

УДК 579.647

ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩИЕ СОЛЕТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ ДЛЯ КУЛЬТУРЫ СОИ**И.Э. Смирнова, А.К. Саданов, Г.Б. Баймаханова, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина**

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан

Введение

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является важной, широко выращиваемой бобовой культурой в мире, спрос на ее зерно ежегодно растет. В семенах сои содержится до 36 % белка и до 19 % масла. Поэтому, соя применяется в качестве пищи для человека, кормов для животных, масла и промышленных продуктов [1]. Изменения климата в следствие глобального потепления, приводит к увеличению испарения воды из почвы, дефициту пресной воды и использованию соленой воды для орошения, все эти процессы вызывают усиленное засоление почв [2–4]. Из-за засоленности почв происходит сокращение сельскохозяйственных угодий, пригодных для выращивания культур, в частности, сои [5]. Соя не солеустойчивая культура, засоленные почвы являются для нее сильным абиотическим стрессом, и выращивание культуры на таких почвах приводит к потере до 50 % ее урожайности. Рядом авторов показано, одной из причин снижения ее продуктивности на засоленных почвах, является уменьшение доступности одного из основных питательных элементов растений – фосфора [6–8]. Установлено, что на засоленных почвах гораздо быстрее появляются симптомы дефицита фосфора у растений (замедление роста, появление пурпурных оттенков на темно-зеленых листьях, прожилках и стеблях, преждевременное увядание листьев), чем на незасоленных почвах [9, 10]. Поэтому для снижения дефицита фосфора, на засоленных почвах вносят повышенные дозы фосфорных удобрений. Однако их высокая стоимость и угроза для окружающей среды (загрязнение воды, почвы и др.) мотивируют к поиску альтернативных путей, при которых естественные источники фосфора будут служить его резервуаром [11].

Альтернативой фосфорным удобрениям является использование фосфатмобилизующих микроорганизмов. Эти микроорганизмы, присутствуют в ризосфере растений и способны переводить нерастворимые фосфаты в доступную растениям форму, и тем самым, улучшать их фосфорное питание и способствовать росту [12]. Также, фосфор крайне важен для симбиотических азотфиксаторов сои – клубеньковых бактерий. При дефиците фосфора клубеньковые бактерии не могут образовывать клубеньки на корнях сои, активно фиксировать азот и снабжать биоазотом растения [13]. То есть, применение фосфатмобилизующих бактерий способствует улучшению не только фосфорного, но и азотного питания сои. Поэтому, поиск микробных инокулянтов для повышения доступности фосфора является весьма актуальным. Однако не все фосфатмобилизующие микроорганизмы могут активно расти и мобилизовать соединения фосфора на засоленных почвах. Большинство из них обладают низкой устойчивостью к засолению и не подходят в качестве инокулянтов для применения на засоленной почве [14].

Цель работы – выделение солетолерантных фосфатмобилизующих бактерий из ризосферы растений сои, растущих на засоленных почвах, изучение их солеустойчивости, способности к мобилизации фосфатов и влияния на рост сои на засоленных почвах. Применение солетолерантных фосфатмобилизующих бактерий является эффективной, экологически чистой и экономически выгодной заменой фосфорным удобрениям.

Материалы и методы

Ризосферную почву отбирали на расстоянии 5–8 см от корней растений сои сорта «Эврика», растущих на засоленном поле в Алматинской области Казахстана (№ 40°50.120; E 68°29.165, 265 м над уровнем моря) в фазу цветения сои. Тип почвы – серозем обыкновенный, общее содержание солей в водной вытяжке $1,051 \pm 0,06$ %, значение pH $9,3 \pm 0,02$, что свидетельствует о высокой засоленности почвы. Выделение фосфатмобилизующих бактерий проводили на селективной среде NBRIP [15] с добавлением 10 % NaCl.

Солеустойчивость бактерий определяли в жидкой среде с NBRIP, содержащей 100, 250 и 500 мМ NaCl. Бактерии выращивали 3 суток при 28 °C и 180 об/мин. Рост бактерий определяли на спектрофотометре (PD-303, “Apeel”, Japan) при 540 нм. Оценку роста бактерий проводили по шкале, где – отсутствие роста, + наличие роста, добавление + указывает на интенсивность роста. Исследование проводили в пятикратной повторности.

Идентификацию бактерий проводили молекулярно-генетическим методом Сенгера, путем секвенирования 16S rRNA гена и сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S rRNA со штаммами из базы данных GenBank NCBI.

