



ВКЛАД СЕКРЕТИРУЕМЫХ ФОСФАТАЗ В МОБИЛИЗАЦИЮ ПОЧВЕННЫХ ФОСФАТОВ ШТАММАМИ *PANTOEA BRENNERI*

Сокольникова Л.В., Бульмакова Д.С., Невзорова Ю.В., *Сулейманова А.Д.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Россия, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

*E-mail: aliya.kzn@gmail.com

Резюме

Представители рода *Pantoea* положительно влияют на рост и развитие растений. В геноме штамма *P. brenneri* 3.5.2 выявлены гены и генетические кластеры, отвечающие за их множественные PGP-свойства, подтвержденные ранее биохимическими и микробиологическими методами. Штаммы способны к гидролизу почвенных фитатов, а также проявляют активность в отношении неорганических почвенных фосфатов: гидроксиапатита, фосфорита и трикальцийфосфата. Обнаружены гены *gcd* и *pqqE*, отвечающие за продукцию глюконовой кислоты, участвующей в процессах мобилизации фосфора. При росте на средах с различными источниками недоступного фосфора штаммы *P. brenneri* были способны к секреции кислой и щелочной фосфатаз, активность которых зависела от времени культивирования бактерий и источника фосфата в среде.

Ключевые слова: *Pantoea brenneri*, мобилизация фосфатов, кислая фосфатаза, щелочная фосфатаза, фосфатмобилизующие бактерии

Цитирование: Сокольникова Л.В., Бульмакова Д.С., Невзорова Ю.В., Сулейманова А.Д. Вклад секретиремых фосфатаз в мобилизацию почвенных фосфатов штаммами *Pantoea brenneri* // *Biomics*. 2022. Т.14(3). С. 209-214. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-15

© Авторы

ROLE OF PHOSPHATASE ENZYMES IN SOIL PHOSPHORUS MOBILIZATION BY *PANTOEA BRENNERI* STRAINS

Sokolnikova L.V., Bulmakova D.S., Nevzorova J.V., *Suleimanova A.D.

Kazan (Privolzhsky) Federal University, 18 Kremlevskaya str., Kazan, 420008, Russia

*E-mail: aliya.kzn@gmail.com

Resume

Bacteria of the *Pantoea* genus have a positive effect on the growth and development of plants. In the genome of the *P. brenneri* strain 3.5.2 we identified genes and genetic clusters associated with their multiple PGP-properties, previously confirmed by biochemical and microbiological methods. The strains are capable of hydrolyzing soil phytates and are active against inorganic soil phosphates: hydroxyapatite, phosphorite, and tricalcium phosphate. The *gcd* and *pqqE* genes responsible for the production of gluconic acid involved in the processes of phosphorus mobilization were identified. When grown on media with various sources of unavailable phosphorus, *P. brenneri* strains were able to secrete acid and alkaline phosphatases, the activity of which depended on the time of bacterial cultivation and the source of phosphate in the medium.

Keywords: *Pantoea brenneri*, phosphates mobilization, acid phosphatase, alkaline phosphatase, phosphate-solubilizing bacteria

Citation: Sokolnikova L.V., Bulmakova D.S., Nevzorova J.V., Suleimanova A.D. Role of phosphatase enzymes in soil phosphorus mobilization by *Pantoea brenneri* strains. *Biomics*. 2022. T.14(3). С. 209-214. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-15 (In Russian)

© Authors

Введение

Урожайность сельскохозяйственных культур главным образом ограничивается истощением почв и действием патогенных микроорганизмов [Vasseur-Coronado et al., 2021]. Фосфор (P) - один из наиболее ограничивающих рост, развитие и продуктивность растений макроэлементов, дефицит которого является актуальной проблемой агропроизводства во всем мире [Alogi et al., 2017; Zhu et al., 2018]. Несмотря на то, что общее содержания фосфора в почве, как правило, высокое, более 80% от всего объема представлено в труднодоступной для растений форме, что связано с фиксацией, адсорбцией и осаждением данного элемента. Для обеспечения потребностей растений в фосфоре в почву в значительных объемах вносят минеральные удобрения, большая часть которых переходит в недоступное для поглощения растениями состояние. Кроме того, известно, что имеющиеся природные запасы апатитов, используемых для производства фосфорных удобрений, будут исчерпаны в ближайшие 50-100 лет [Tian et al., 2021]. Одним из перспективных подходов к решению данной проблемы является внедрение в сельское хозяйство биоудобрений на основе микроорганизмов, мобилизующих почвенные фосфаты [Alogi et al., 2017].

Известно, что виды *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* и *Sphingomonas* улучшают продуктивность и здоровье растений с помощью таких механизмов, как синтез фитогормонов, аминокислот, азотфиксация (АЦК-дезаминазы), органических кислот, экзополисахаридов и различных летучих соединений, солубилизация и мобилизация фосфора и калия, азотфиксация и секвестрация железа сидерофорами, подавление патогенной микрофлоры посредством продукции антибиотиков и ферментов, индуцированной системной резистентности и подавления кворум-сенсинга [Chen et al., 2017; Olanrewaju et al., 2017; Sorty et al., 2016].

В естественных почвенных условиях основными формами фосфора выступают минеральные и органические соединения. В минеральной форме фосфор представлен в виде первичных минералов – апатитов, гидроксиапатитов и оксиапатитов, которые не доступны для усвоения растениями. Помимо минералов, фосфор в почве представлен в виде труднодоступных неорганических соединений – фосфатов кальция, алюминия и железа [Kumar, Shastri, 2017]. Органический фосфор составляет значительную долю (30–80%) общего пула почвенных фосфатов. Такие соединения входят в

состав гумуса и представляют собой разлагающиеся остатки животных, растений и микроорганизмов [Kalayu, 2019]. Повсеместное применение пестицидов, пластификаторов, пеногасителей, антипиренов приводит к дополнительному увеличению содержания органического фосфора в почве [Tian et al., 2021]. Однако органическая форма также не может служить непосредственным источником фосфора для растений, требуя предварительного высвобождения (минерализации) фосфат-ионов из органических соединений [Sabugao et al., 2017]. Растения обладают способностью к частичному высвобождению свободных фосфатов из фосфорорганических соединений, однако, полностью удовлетворить свои потребности в данном элементе не способны. Фосфатмобилизующие бактерии вносят вклад в круговорот фосфора в почве, способствуя высвобождению свободных фосфатов для питания растений из труднорастворимых форм. Однако потенциальные пути микробной минерализации фосфора все еще плохо изучены. Целью данного исследования явилась оценка вклада секретируемых фосфатаз в процесс фосфат-мобилизации штаммами *Pantoea brenneri*.

