение экспрессии генов *gdh* и *pho* напрямую связано с присутствием и активностью изучаемых штаммов *P. brenneri*

в почве.

Результаты измерения числа свободных фосфатов в образцах почвы показало, что на начальном этапе эксперимента существенных различий между вариантами с инокуляцией штаммами *P. brenneri* и контрольными образцами не наблюдали. Однако к концу эксперимента в вариантах с внесением штаммов *P. brenneri* наблюдали увеличение количества подвижного фосфора. Так, в стерильной почве концентрация биодоступного фосфора увеличилась на $27 \pm 1,4\%$ (штамм 3.2) и $22 \pm 1,2\%$ (штамм 3.5.2) по сравнению с контролем (без внесения штаммов). В нестерильной почве увеличение составило $15 \pm 0,8\%$ (штамм 3.2) и $18 \pm 0,7\%$ (штамм 3.5.2) по сравнению с контролем (рис. 2).

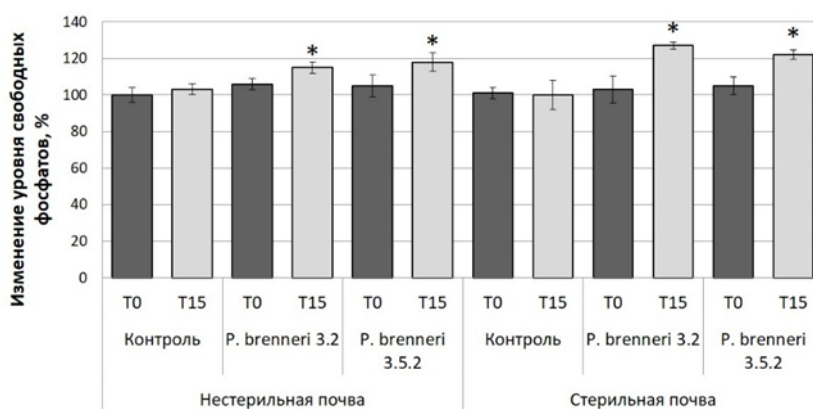


Рис. 2 – Изменение числа свободных фосфатов в нестерильной и стерильной почве, инокулированной штаммами *P. brenneri* 3.2 и *P. brenneri* 3.5.2, на начало (0 сут, T0) и конец (15 сут, T15) эксперимента. За 100% принимали число свободных фосфатов в контрольном (без внесения штаммов) варианте почвы на начало эксперимента (*различия с контролем достоверные при $p < 0,05$)

Все исследуемые штаммы *P. brenneri* обладали способностью подкислять почвенный раствор – уровень pH снижался со значений 6,6...6,7 ед. до pH 5,2...5,3 ед. Однако ранее в лабораторных условиях установлено, что изучаемые штаммы подкисляли среду культивирования с pH 7,0 до уровня pH 2,0...3,0, продуцируя при этом широкий спектр органических кислот [10]. Вероятно, снижение pH почвенного раствора представляет лишь один из механизмов процесса фосфатмобилизации у штаммов *P. brenneri* наряду с секрецией ферментов, в частности фосфатаз и фитаз.

Сохранение жизнеспособности микробных клеток – один из ключевых факторов в технологии разработки биопрепаратов. Штаммы *P. brenneri* сохраняли свою жизнеспособность в почвенных образцах в течение всего

эксперимента. При этом, на 5 сутки отмечали 6...8-кратное увеличение числа КОЕ/г почвы, по сравнению с начальной точкой (0 сутки), тогда как на 15 сутки число КОЕ/г почвы превышало исходную величину этого показателя в среднем в 3...4 раза (табл.). Способность бактериальных штаммов выживать в почве во многом зависит от их возможности конкурировать с адаптированной к условиям нативной микрофлорой почвы. Одной из стратегий для преодоления этих ограничений считают использование автохтонных микроорганизмов, адаптированных к климатическим условиям каждого региона [17, 18]. Поэтому, использование штаммов *P. brenneri*, ранее выделенных из почвы республики Татарстан, открывает перспективу их использования в регионе.

Таблица – Оценка жизнеспособности штаммов *P. brenneri* 3.2 и *P. brenneri* 3.5.2 в почве, КОЕ/г почвы

Штаммы	Время, сут			
	0	5	10	15
<i>P. brenneri</i> 3.2	$2,02 \times 10^6$	$1,22 \times 10^7$	$9,1 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$
<i>P. brenneri</i> 3.5.2	$1,7 \times 10^6$	$1,36 \times 10^7$	$9,3 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6$

Выводы. Повышение штаммами почвенных бактерий *P. brenneri* биодоступности почвенного фосфора указывает на их биотехнологический потенциал для использования в качестве биоудобрений.