Для изучения влияния фосфатмобилизующих бактерий на рост сои в условиях засоления почвы, семена сои были стерилизованы 1 % раствором гипохлорита натрия (об./об.) в течение 5 мин и 70 % раствором этанола (об./об.) погружением на 1 мин. Затем семена ополаскивали стерильной водой 5–7 раз [16]. Стерилизованные семена были инокулированы суспензией бактерий с титром 1×10^8 КОЕ/мл в течение 2 часов при температуре 23° С, из расчета 5 мл суспензии на 1 г семян. Далее семена были посеяны в сосуды на 5000 мл с засоленной почвой по 3 растений на сосуд. Тип почвы – серозем обыкновенный, содержание гумуса 0,86 %, легкогидролизуемого азота – 58,6 мг/кг, подвижного фосфора – 24,8 мг/кг и подвижного калия – 468,7 мг/кг. Общее содержание солей 1,058 %, значение pH 9,2. Через 3 месяца растения убирали, подсчитывали количество клубеньков, высушивали клубеньки, корни, стебли и литья до постоянного веса и определяли их сухую массу. Опыты проводили в климатической камере (Memmert HPP 750 Constant Climate Chamber, Германия). Световой день – 9 ч, температура 25 °С, освещенность: холодный белый свет – 6500 К, теплый свет 2700 К; ночной режим – 15 ч; температура 18 °С, влажность – 68 %. Исследования проводили в пятикратной повторности.

Статистическую значимость полученных результатов анализировали с использованием пакета программ STATISTICA 10.0, ver. 6.0 [17]. Различия считались значимыми при $p < 0,05$, а значения представлены как среднее значение (M) ± стандартное отклонение (±SEM) [18].

Результаты и обсуждение

Для выделения фосфатмобилизующих солеустойчивых бактерий из ризосферы здоровых растений сои, растущих на засоленных почвах, было собрано 56 образцов почв. При высеве на среду NBRIP, содержащую трикальцийфосфат и 10 % NaCl, были отобраны колонии, демонстрирующие четкие зоны мобилизации фосфатов (зоны гало). В результате проведенной работы было выделено 32 изолята солеустойчивых фосфатмобилизующих бактерий. Первичный скрининг бактерий по признаку солеустойчивости позволил отобрать 12 изолятов, которые образовывали наибольшую зону мобилизации фосфатов за меньший промежуток времени.

Далее провели исследование устойчивости изолятов к солевому стрессу при разных концентрациях NaCl (100, 250 и 500 mM) в среде культивирования бактерий. В таблице 1 приведены данные 12 наиболее солеустойчивых изолятов.

Таблица 1 – Изучение солеустойчивости фосфатмобилизующих бактерий

Изоляты	Концентрация NaCl, mM		
	100	250	500
ФТ-1	++	+	-
ФТ-2	++++	+++	++
ФТ-15	++	+	-
ФТ-4	+++	+++	++
ФМ-9	++++	+++	++
ФМ-12	++++	+++	+++
ФЛ-27	++	+	-
ФУ-36	+++	+	-
ФС-11	++++	+++	+++
ФТ-34	++	+	-
ФМ-22	+++	+	-
ФМ-19	+++	+	-

Примечание: – указывает на отсутствие роста; + указывает на наличие роста; дополнительный + указывает на интенсивность роста

Из данных таблицы 1 следует, что не все выделенные изоляты обладали высокой солеустойчивостью. Так, если при концентрации NaCl в среде 100 mM росли все изоляты, то при концентрации 500 mM NaCl только пять ФТ-2, ФТ-4, ФМ-9, ФМ-12, ФС-11. Эти пять изолятов были отобраны для дальнейшей работы как наиболее солеустойчивые.

Изучение фосфатмобилизующей способности отобранных изолятов при солевом стрессе различной степени проводили на среде NBRIP с разными концентрациями NaCl 100, 250 и 500 mM. В качестве контроля использовали среду без добавления NaCl (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние солевого стресса на фосфатмобилизующую активность бактерий

Изоляты	Концентрация NaCl, mM			
	0	100	250	500
	Диаметр зоны мобилизации фосфатов, мм			
ФТ-2	32,6±0,2	31,4±0,3	21,9±0,1	15,8±0,2
ФТ-4	37,4±0,1	33,4±0,2	28,4±0,3	26,9±0,1
ФМ-9	32,9±0,4	28,9±0,1	22,9±0,1	15,9±0,1
ФМ-12	36,2±0,2	30,2±0,4	26,8±0,2	24,8±0,1
ФС-11	36,2±0,2	32,5±0,2	27,7±0,2	25,7±0,2

Примечание: $p < 0,05$; $n=5$

Из данных таблицы 2 следует, что бактерии обладали способностью к мобилизации фосфатов в условиях солевого стресса. При концентрации соли в среде 100 mM все изоляты характеризовались высокой мобилизацией фосфатов, зоны растворения фосфатов составляли 28,9–33,4 мм. Установлено, что с увеличением концентрации активность сольобилизации снижалась. Так, при высоком солевом стрессе (500 mM NaCl) у двух изолятов ФТ-2, ФМ-9 потенциал сольобилизации фосфатов снизился значительно на 52–53 % по сравнению с контролем (без внесения NaCl). Однако у изолятов ФТ-4, ФМ-12 и ФС-11 солевой стресс не оказывал такого сильного воздействия и активность мобилизации снизилась при этой же концентрации NaCl в среде всего на 28–30 %. Эти штаммы были отобраны как лучшие.