Материалы и методы

Объект исследования. В работе использовали бактериальные штаммы *P. brenneri* - 3.1, 3.2, 3.5.2, 3.6.1, выделенные ранее из проб почвы Республики Татарстан [Suleimanova et al., 2015].

Питательные среды и условия культивирования. Культивирование микроорганизмов проводили на среде LB (Лурия-Бертани) [Sambrook et al., 1989] (%): триптон – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; NaCl – 0.5; pH 8.5.

Для измерения активности фосфатаз бактериальные культуры выращивали на среде NBRIP [Xiao et al., 2008] (г/л): глюкоза – 10; источник фосфора – 5; MgCl₂ – 5; MgSO₄*7H₂O – 0.25; KCl – 0.2; (NH₄)₂SO₄ – 0.1; pH 7.0. В качестве единственного источника фосфора использовали трикальцийфосфат (Ca₃(PO₄)₂), фосфорит и гидроксиапатит в концентрации 5 г/л. Среды стерилизовали при 0.7 атм и 115°C в течение 30 мин. Бактерии засеивали добавлением 150 мкл (1.5%) ночной культуры в 10 мл NBRIP. Культивирование бактерий осуществляли на лабораторных качалках с интенсивностью качания 220 об/мин, при температуре 30°C и при соотношении объема среды к объему колбы 1:5.

Фосфатазная активность. Активность кислой и щелочной фосфатаз определяли по гидролизу субстрата пара-нитрофенилфосфата (pNPP) при оптимальных значениях pH 6.5 и 11.0, соответственно [Tabatabai, Bremner, 1969]. Культуры выращивали в течение семи дней на среде NBRIP с различными

источниками фосфора. Каждые 24 часа отбирали по 500 мкл образца культуральной жидкости и осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 10000 об/мин. Полученный супернатант использовали для измерения ферментативной активности фосфатазы.

Необходимый для работы ферментов pH поддерживался с помощью универсального модифицированного буфера (**modified universal buffer**, MUB), для приготовления которого использовали Tris – 3.025 г; малеиновая кислота – 2.9 г; лимонная кислота – 3.5 г; борная кислота – 1.57 г; 1M NaOH – 122 мл. Дистиллированной водой доводили объем до 250 мл. Из стокового раствора отбирали 50 мл буфера, доводили pH до необходимых значений (pH 6.5 и pH 11.0 для измерения активности кислой и щелочной фосфатазы, соответственно) и далее снова доводили водой до объема 250 мл.

Реакционная смесь опытной пробы содержала 10 мкл супернатанта, 200 мкл MUB, содержащего 5 мМрNPP. Смесь инкубировали при 37°C в течение 10 мин. В контрольную пробу, содержащую 200 мкл MUB-буфера с 5 мМ рNPP, супернатант вносили после инкубации при 37°C. Реакцию останавливали путем добавления 1 мл 1M NaOH. Измерения оптической плотности опытной и контрольной проб проводили на спектрофотометре xMark™ (Bio-Rad, США), при длине волны 405 нм. За единицу активности принимали то количество фермента, которое расщепляло рNPP с образованием 1 мкМ неорганического фосфата за одну минуту. Расчет проводили по формуле:

$$\text{Активность (ед/мл)} = \frac{\Delta(OD_a - OD_k)}{t} \cdot \frac{1}{d \cdot \varepsilon},$$

где OD_a - показания спектрофотометра при измерении опытного образца, OD_k - показания спектрофотометра при измерении контроля, t - время инкубации (мин), d – 1 см кювета, ε - коэффициент экстинкции субстрата пара-нирофенилфосфата (18.2 см²/мкМ).

Скрининг генов, ассоциированных с мобилизацией фосфора. Выделение геномной ДНК. Выделение геномной ДНК бактерий проводили методом фенол-хлороформной экстракции. В работе использовали лизирующий буфер СТАВ (500мл): 2% СТАВ - 10.0 г; 1.4 M NaCl - 40.91 г; 200 мМ ЭДТА (20 мл 0.5 M ЭДТА); 100 мМ Tris-HCl pH 8 (50 мл 1M Tris-HCl) [Li et al., 2007].

Ночную культуру *P. brenneri* отбирали в эппендорфы объемом 2 мл. Клетки осаждали центрифугированием при 1000 тыс. об/мин в течение

5 минут. Надосадочную жидкость сливали, к оставшемуся осадку добавляли 500 мкл СТАВ-буфера и 350 мкл фенола. После перемешивания эппендорфы оставляли на 10 минут при температуре -80°C, затем в течение 10 минут инкубировали при температуре 65°C с использованием термостата “Гном” (ДНК-Технология, Россия). Добавляли 700 мкл хлороформа и центрифугировали при 14 тыс. об/мин в течение 5 минут. Верхнюю фазу переносили в новый эппендорф и добавляли изопропанол в соотношении 1:1. Далее центрифугировали при 14 тыс. об/мин в течение 5 минут и сливали супернатант. К осадку добавляли 100-200 мкл 70%-ного этанола и снова центрифугировали. Этанол сливали, эппендорфы с ДНК высушивали при комнатной температуре. Далее ДНК ресуспендировали в 50 мкл безнуклеазной (nuclease-free) воды с добавлением 0.25 мкл РНКазы А (Thermo Scientific, США) для удаления РНК.

Полимеразная цепная реакция. Для выявления наличия исследуемых генов в геноме *P. brenneri* использовали полимеразную цепную реакцию. Для амплификации генов использовали консервативные и дегенеративные праймеры, специфичные к их участкам (таблица 1) [Han et al., 2008; Chen et al., 2015; Perez et al., 2007; Sakurai et al., 2008; Fraser et al., 2017].