Внесение суспензии штаммов бактерий *P. brenneri* (3.2 и 3.5.2) в почву стимулировало экспрессию генов *gdh* и *pho*, участвующих в метаболизме фосфора. В зависимости от варианта почвы и штамма уровень экспрессии *gdh* к 15-м суткам инкубации снижался в среднем в 1,3...2,1 раза, *pho* – в 1,3...1,6 раза. В стерильной почве она была выше, чем в нестерильной, в среднем в 1,2...1,9 и 1,3...1,7 раза соответственно.

Внесение в почву суспензии штаммов *P. brenneri* увеличивало концентрацию биодоступного фосфора в почвенном растворе

к 15-м суткам эксперимента. В стерильной почве в варианте со штаммом 3.2 она возрастала, по сравнению с контролем, на $27 \pm 1,4\%$, со штаммом 3.5.2 – $22 \pm 1,2\%$, в нестерильной – соответственно на $15 \pm 0,8\%$ и $18 \pm 0,7\%$.

Одновременно штаммы *P. brenneri* подкисляли почвенный раствор, снижая pH с 6,6...6,7 ед. до 5,2...5,3 ед. и сохраняли жизнеспособность в почвенных образцах на протяжении всего эксперимента.

В связи с изложенным, изученные штаммы *P. brenneri* можно считать перспективными для создания биопрепаратов, повышающих содержание биодоступного фосфора в почве.

Сведение об источнике финансирования. Работа выполнена за счет средств гранта РНФ №23-76-01078.

Литература

1. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake / P. Rawat, S. Das, D. Shankhdhar, et al. // Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 2020. Vol. 21. P. 49–68. doi: 10.1007/s42729-020-00342-7.
2. Timofeeva A., Galyamova M., Sedykh S. Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture // Plants. 2022. Vol. 11. No. 16. Article 2119. URL: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/16/2119> (дата обращения: 4.05.2025). doi: 10.3390/plants11162119.
3. Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle / J. Tian, F. Ge, D. Zhang, et al. // Biology. 2021. Vol. 10. No. 2. Article 158. URL: <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/2/158> (дата обращения: 4.05.2025). doi: 10.3390/biology10020158.
4. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils / S. B. Sharma, R. Sayyed, M. H. Trivedi, et al. // SpringerPlus. 2013. Vol. 2. No. 1. Article 587. URL: <https://link.springer.com/article/10.1186/2193-1801-2-587> (дата обращения: 4.05.2025). doi: 10.1186/2193-1801-2-587.
5. Bhatia S., Sharma D. Biodesulfurization of dibenzothiophene, its alkylated derivatives and crude oil by a newly isolated strain *Pantoea agglomerans* D23W3 // Biochem. Eng. J. 2010. Vol. 50. No. 3. P. 104–109. doi: 10.1016/j.bej.2010.04.001.
6. Walteson A. M., Stavrinos J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae // FEMS Microbiol. Rev. 2015. Vol. 39. No. 6. P. 968–984. doi: 10.1093/femsre/fuv027.
7. Chen Q., Liu S. Identification and characterization of the phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea* sp. S32 in reclamation soil in Shanxi, China // Frontiers in Microbiology. 2019. Vol. 10. Article 2171. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.02171/full> (дата обращения: 4.05.2025). doi: 10.3389/fmicb.2019.02171.
8. Иткина Д. Л., Сулейманова А. Д., Шарипова М. Р. *Pantoea brenneri* AS3 и *Bacillus ginsengihumi* M2.11 как потенциальные агенты биоконтроля и стимуляторы роста растений // Микробиология. 2021. Т. 90. № 2. С. 204–214. doi: 10.31857/S0026365621020063.
9. Антагонистические штаммы *Pantoea brenneri* как средства защиты растений / Д. С. Бульмакова, Г. И. Шагиева, Д. Л. Иткина и др. // Микология и фитопатология. 2023. Т. 57. № 5. С. 352–361. doi: 10.31857/S0026364823050033.
10. Phosphate solubilization and plant growth promotion by *Pantoea brenneri* soil isolates / A. Suleimanova, D. Bulmakova, L. Sokolnikova, et al. // Microorganisms. 2023. Vol. 11. No. 5. Article 1136. URL: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/5/1136> (дата обращения: 4.05.2025). doi: 10.3390/microorganisms11051136.
11. The impact of the inoculation of phosphate-solubilizing bacteria *Pantoea agglomerans* on phosphorus availability and bacterial community dynamics of a semi-arid soil / I. Saadouli, A. Mosbah, R. Ferjani, et al. // Microorganisms. 2021. Vol. 9. No. 8. Article 1661. URL: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/8/1661> (дата обращения: 4.05.2025). doi: 10.3390/microorganisms9081661.
12. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1 / A. D. Suleimanova, A. Beinhauer, L. R. Valeeva, et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2015. Vol. 81. No. 19. P. 6790–6799. doi: 10.1128/AEM.01384-15.
13. Идентификация фитат-гидролизующих ризобактерий рода *Pantoea* на основе фенотипических признаков и мультислоевого анализа / А. Д. Сулейманова, Д. Л. Иткина, Д. С. Пудова и др. // Микробиология. 2021. Т. 90. № 1. С. 87–95. doi: 10.1134/S0026261721010112.
14. Olsen S. R. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Washington, D.C.: U.S. Dept. of Agriculture, 1954. 19 p.
15. Greiner R., Konietzny U., Jany K. D. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli* // Arch. Biochem. Biophys. 1993. Vol. 303. No. 1. P. 107–113. doi: 10.1006/abbi.1993.1261.
16. Strigul N. S., Kravchenko L. V. Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere // Environ. Model. Softw. 2006. Vol. 21. No. 8. P. 1158–1171. doi: 10.1016/j.envsoft.2005.06.003.
17. Formulation of a highly effective inoculant for common bean based on an autochthonous elite strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli, and genomic-based insights into its agronomic performance / R. Pastor-Bueis, C. Sanchez-Cañizares, E. K. James, et al. // Frontiers in Microbiology. 2019. Vol. 10. Article 2724. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.02724/full> (дата обращения: 4.05.2025).