Проведена идентификация изолятов ФТ-4, ФМ-12, ФС-11 молекулярно-генетическим методом Сенгера. Показано, что фосфатмобилизующие солеустойчивые бактерии принадлежат к родам *Pseudomonas* и *Bacillus*, штамм ФТ-4 относится к *Pseudomonas koreensis*, а штаммы ФМ-12 и ФС-11 – к *Bacillus pumilus* ФМ-12 и *Bacillus sp.* ФС-11.

Исследование влияния инокуляции фосфатмобилизующими солетолерантными бактериями на рост сои и образование клубеньков в условиях солевого стресса проводили на сильнозасоленной почве. Для инокуляции семян использовали штаммы ФТ-4, ФМ-12 и ФС-11, контролем служили семена без инокуляции. Полученные результаты представлены в рисунке 1.

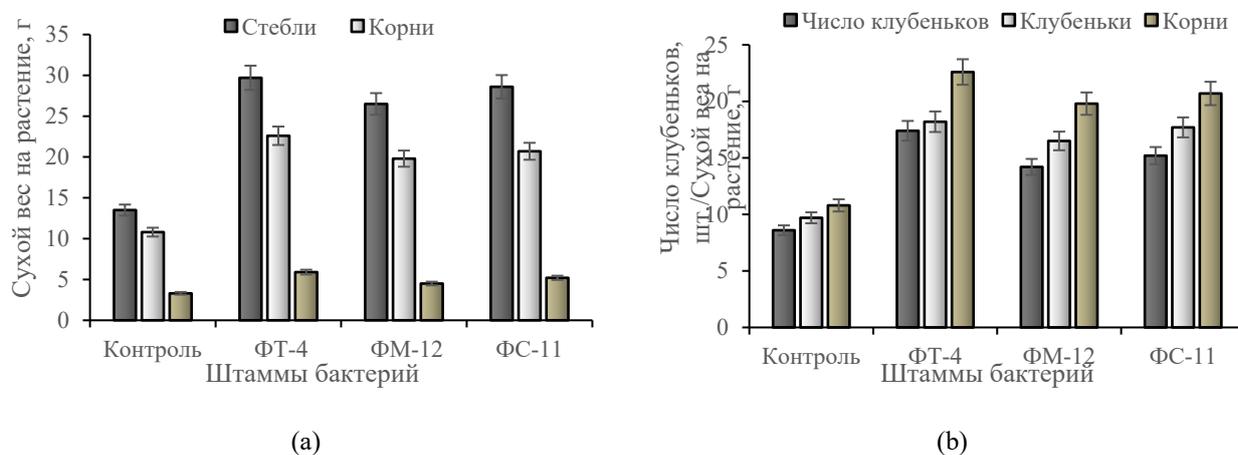


Рис. 1. Влияние инокуляции бактериями на стебли, корни и листья (а), число и вес клубеньков (б) при росте сои на сильнозасоленной почве ($p < 0,05$; $n=5$).

Из данных рисунка 1 следует, что инокуляция солетолерантными фосфатмобилизующими бактериями существенно смягчала солевой стресс растений сои. Показано, что ростовые параметры инокулированной сои при выращивании на сильнозасоленной почве значительно увеличились по сравнению с контролем (без инокуляции). Так, сухой вес стеблей сои увеличился в 2,0–2,2 раза, листьев в 2,5–3,5 раза, а число клубеньков на одно растение увеличилось в среднем 1,7–2,0 раза на одно растение (рисунок 1а). Также, установлено, что сухая масса корней и самих клубеньков существенно повысилась по сравнению с контролем, корней в 1,9–2,1 раза и клубеньков в 1,7–1,9 раза (рисунок 1б). Наибольший положительный эффект на растения сои оказала инокуляция штаммом *Ps. koreensis* FT4.

В этом варианте отмечали самое большое количество клубеньков на одно растение – 17,4 штук, в контроле этот показатель составлял всего 8,6 клубеньков на растение.