Для проведения ПЦР использовали прибор MJ MiniGradient Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Условия реакции соответствовали протоколу для DreamTaq DNA полимеразы (ThermoScientific, США): предварительный нагрев при температуре 95°C в течение 3 мин; денатурация цепи при температуре 95°C в течение 30 сек, отжиг праймеров в течение 30 сек, элонгация цепи при 72°C в течение 1-1.5 мин; реакция проводилась 30 циклов; окончательный синтез цепи при температуре 72°C в течение 5 мин. Температура отжига специфична для каждого праймера.

Амплифицированные продукты анализировали методом горизонтального электрофореза на 1% агарозном геле. В качестве электродного буфера использовали 1X трис-ацетатный (TAE) буфер. Состав 50X TAE-буфера: Трис – 242.2 г/л; уксусная кислота – 57.1 мл/л; ЭДТА – 18.612 г/л [Algire, 2013]. В качестве флуоресцентного красителя для визуализации ДНК в УФ-свете использовали краситель GelRed (Biotium, США). Длину исследуемых фрагментов определяли при помощи ДНК-маркера GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoScientific, США).

Таблица 1.

Список праймеров для проведения ПЦР / Table 1 - List of primers for PCR

Наименование праймера Primer name	Последовательность нуклеотидов Primer sequence	Температура отжига, °C Annealing temperature, °C	Размер ПЦР продукта, п.н. Amplicon length, bp
Дегенеративные праймеры к последовательности гена, кодирующего белок синтеза кофактора глюкозодегидрогеназы (пирролохинолинхинон) Degenerative primers to the gene sequence of glucose dehydrogenase cofactor (pyrroloquinolinquinone)			
pqqF	garctgacytaycgctgycc	55	≈900
pqqR	tsagsatrarsgcctgrca		
Праймеры к последовательности гена, кодирующего белок синтеза кофактора глюкозодегидрогеназы (пирролохинолинхинон) Primers to the gene sequence of glucose dehydrogenase cofactor (pyrroloquinolinquinone)			
pqqDF	ggctgctggccgaactgact	55	≈900
pqqDR	ggccgcaagaagcattattag		
Праймеры к последовательности гена, кодирующего фермент глюкозодегидрогеназу Primers to the gene sequence of glucose dehydrogenase			
gcdF	gacctgtgggacatggacgt	56	≈875
gcdR	gtccttgccggtgtagstcatc		

Биоинформатический анализ. Функциональную аннотацию генома *P. brenneri* проводили с помощью сервера RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) согласно алгоритму Classic RAST [Aziz et al., 2008]. Для обработки результатов секвенирования последовательностей генов использовали базу данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и программу BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в трех биологических повторах. Статистическую обработку проводили согласно тесту Манна-Уитни на языке программирования R в программе R-studio (<https://rstudio.cloud/>). Доверительный интервал составлял 95%.

Результаты и обсуждение

Представители рода *Pantoea* положительно влияют на рост и развитие растений, что подтверждено множеством исследований [Mei et al., 2021; Nascimento et al., 2020; Lu et al., 2021; Paredes-Paliz et al., 2016; Vasseur-Coronado et al., 2021; Dutkiewicz et al., 2016]. Ранее нашей научной группой из почв Республики

Татарстан были выделены фитат-гидролизующие штаммы, идентифицированные молекулярно-генетическими методами анализа как *P. brenneri* 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1 [Сулейманова и др. (Suleimanova et al.), 2021]. Были показаны их множественные PGP-свойства: установлена способность к секреции комплекса гидролитических ферментов (фитазы, протеазы, целлюлазы), деструкции цианидов (HCN), синтезу фитогормонов и сидерофоров. Все штаммы *P. brenneri* обладали высокой ингибирующей способностью (>80%) к микромицетам рода *Fusarium* [Иткина и др. (Itkina et al.), 2021].

Функциональная аннотация генома. Геном штамма *P. brenneri* 3.5.2 ранее был нами секвенирован, и последовательность депонирована в базу данных в NCBI GenBank под номером JMRT00000000.2 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JMRT00000000>]. Для функциональной аннотации данного генома мы использовали сервер RAST. Установили, что геном *P. brenneri* 3.5.2 включает 4672 белок-кодирующих последовательностей, из которых 55% принадлежало к функциональным группам (рис. 1).



Рисунок 1. Функциональные группы генов штамма *P. brenneri* 3.5.2.
Figure 1. Functional groups of *P. brenneri* 3.5.2 genes.

Были идентифицированы следующие группы генов, ассоциированных с PGP-свойствами: 4 гена, ответственных за биосинтез ауксина, 16 генов, кодирующих сидерофоры, относящиеся к группе энтеробактеринов, 4 гена, ответственных за выработку сидерофоров группы аэробактеринов, 8 генов, связанных с синтезом глюконовой кислоты, 1 ген, ответственный за выработку кетоглюконовой кислоты, 1 ген, задействованный в синтезе муравьиной кислоты, 1 ген, связанный с выработкой уксусной кислоты, 5 генов, задействованных в выработке гликолевой кислоты, 5 генов, связанных с синтезом молочной кислоты, 2 гена, ответственных за синтез гликолевой кислоты, 11 генов, задействованных в ассимиляции аммиака, 26 генов, связанных с фосфатным обменом, 8 генов, ответственных за производство колицина V (рис.2).

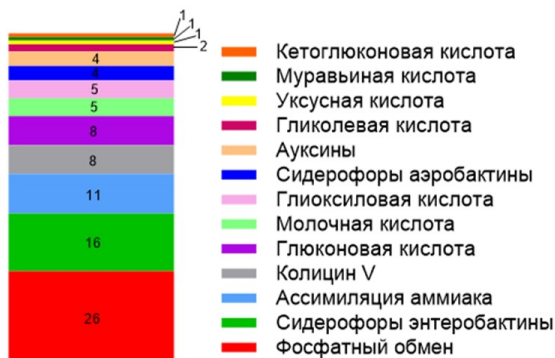


Рисунок 2. Количество генов, ассоциированных с PGP-свойствами у штамма *P. brenneri* 3.5.2.
Figure 2. Number of genes associated with PGP-properties in *P. brenneri* strain 3.5.2.

Таким образом, множественные PGP-свойства штаммов *P. brenneri* обнаруженные биохимическими и микробиологическими методами анализа, подтверждаются наличием соответствующих генов в геноме бактерий.

Скрининг генов, ассоциированных с мобилизацией фосфора штаммами *P. brenneri*. Проводили скрининг генов, связанных с мобилизацией почвенного фосфора, в геномной ДНК штаммов *P. brenneri*. Среди них - ген глюкозодегидрогеназы (*gcd*), ген, кодирующий кофакторглюкозодегидрогеназы - пирролохинолинхинон PQQ (*pqqE*). Показано, что большинство бактерий с грамотрицательным морфотипом проявляют активность глюкозодегидрогеназы. Данный фермент способен превращать глюкозу в глюконовую кислоту, которая выделяется в окружающую среду и способна растворять труднорастворимые соединения фосфора. Работа фермента зависит от наличия кофактора пирролохинолинхинона [Rawat et al., 2021].

Нам удалось амплифицировать ген глюкозодегидрогеназы с использованием консервативных праймеров и ген пирролохинолинхинона с использованием дегенеративных праймеров (рис. 3). При этом амплифицировать ген пирролохинолинхинона с использованием консервативных праймеров не удалось (рис. 3). Возможная причина заключается в том, что в районе таргетной последовательности произошли точечные мутации, обусловленные высокой изменчивостью прокариотического генома [Mira et al., 2002].

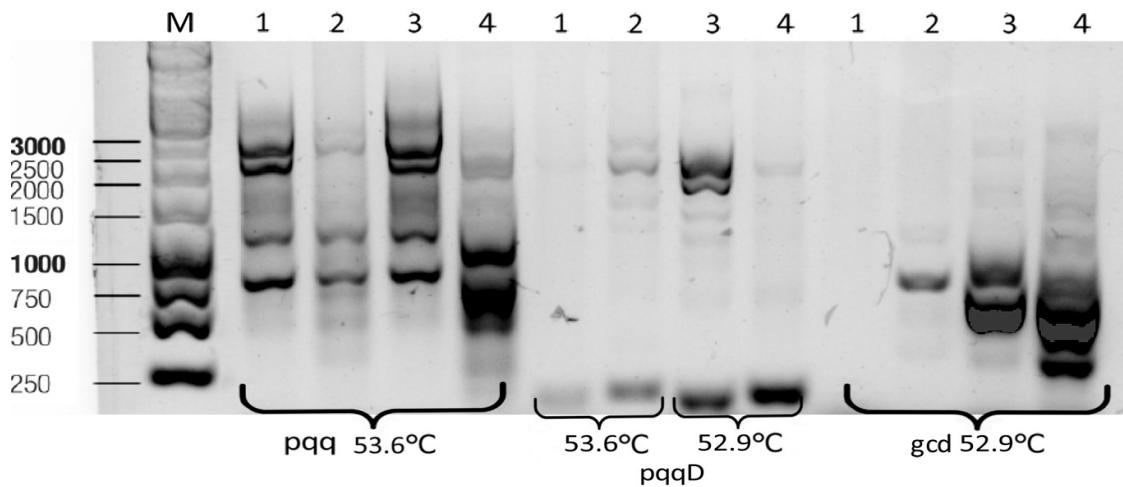


Рисунок 3. Электрофорез продуктов амплификации генов глюкозодегидрогеназы (с праймерами *gcd*) и пирролохинолинхинона (с праймерами *pqq*) с геномной ДНК штаммов *P. brenneri* при различных температурах отжига праймеров: 1 - *P. brenneri* 3.1; 2 - *P. brenneri* 3.2; *P. brenneri* 3.5.2; *P. brenneri* 3.6.1; М – маркер GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher). Длина продуктов *pqq* составляет 900 п.н., *gcd* - 875 п.н.
 Figure 3. Electrophoresis of the amplification products of glucose dehydrogenase genes and pyrroloquinoline quinone from the genomic DNA of *P. brenneri* strains at different primer annealing temperatures: 1 - *P. brenneri* 3.1; 2 - *P. brenneri* 3.2; *P. brenneri* 3.5.2; *P. brenneri* 3.6.1; M - Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher). The amplicon length for *pqq* - 900 bp, *gcd* - 875 bp.

Полученные в результате амплификации ПЦР-продукты соответствующего размера секвенировали и анализировали для выявления их сходства с другими последовательностями в базе данных GenBank с использованием метода BLAST. Анализ последовательности гена *gcd* у штаммов *P. brenneri* показал максимальную гомологию с последовательностями генов *gcdy* *P. agglomerans* (93.68%) и *P. conspicua* (92.63%). В отношении гена *pqqE* максимальная гомология обнаружена с последовательностями гена *pqqE* *P. conspicua* (98.42%), *P. agglomerans* (98.16%) и *P. vagans* (96.84%).

Таким образом, в геноме штаммов *P. brenneri* были идентифицированы гены глюкозодегидрогеназы (*gcd*) и пирролохинолинхинона (*pqqE*), продукты которых принимают непосредственное участие в процессах мобилизации почвенных фосфатов бактериями.

Оценка активностей кислой и щелочной фосфатазы штаммами *P. brenneri*. Почва содержит широкий спектр органических субстратов, которые могут быть источником фосфора для роста растений. Минерализация органических форм фосфора осуществляется в большей степени с помощью ферментивного гидролиза. Одними из ферментов, ведущими данный процесс, являются фосфатазы (фосфомоноэстеразы) (ЕС 3.1.3.2, ЕС 3.1.3.1) – ферменты класса гидролаз, подкласса эстераз,

катализирующие дефосфорилирование субстрата путем гидролиза образуемой фосфорной кислотой сложноэфирной связи. В зависимости от их pH оптимума фосфомоноэстеразы разделяют на две большие группы: кислые (активны в кислой среде, pH < 6) и щелочные (pH > 8) [Kalayu, 2019].

Исследуемые штаммы *P. brenneri* способны расти и образовывать зоны гидролиза на средах, содержащих гидроксиапатит, фосфорит и трикальцийфосфат в качестве единственного источника фосфора. Определяли наличие фосфатазной активности при pH 6.5 у штаммов *P. brenneri* в течение семи дней на средах NBRIP, содержащих гидроксиапатит, фосфорит и трикальцийфосфат (рис. 4).