doi: 10.3389/fmicb.2019.02724.

18. Tina W., Walde-Meskel E., Wallet F. Symbiotic efficiency of native and exotic rhizobium strains nodulating lentil (*Lens culinaris* Medik.) in soils of southern Ethiopia // *Agronomy*. 2016. Vol. 6. No. 1. Article 11. URL: <https://www.mdpi.com/2073-4395/6/1/11> (дата обращения: 4.05.2025). doi: 10.3390/agronomy6010011.

Сведения об авторах:

Булмакова Дарья Сергеевна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры микробиологии, e-mail: daria_bulmakova@mail.ru

Сокольников Лидия Владиславовна – лаборант научно-исследовательской лаборатории агробиотехнологии, e-mail: idasok00@mail.ru

Сулейманова Алия Дамировна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории агробиотехнологии, e-mail: aliya.kzn@gmail.com

Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, Россия

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF BACTERIAL STRAINS OF *PANTOEAE BRENNERI* TO INCREASE THE CONTENT OF BIOAVAILABLE FORMS OF PHOSPHORUS IN SOIL
D. S. Bulmakova, L.V. Sokolnikova, A. D. Suleymanova

Abstract. The studies were conducted to determine the role of strains of soil bacteria *Pantoea brenneri* in increasing the bioavailability of soil phosphorus and to assess the biotechnological potential of the strains for use as biofertilizers. Soil microcosms were created in four variants: inoculated non-sterile soil (30 g + 5 ml of *P. brenneri* suspension, 1.5×10^8 CFU/ml); control with non-sterile soil (30 g + 5 ml of 0.9% NaCl); inoculated sterile soil (30 g + 5 ml *P. brenneri* suspension, 1.5×10^8 CFU/ml); control with sterile soil (30 g + 5 ml 0.9% NaCl). Microcosms were incubated for 15 days, samples were taken at the beginning and end of incubation. Phosphate mobilization of *P. brenneri* strains in soil is confirmed by an increase in the expression level of *gdh* (glucose dehydrogenase) and *pho* (phosphatase) genes, the products of which are involved in the solubilization and mineralization of hard-to-reach phosphorus compounds. Expression of the target genes in sterile soil was higher than in non-sterile soil, depending on the incubation time and strain used: for the *gdh* gene - on average by 1.2...1.9 times, for the *pho* gene - on average by 1.3...1.7 times. The introduction of the strain suspension into the soil contributed to an increase in the number of bioavailable forms of phosphorus in sterile soil by an average of 22...27%, in non-sterile soil - by 15...18%. *P. brenneri* strains remained viable in the soil throughout the experiment, which characterizes their ability to compete with native soil microflora. On the 5th day of incubation, a 6-8-fold increase in the number of CFU/g of soil was noted, compared with the initial point (day 0), and on the 15th day, the value of this indicator exceeded the initial value by an average of 3...4 times.

Key words: phosphate mobilization, mineralization, solubilization, biopreparations, *Pantoea brenneri*.