Заключение

Таким образом, показано, что инокуляция семян сои фосфатмобилизирующими солетолерантными бактериями смягчает солевой стресс, улучшает рост растений сои и способствуют экологической адаптации сои к засолению. Стимуляция роста у инокулированных растений, подтверждается увеличением числа клубеньков, сухого веса стеблей, корней и листьев растений сои. Наши результаты показали, что выделенные бактерии обладают большим потенциалом для поддержания растений сои в стрессовых условиях на засоленных почвах. После оценки штаммов в полевых условиях, бактерии могут быть использованы в коммерческих целях для частичной или полной замены дорогостоящих фосфорных удобрений. Дальнейшие исследования фосфатмобилизирующих солетолерантных культур представляются очень интересными и важными.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант AP09259080).

Литература

1. Hlangumaran G., Schwinghamer T.D., Smith D.L. Rhizobacteria from root nodules of an indigenous legume enhance salinity stress tolerance in soybean // *Frontiers in Sustainable Food Systems*. – 2021. – Vol. 4. – e617978. DOI: 10.3389/fsufs.2020.617978.
2. Ullah A. et al. 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. – e618092. DOI: 10.3389/fsufs.2021.618092.
3. Mohanavelu A., et al. Irrigation Induced Salinity and Sodicity Hazards on Soil and Groundwater: An Overview of Its Causes, Impacts and Mitigation Strategies // *Agriculture*. – 2021. – Vol. 11. – P. 983. <https://doi.org/10.3390/agriculture11100983>.
4. Singh A. Soil salinity: A global threat to sustainable development // *Soil Use and Management*. – 2021. – Vol. 38(3). – P. 39–67. doi:10.1111/sum.12772.
5. Dewi E.S., Abdulai I., Bracho-Mujica G., Rötter R.P. Salinity Constraints for Small-Scale Agriculture and Impact on Adaptation in North Aceh, Indonesia // *Agronomy*. – 2022. – Vol. 12(2). – P. 341. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020341>.
6. Dey G. et al. Management of Phosphorus in salinity-stressed agriculture for sustainable crop production by salt-tolerant phosphate-solubilizing bacteria // *Agronomy*. – 2021. – Vol. 11. – P. 1552. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081552>.
7. Xie W., Yang J., Gao S., Yao R., Wang X. The Effect and Influence Mechanism of Soil Salinity on Phosphorus Availability in Coastal Salt-Affected Soils // *Water*. – 2022. – Vol. 14. – P. 2804. <https://doi.org/10.3390/w14182804>.
8. Penn C.J., Camberato J.J. A Critical Review on Soil Chemical Processes that Control How Soil pH Affects Phosphorus Availability to Plants // *Agriculture*. – 2019. – Vol. 9(6). – P. 120. <https://doi.org/10.3390/agriculture9060120>.
9. Tang H. et al. Phosphorus Limitation Improved Salt Tolerance in Maize Through Tissue Mass Density Increase, Osmolytes Accumulation, and Na⁺ Uptake Inhibition // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 10. – P. 856. doi: 10.3389/fpls.2019.00856.
10. Isidra-Arellano M.C. et al. Phosphate Deficiency Negatively Affects Early Steps of the Symbiosis between Common Bean and Rhizobia // *Genes (Basel)*. – 2018. – Vol. 9(10). – P. 498. doi: 10.3390/genes9100498.
11. Ali W., Nadeem M., Ashiq W. The effects of organic and inorganic phosphorus amendments on the biochemical attributes and active microbial population of agriculture podzols following silage corn cultivation in boreal climate // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – e7297. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53906-8>.
12. Timofeeva A., Galyamova M., Sedykh S. Prospects for Using Phosphate-Solubilizing Microorganisms as Natural Fertilizers in Agriculture // *Plants*. – 2022. – Vol. 11. – P. 2119. <https://doi.org/10.3390/plants11162119>.
13. Li H., Wang X., Liang Q., Lyu X. et al. Regulation of Phosphorus Supply on Nodulation and Nitrogen Fixation in Soybean Plants with Dual-Root Systems // *Agronomy*. – 2021. – Vol. 11. – P. 2354. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112354>.
14. 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. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00545-7>.
15. Mohamed A.E. Isolation and selection of highly effective phosphate solubilizing bacterial strains to promote wheat growth in Egyptian calcareous soils // *Bulletin of the National Research Centre*. – 2019. – Vol. 43(1). P. 203. DOI:10.1186/s42269-019-0212-9.
16. Lindsey B.E. 3rd, Rivero L., Calhoun C.S., Grotewold E., Brkljacic J. Standardized Method for High-throughput Sterilization of Arabidopsis Seeds // *Journal of Visualized Experiments*. – 2017. – Vol. 128. – e56587. doi: 10.3791/56587.
17. Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA 10.0, ver. 6. – М.: Горячая линия-Телеком, 2016. – 288 с.
18. Gomez-de-Mariscal E. et al. Use of the p-values as a size-dependent function to address practical differences when analyzing large datasets // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – e20942. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00199-5>.