Все исследуемые штаммы проявляли внеклеточную фосфатазную активность. Наибольшую активность кислых фосфатаз проявляли штаммы *P. brenneri* 3.5.2 (2.149 Ед./100 мл) на среде, содержащей в качестве единственного источника фосфора гидроксиапатит. Максимум был достигнут на пятые сутки культивирования. Активность кислой фосфатазы штамма *P. brenneri* 3.6.1 к 7 суткам культивирования достигала единицы, независимо от среды культивирования. В остальных опытных пробах активность кислых фосфатаз держалась приблизительно на одном уровне вне зависимости от источника фосфора, не превышая порог в 1 Ед./100 мл.

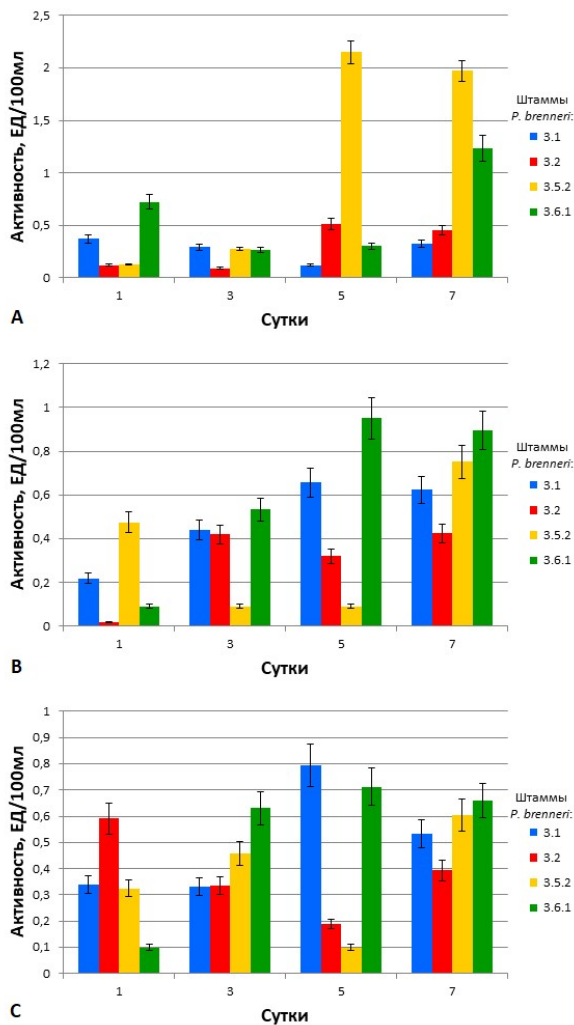


Рисунок 4. Динамика активности внеклеточной кислой фосфатазы штаммов *P. brenneri* при культивировании на среде NBRIP с различными источниками фосфора: А – гидроксиапатит, В – фосфорит, С – трикальцийфосфат.
 Figure 4. Acid phosphatase activity of *P. brenneri* strains on NBRIP medium with various phosphorus sources: А – hydroxyapatite, В – phosphorite, С – tricalcium phosphate.

В растворение минералов и увеличение количества свободных фосфатов в среде вносят вклад органические кислоты, которые бактерии выделяют в процессе жизнедеятельности. Однако совместно с кислотами бактерии образуют фосфатазы для минерализации органических источников фосфора. Сродство фосфатаз к органическим фосфатам выше, чем сродство к неорганическим формам фосфора [Carek et al., 2021].

В процессе культивирования, свободные фосфатные группы, высвобождаемые при подкислении среды бактериями, могут ингибировать деятельность ферментов. Однако показано, что кислая

фосфатаза некоторых видов семейства *Enterobacteriaceae* (*Morganella* и *Providencia*) секретируется на высоком уровне и не ингибируется избытком фосфора (фенотип НРАР) [Rodriguez, Fraga, 1999], что, вероятно, также происходит на поздних часах роста исследуемых нами культур.

Далее определяли наличие внеклеточной фосфатазной активности при pH 11 у штаммов *P. brenneri* в течение семи дней на средах NBRIP, содержащих в качестве единственного источника фосфора гидроксиапатит, фосфорит и трикальцийфосфат (рис. 5).

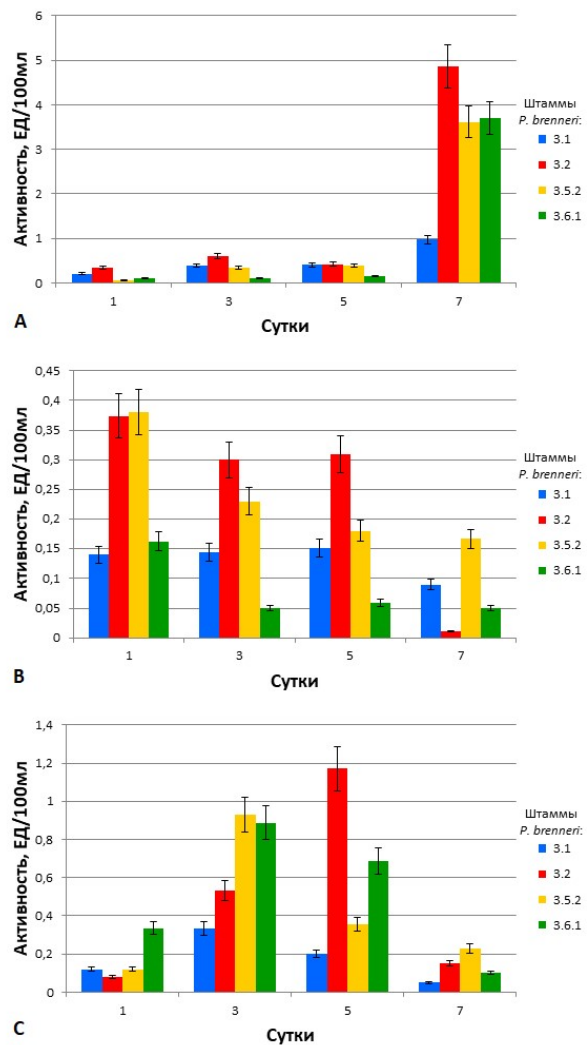


Рисунок 5. Динамика активности внеклеточной щелочной фосфатазы штаммов *P. brenneri* при культивировании на среде NBRIP с различными источниками фосфора: А – гидроксиапатит, В – фосфорит, С – трикальцийфосфат.
 Figure 5. Alkaline phosphatase activity of *P. brenneri* strains on NBRIP medium with various phosphorus sources: А – hydroxyapatite, В – phosphorite, С – tricalcium phosphate.

Максимальную активность щелочной фосфатазы (3.65-4.85 Ед./100 мл) штаммы проявляли на среде, содержащей в качестве источника фосфора гидроксиапатит, на 7 день культивирования, до которого наблюдалась лишь следовая активность фермента в культуральной жидкости. Можно заметить, что активность щелочной фосфатазы изменялась в зависимости от неорганического источника фосфора в среде. На среде с фосфоритом максимум активности для всех штаммов приходился на первые сутки, а далее наблюдался ее спад. На среде с трикальцийфосфатом максимум был достигнут на 3-5 сутки культивирования, с почти полным исчезновением активности на седьмой день.

Большинство бактерий обладают по крайней мере одной из трех щелочных фосфатаз с широкой субстратной специфичностью, известных как PhoA, PhoX и PhoD. Биосинтез и активность этих фосфатаз подавляется избытком фосфата в среде. Следовательно, они полностью функциональны только тогда, когда бактерии находятся в условиях ограничения фосфатного питания. Однако установлено наличие у *Bacteroidetes* новой нечувствительной к фосфату фосфатазы – PafA, которая широко распространена в природе и представляет собой основной путь регенерации фосфатов в окружающей среде. PafA, конститутивно синтезируемый почвенными флавобактериями, быстро реминерализует фосфомоноэфиры с высвобождением биодоступного фосфата, который может усваиваться растениями [Lidbury et al., 2022].

При росте на средах с различными источниками недоступного фосфора штаммы *P. brenneri* были способны к секреции кислой и щелочной фосфатаз, активность которых зависела от времени культивирования бактерий и источника фосфата в среде. Таким образом, секретлируемые фосфатазы вносят свой вклад в мобилизацию почвенного фосфора наряду с секрецией органических кислот.

В результате проведенного исследования, в геноме *P. brenneri* идентифицированы гены и генетические кластеры, отвечающие за проявление множественных PGP-свойств штаммов. Обнаружены гены *gcd* и *prqqE*, продукты которых принимают участие в мобилизации недоступных фосфорных соединений штаммами *P. brenneri*. Установлено, что все исследуемые штаммы *P. brenneri* секретировали кислую и щелочную фосфатазы при культивировании на средах, содержащих трикальцийфосфат, фосфорит или гидроксиапатит в качестве единственного источника фосфора.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального

университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется грантом РФФИ 21-76-00017.

Литература

- 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
- Сулейманова А.Д., Иткина Д.Л., Пудова Д.С., Шарипова М.Р. Идентификация фитат-гидролизующих ризобактерий рода *Pantoea* на основе фенотипических признаков и мультилокусного анализа // *Микробиология*. 2021. Т. 90(1). С. 100-109. doi: 10.31857/S0026365621010122
- Algire M.A. Restrictionless cloning // *Methods Enzymol.* 2013. V. 529. P. 125-134. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00009-4
- Alori E.T., Glick B.R., Babalola O.O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 1-8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00971
- Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., <...> Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology // *BMC Genomics*. 2008. V. 9. P. 75. doi: 10.1186/1471-2164-9-75
- Cabugao K.G., Timm C.M., Carrell A.A., Childs J., Lu T.Y.S., Pelletier D.A., Norby R.J. Root and rhizosphere bacterial phosphatase activity varies with tree species and soil phosphorus availability in Puerto Rico tropical forest // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1834. doi: 10.3389/fpls.2017.01834
- Capek P., Kasanke C.P., Starke R., Zhao Q., Tahovska K. Biochemical inhibition of acid phosphatase activity in two mountain spruce forest soils // *Biol. Fertil. Soils*. 2021. V. 57(7). P. 991-1005. doi: 10.1007/s00374-021-01587-9
- Chen C., Xin K., Liu H., Cheng J., Shen X., Wang Y., Zhang L. *Pantoeaalhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 41564. doi: 10.1038/srep41564
- Chen W., Yang F., Zhang L., Wang J. Organic acid secretion and phosphate solubilizing efficiency of *Pseudomonas* sp. PSB12: effects of phosphorus forms and carbon sources // *Geomicrobiol. J.* 2015. V. 33(10). P. 870-877. doi: 10.1080/01490451.2015.1123329
- Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Lemieszek M.K., Golec M., Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects // *Ann. Agric. Environ. Med.* 2016. V. 23(2). P. 206-207, 211-216. doi: 10.5604/12321966.1203879
- Fraser T.D., Lynch D.H., Entz M.H., Dunfield K.E. Quantification of bacterial non-specific acid (phoC) and

- alkaline (phoD) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields // *Appl. Soil Ecol.* 2017. V. 111. P. 48-56. doi: 10.1016/j.apsoil.2016.11.013
12. Han S.H., Kim C.H., Lee J.H., Park J.Y., Cho S.M., Park S.K. Inactivation of pqq genes of *Enterobacter intermedius* 60-2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance // *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. V. 282(1). P. 140-146. doi: 10.1111 /j.1574-6968.2008.01120.x
13. Kalayu G. Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers // *Plant Cell.* 2019. V. 2(4). P. 6-9. doi: 10.1155/2019/4917256
14. Kumar R., Shastri B. Role of Phosphate-Solubilising Microorganisms in Sustainable Agricultural Development // *Agro-Environ. Sustainability.* 2017. P. 271-303. doi: 10.1007/978-3-319-49724-2_13
15. Lidbury, I.D.E.A., Scanlan, D.J., Murphy, A.R.J. et al. A widely distributed phosphate-insensitive phosphatase presents a route for rapid organophosphorus remineralization in the biosphere // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022. V. 119 (5). e2118122119. doi: 10.1073/pnas.2118122119
16. Lu L., Chang M., Han X., Wang Q., Wang J., Yang H., Guan Q., Dai S. Beneficial effects of endophytic *Pantoea ananatis* with ability to promote rice growth under saline stress // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2021. V. 131(4). P. 1-13. doi: 10.1111 /jam.15082
17. Mei C., Chretien R.L., Amaradasa B.S., He Y., Turner A., Lowman S. Characterization of Phosphate Solubilizing Bacterial Endophytes and Plant Growth Promotion In Vitro and in Greenhouse // *Microorganisms.* 2021. V. 9(9). P. 1-11. doi: 10.3390/microorganisms9091935
18. Mira A., Klasson L., Andersson S.G.E. Microbial genome evolution: sources of variability // *Curr. Opin. Microbiol.* 2002. V. 5(5). P. 506-512. doi: 10.1016/s1369-5274(02)00358-2
19. Nascimento F.X., Hernandez A.G., Glick B.R., Rossi M.J. The extreme plant-growth-promoting properties of *Pantoea phytobeneficialis* MSR2 revealed by functional and genomic analysis // *Environ. Microbiol.* 2020. V. 22(4). P. 1341-1355. doi: 10.1111/1462-2920.14946
20. Olanrewaju O.S., Glick B.R., Babalola O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 33(11). P. 197. doi: 10.1007/s11274-017-2364-9
21. Paredes-Paliz K.I., Pajuelo E., Doukkali B., Caviedes M.A., Rodriguez-Llorente I.D., Mateos-Naranjo E. Bacterial inoculants for enhanced seed germination of *Spartina densiflora*: Implications for restoration of metal polluted areas // *Mar. Pollut. Bull.* 2016. V. 110(1). P. 396-399. doi: 10.1111 /plb.12693
22. Perez E., Sulbaran M., Ball M.M., Yarzabal L.A. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region // *Soil Biol. Biochem.* 2007. V.39(1). P. 2905-2914. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.06.017
23. Rawat P., Das S., Shankhdhar D., Shankhdhar S.C. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake // *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2021. V. 21(1). P. 49-68. doi: 10.1007/s42729-020-00342-7
24. Sakurai M., Wasaki J., Tomizawa Y., Shinano T., Osaki M. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter // *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2008. V. 54(1). P. 62-71. doi: 10.1111/j.1747-0765.2007.00210.x
25. Sambrook J., Fritsch E.R., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual // *Cold Spring Harbor Lab. Press.* 1989. V. 2.
26. Sorty A.M., Meena K.K., Choudhary K., Bitla U.M., Minhas P.S., Krishnani K.K. Effect of Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Halophytic Weed (*Psoralea corylifolia* L.) on Germination and Seedling Growth of Wheat Under Saline Conditions // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016. V. 180(5). P. 872-880. doi: 10.1007/s12010-016-2139-z
27. Suleimanova A.D., Beinhauer A., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Balaban N.P., Shakirov E.V., Greiner R., Sharipova M.R. Novel Glucose-1-Phosphatase with High Phytase Activity and Unusual Metal Ion Activation from Soil Bacterium *Pantoea* sp. Strain 3.5.1 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81(19). P. 6790-6799. doi: 10.1128/AEM.01384-15
28. Suleimanova A.D., Itkina D.L., Pudova D.S., Sharipova M.R. Identification of *Pantoea* phytate-hydrolyzing rhizobacteria based on their phenotypic features and multilocus sequence analysis (MLSA) // *Microbiology (Microbiologiya).* 2021. V. 90(1). P. 87-95. doi: 10.1134/S0026261721010112
29. Tabatabai M.A., Bremner J.M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity // *Soil Biol. Biochem.* 1969. V. 1(4). P. 301-307. doi: 10.1016/0038-0717(69)90012-1
30. Tian J., Ge F., Zhang D., Deng S., Liu X. Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating Biogeochemical P Cycle // *Biology.* 2021. V. 10(2). P. 1-19. doi: 10.3390/biology10020158
31. Vasseur-Coronado M., du Boulois H.D., Pertot I., Puopolo G. Selection of plant growth promoting rhizobacteria sharing suitable features to be commercially developed as biostimulant products // *Microbiol. Res.* 2021. V.245. P.126672. doi: 10.1016/j.micres.2020.126672
32. Xiao C.Q., Chi R.A., Huang X.H., Zhang W.X., Qiu G.Z., Wang D.Z. Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated

from phosphate mines // *Ecol. Eng.* 2008. V. 33(2). P. 187-193. doi: 10.1016/j.ecoleng.2008.04.001

33. Zhu J., Li M., Whelan M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 612. P. 522-537. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.095

References

1. Algire M.A. Restrictionless cloning. *Methods Enzymol.* 2013. V. 529. P. 125-134. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00009-4

2. Alori E.T., Glick B.R., Babalola O.O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 1-8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00971

3. Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., <...>Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* 2008. V. 9. P. 75. doi: 10.1186/1471-2164-9-75

4. Cabugao K.G., Timm C.M., Carrell A.A., Childs J., Lu T.Y.S., Pelletier D.A., Norby R.J. Root and rhizosphere bacterial phosphatase activity varies with tree species and soil phosphorus availability in Puerto Rico tropical forest. *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1834. doi: 10.3389/fpls.2017.01834

5. Capek P., Kasanke C.P., Starke R., Zhao Q., Tahovska K. Biochemical inhibition of acid phosphatase activity in two mountain spruce forest soils // *Biol. Fertil. Soils.* 2021. V. 57(7). P. 991-1005. doi: 10.1007/s00374-021-01587-9

6. Chen C., Xin K., Liu H., Cheng J., Shen X., Wang Y., Zhang L. *Pantoeaalhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat. *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 41564. doi: 10.1038/srep41564

7. Chen W., Yang F., Zhang L., Wang J. Organic acid secretion and phosphate solubilizing efficiency of *Pseudomonas* sp. PSB12: effects of phosphorus forms and carbon sources. *Geomicrobiol. J.* 2015. V. 33 (10). P. 870-877. doi: 10.1080/01490451.2015.1123329

8. Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Lemieszek M.K., Golec M., Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2016. V. 23(2). P. 206-207, 211-216. doi: 10.5604/12321966.1203879

9. Itkina D.L., Suleimanova A.D., Sharipova M.R. *Pantoea brenneri* AS3 and *Bacillus ginsengihumi*M2.11 as potential biocontrol and plant growth-promotion agents. *Microbiology (Microbiologiya).* 2021. V. 90(2). P. 210-218. doi: 10.1134/S0026261721020053

10. Fraser T.D., Lynch D.H., Entz M.H., Dunfield K.E. Quantification of bacterial non-specific acid (phoC) and alkaline (phoD) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean

fields. *Appl. Soil Ecol.* 2017. V. 111. P. 48-56. doi: 10.1016/j.apsoil.2016.11.013

11. Han S.H., Kim C.H., Lee J.H., Park J.Y., Cho S.M., Park S.K. Inactivation of pqq genes of *Enterobacter intermedium* 60-2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. V. 282(1). P. 140-146. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01120.x

12. Kalayu G. Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. *Plant Cell.* 2019. V. 2(4). P. 6-9. doi: 10.1155/2019/4917256

13. Kumar R., Shastri B. Role of Phosphate-Solubilising Microorganisms in Sustainable Agricultural Development // *Agro-Environ. Sustainability.* 2017. P. 271-303. doi:10.1007/978-3-319-49724-2_13

14. Li J.T., Yang J., Chen D.C., Zhang X.L., Tang Z.S. An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. *Genet. Mol. Res.* 2007. V. 6(4). P. 1064-1071.

15. Lidbury, I.D.E.A., Scanlan, D.J., Murphy, A.R.J. et al. A widely distributed phosphate-insensitive phosphatase presents a route for rapid organophosphorus remineralization in the biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022. V. 119(5). e2118122119. doi: 10.1073/pnas.2118122119

16. Lu L., Chang M., Han X., Wang Q., Wang J., Yang H., Guan Q., Dai S. Beneficial effects of endophytic *Pantoea ananatis* with ability to promote rice growth under saline stress. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2021. V. 131(4). P. 1-13. doi: 10.1111/jam.15082

17. Mei C., Chretien R.L., Amaradasa B.S., He Y., Turner A., Lowman S. Characterization of Phosphate Solubilizing Bacterial Endophytes and Plant Growth Promotion In Vitro and in Greenhouse. *Microorganisms.* 2021. V.9(9). P.1-11. doi: 10.3390/microorganisms9091935

18. Mira A., Klasson L., Andersson S.G.E. Microbial genome evolution: sources of variability. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002. V. 5(5). P. 506-512. doi: 10.1016/s1369-5274(02)00358-2

19. Nascimento F.X., Hernandez A.G., Glick B.R., Rossi M.J. The extreme plant-growth-promoting properties of *Pantoea phytobeneficialis* MSR2 revealed by functional and genomic analysis. *Environ. Microbiol.* 2020. V. 22(4). P. 1341-1355. doi: 10.1111/1462-2920.14946

20. Olanrewaju O.S., Glick B.R., Babalola O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 33(11). P. 197. doi: 10.1007/s11274-017-2364-9

21. Paredes-Palaz K.I., Pajuelo E., Doukkali B., Caviedes M.A., Rodriguez-Llorente I.D., Mateos-Naranjo E. Bacterial inoculants for enhanced seed germination of *Spartina densiflora*: Implications for restoration of metal polluted areas. *Mar. Pollut. Bull.* 2016. V. 110(1). P. 396-399. doi: 10.1111 / plb.12693

22. Perez E., Sulbaran M., Ball M.M., Yarzabal L.A. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biol. Biochem.* 2007. V.39(1). P. 2905-2914. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.06.017
23. Rawat P., Das S., Shankhdhar D., Shankhdhar S.C. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2021. V. 21(1). P. 49-68. doi: 10.1007/s42729-020-00342-7
24. Sakurai M., Wasaki J., Tomizawa Y., Shinano T., Osaki M. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2008. V. 54(1). P. 62-71. doi: 10.1111/j.1747-0765.2007.00210.x
25. Sambrook J., Fritsch E.R., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Lab. Press.* 1989. V. 2.
26. Sorty A.M., Meena K.K., Choudhary K., Bitla U.M., Minhas P.S., Krishnani K.K. Effect of Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Halophytic Weed (*Psoralea corylifolia* L) on Germination and Seedling Growth of Wheat Under Saline Conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016. V. 180(5). P. 872-880. doi: 10.1007/s12010-016-2139-z
27. Suleimanova A.D., Beinhauer A., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Balaban N.P., Shakirov E.V., Greiner R., Sharipova M.R. Novel Glucose-1-Phosphatase with High Phytase Activity and Unusual Metal Ion Activation from Soil Bacterium *Pantoea* sp. Strain 3.5.1. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81(19). P. 6790-6799. doi: 10.1128/AEM.01384-15
28. Suleimanova A.D., Itkina D.L., Pudova D.S., Sharipova M.R. Identification of *Pantoea* phytate-hydrolyzing rhizobacteria based on their phenotypic features and multilocus sequence analysis (MLSA). *Microbiology (Microbiologiya).* 2021. V. 90(1). P. 87-95. doi: 10.1134/S0026261721010112
29. Tabatabai M.A., Bremner J.M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1969. V. 1(4). P. 301-307. doi: 10.1016/0038-0717(69)90012-1
30. Tian J., Ge F., Zhang D., Deng S., Liu X. Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating Biogeochemical P Cycle. *Biology.* 2021. V. 10(2). P. 1-19. doi: 10.3390/biology10020158
31. Vasseur-Coronado M., du Boulois H.D., Pertot I., Puopolo G. Selection of plant growth promoting rhizobacteria sharing suitable features to be commercially developed as biostimulant products. *Microbiol. Res.* 2021. V. 245. P. 126672. doi: 10.1016/j.micres.2020.126672
32. Xiao C.Q., Chi R.A., Huang X.H., Zhang W.X., Qiu G.Z., Wang D.Z. Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecol. Eng.* 2008. V. 33(2). P. 187-193. doi: 10.1016/j.ecoleng.2008.04.001
33. Zhu J., Li M., Whelan M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Sci. Total Environ.* 2018. V. 612. P. 522-537. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.095