References

1. Rawat P, Das S, Shankhdhar D. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2020; Vol.21. 49-68 p. doi: 10.1007/s42729-020-00342-7.
2. Timofeeva A, Galyamova M, Sedykh S. Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture. [Internet]. *Plants*. 2022; Vol.11. No.16. Article 2119. [cited 2025, May 04]. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/16/2119>. doi: 10.3390/plants11162119.
3. Tian J, Ge F, Zhang D. Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. [Internet]. *Biology*. 2021; Vol.10. No. 2. Article 158. [cited 2025, May 04]. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/2/158>. doi: 10.3390/biology10020158.
4. Sharma SB, Sayyed R, Trivedi MH. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. [Internet]. *SpringerPlus*. 2013; Vol.2. No.1. Article 587. [cited 2025, May 04]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/2193-1801-2-587>. doi: 10.1186/2193-1801-2-587.
5. Bhatia S, Sharma D. Bidesulfurization of dibenzothiophene, its alkylated derivatives and crude oil by a newly isolated strain *Pantoea agglomerans* D23W3. *Biochem. Eng. J.* 2010; Vol.50. No.3. 104-109 p. doi: 10.1016/j.bej.2010.04.001.
6. Walterson AM, Stavrinos J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2015; Vol.39. No.6. 968-984 p. doi: 10.1093/femsre/fuv027.
7. Chen Q, Liu S. Identification and characterization of the phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea sp.* S32 in reclamation soil in Shanxi, China. [Internet]. *Frontiers in Microbiology*. 2019; Vol.10. Article 2171. [cited 2025, May 04]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.02171/full>. doi: 10.3389/fmicb.2019.02171.
8. Itkina DL, Suleymanova AD, Sharipova MR. [*Pantoea brenneri* AS3 and *Bacillus ginsengihumi* M2.11 as potential biocontrol agents and plant growth promoters]. *Микробиология*. 2021; Vol.90. 2. 204-214 p. doi: 10.31857/S0026365621020063.
9. Bulmakova DS, Shagieva GI, Itkina DL. [Antagonistic strains of *Pantoea brenneri* as plant protection products]. *Микробиология и фитопатология*. 2023; Vol.57. 5. 352-361 p. doi: 10.31857/S0026364823050033.
10. Suleymanova A, Bulmakova D, Sokolnikova L. Phosphate solubilization and plant growth promotion by *Pantoea brenneri* soil isolates. [Internet]. *Microorganisms*. 2023; Vol.11. No.5. Article 1136. [cited 2025, May 04]. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/5/1136>. doi: 10.3390/microorganisms11051136.
11. Saadoui I, Mosbah A, Ferjani R. The impact of the inoculation of phosphate-solubilizing bacteria *Pantoea agglomerans* on phosphorus availability and bacterial community dynamics of a semi-arid soil. [Internet]. *Microorganisms*. 2021; Vol.9. No.8. Article 1661. [cited 2025, May 04]. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/8/1661>. doi: 10.3390/microorganisms9081661.

12. Suleymanova AD, Beinhauer A, Valeeva LR. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1/t al. Appl. Environ. Microbiol. 2015; Vol.81. No.19. 6790-6799 p. doi: 10.1128/AEM.01384-15.
13. Suleymanova AD, Itkina DL, Pudova DS. [Identification of phytate-hydrolyzing rhizobacteria of *Pantoea* genus based on phenotypic traits and multilocus analysis]. Mikrobiologiya. 2021; Vol.90. 1. 87-95 p. doi: 10.1134/S0026261721010112.
14. Olsen SR. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Washington, D.C.: U.S. Dept. of Agriculture. 1954; 19 p.
15. Greiner R, Konietzny U, Jany KD. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys. 1993; Vol.303. No.1. 107-113 p. doi: 10.1006/abbi.1993.1261.
16. Strigul NS, Kravchenko LV. Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. Environ. Model. Softw. 2006; Vol.21. No.8. 1158-1171 p. doi: 10.1016/j.envsoft.2005.06.003.
17. Pastor-Bueis R, Sanchez-Canizares C, James EK. Formulation of a highly effective inoculant for common bean based on an autochthonous elite strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli, and genomic-based insights into its agronomic performance. [Internet]. Frontiers in Microbiology. 2019; Vol.10. Article 2724. [cited 2025, May 04]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.02724/full>. doi: 10.3389/fmicb.2019.02724.
18. Tina W, Walde-Meskel E, Wallet F. Symbiotic efficiency of native and exotic rhizobium strains nodulating lentil (*Lens culinaris* Medik.) in soils of southern Ethiopia. [Internet]. Agronomy. 2016; Vol.6. No.1. Article 11. [cited 2025, May 04]. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4395/6/1/11>. doi: 10.3390/agronomy6010011.

Authors:

Bulmakova Darya Sergeevna – Ph.D. of Biological Sciences, senior lecturer of Microbiology Department, e-mail: daria_bulmakova@mail.ru
 Sokolnikova Lidiya Vladislavovna – laboratory assistant of Research laboratory of Agrobioengineering, e-mail: lidasok00@mail.ru
 Suleymanova Aliya Damirovna – Ph.D. Of Biological Sciences, senior researcher of Research laboratory of Agrobioengineering, e-mail: aliya.kzn@gmail.com
 Institute of Fundamental Medicine and Biology of Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia.