

## МОБИЛИЗАЦИЯ ФОСФАТОВ И ПРОДУКЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ЭНДОФИТНЫМИ ШТАММАМИ *BACILLUS SUBTILIS*

Егоршина А.А., Хайруллин Р.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, [krm62@mail.ru](mailto:krm62@mail.ru)

### Резюме

Исследована способность 23 эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* к мобилизации труднорастворимых фосфатов. Все штаммы растворяли фосфаты кальция и железа, а 12 – также и алюминия. При этом выявлено, что в зависимости от способа постановки эксперимента можно получить отличающиеся результаты. Показано, что при культивировании в жидкой среде с фосфатом железа происходит гибель клеток бацилл, что, по-видимому, и является причиной неспособности растворять  $FePO_4$  в жидкой среде в отличие от плотной. Одним из ключевых механизмов растворения фосфатов под влиянием эндофитов является продукция ими органических ди- и трикарбоновых кислот в среду культивирования, состав и количественное соотношение которых различалось как в зависимости от штамма, так и от консистенции среды культивирования.

*Ключевые слова:* эндофитные штаммы *Bacillus subtilis*, растворение фосфатов, органические кислоты

### Введение

В связи с ростом объемов применения агрохимикатов, приводящих к различным экологическим проблемам, возрастает актуальность поиска безопасных для человека путей защиты растений от болезней и повышения их урожайности. Одним из таких направлений является использование препаратов на основе бактерий, способных стимулировать рост растений, или «plant growth-promoting bacteria» (PGPB, бактерии, стимулирующие рост растений) [Bashan и Holguin, 1998]. К PGPB относятся также и некоторые эндофитные бактерии, обитающие внутри растительных тканей [Hallmann, 2006]. Наше внимание акцентировано на эндофитах, способных сосуществовать в тесных ассоциациях с растением, не только не причиняя вред хозяину, но и благоприятствуя его росту, развитию и продуктивности, если речь идет о сельскохозяйственных культурах. С этой точки зрения логичнее объединить такие бактерии в группу эндофитных стимуляторов роста растений, или PGPЕВ (plant growth-promoting endophytic bacteria) по аналогии с PGPR (ризосферными), чтобы не создавалось ложное впечатление о

мутуалистических взаимоотношениях растений абсолютно со всеми эндофитами.

Среди PGPЕВ, перспективных для использования в растениеводстве, особое внимание привлекают представители рода *Bacillus*. Во-первых, это связано с их способностью к спорообразованию, что решает проблему стабильности биопрепаратов на их основе. Во-вторых, очень незначительная часть видов этих бактерий патогенна для человека и животных. В-третьих, *Bacillus* spp., как правило, обнаруживаются в ризосфере и внутренних тканях многих видов растений среди доминирующих представителей микрофлоры, что свидетельствует об отсутствии у бацилл хозяйской специфичности и позволяет считать мало вероятными какие-либо катастрофические изменения в экосистемах при искусственном внесении этих бактерий.

До настоящего времени у эндофитов не обнаружены специфические, в сравнении с PGPR, механизмы стимуляции роста растений. Условно их можно разделить на прямые и непрямые [Beauchamp, 1993; Lazarovits и Nowak, 1997; Antoun и Prévost, 2005]. Первые предполагают действие непосредственно метаболитов микроорганизма,

приводящее к улучшению какого-либо физиологического показателя у растения, например, массы и/или линейных размеров органа, эффективности фотосинтеза, содержания минеральных элементов в тканях и т.п. К таким механизмам можно отнести продукцию фитогормонов [Цавкелова и др., 2006; Patten и Glick, 1996; Ryu et al., 2003], фиксацию молекулярного азота [Mantelin и Touraine, 2004; Dobbelaere и Okon, 2007] и мобилизацию в почве труднодоступных соединений фосфора [Compant et al., 2005; Rodríguez et al., 2006].

Непрямые пути реализуются, когда взаимоотношения растения и PGPB опосредованы биотическим или абиотическим факторами. К таким путям можно отнести контроль развития болезней растений через антагонизм к фитопатогенам [Whipps, 2001; Compant et al., 2005; Bally и Elmerich, 2007], повышение эффективности функционирования симбиозов растения с клубеньковыми бактериями [Sturz et al., 1997; Rajendran et al., 2008], деградацию токсичных ксенобиотиков [Newman и Reynolds, 2005].

Большинство бактерий, колонизирующих внутренние ткани растений, не являются облигатными эндوفитами, они способны обитать и в почве, влияя на метаболизм растений через ризосферу. К одному из таких механизмов стимуляции роста растений, как уже отмечалось выше, относится мобилизация элементов питания, в том числе фосфора. Сведения о способности эндوفитов проявлять такие свойства ограничены. В связи с этим мы исследовали способность имеющихся в нашем распоряжении эндوفитных штаммов бацилл растворять малоподвижные соединения фосфора за счет продукции бактериями органических кислот.

#### Материалы и методы

Объектами исследования были 23 штамма *B. subtilis* Cohn., отобранных по признаку антагонизма к фитопатогенным грибам рода *Fusarium* а также *Bipolaris sorokiniana*. Штаммы 26Д, 24Д, М1 (деп. в коллекции ВНИИСХМ, №128, №129, №111Д24 соотв.), 11В (коллекция ИБФМ РАН, №ВКМ В-2218Д) были получены из коллекции ДП «Биофаг» ГУП «Иммунопрепарат» (г. Уфа), остальные 19 (НТ, НТ2, 11ВМ, 11РН, 49РН, 89РН, 112РН, 118РН, 121РН, 122РН, 141РН, 161РН, 162РН, 171РН, 811РН, 832РН, 871РН, 922РН, 962РН) выделены в лаборатории биотехнологии Башкирского ГАУ из поверхностно стерилизованных тканей растений яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. Видовая принадлежность новых штаммов установлена по культурально-морфологическим признакам, а также

оценкой полиморфизма длины рестрикционных фрагментов гена 16S рРНК у исследуемых штаммов в сравнении с коммерческими.

Способность штаммов *B. subtilis* к мобилизации неорганических фосфатов проверяли на среде Муромцева, в которую в качестве единственного источника фосфора добавляли  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4$  или  $\text{AlPO}_4$  из расчета 5г/л. МПА с предварительно выращенными на его поверхности колониями бактерий резали на цилиндрические блоки и переносили их на чашки со средой Муромцева. Через 7-10 дней оценивали наличие прозрачных зон (гало) [Сзги, 1983]. Площадь зоны гало (без вычета диаметра самого блока) измеряли умножением двух перпендикулярных диаметров.

Способности микроорганизмов растворять неорганические фосфаты в жидкой среде оценивали, используя среду NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) состава (г/л): глюкоза - 10,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,25,  $\text{KCl}$  - 0,2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,1, неорганический фосфат ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4$  или  $\text{AlPO}_4$ ) - 5, pH 7,0 [Mehta, Nautiyal, 2001]. Бактерии выращивали на МПА в течение суток при 37°C, после чего делали смыв культуры стерильным физраствором и доводили по стандарту мутности до концентрации  $10^9$  клеток/мл. Полученной суспензией инокулировали тест-среду и помещали на шейкер при 37°C и 200 об/мин на 3 суток. Неинокулированную среду с добавлением нерастворимого фосфата использовали в качестве контроля. После этого в культуральной жидкости по методу Чирикова определяли количество подвижных форм фосфора, растворимых в 0,5 М уксусной кислоте [Минеев, 2001].

Для анализа органических кислот штаммы выращивали на жидкой полусинтетической среде (состав описан в работе Недорезкова В.Д., 2003), 12 ч при 37°C, после чего культуру центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин, клетки трижды промывали 0,9%-ным раствором  $\text{NaCl}$  и затем переносили в колбы со средой NBRIP или в чашки Петри с агаризованной средой того же состава [Mehta, Nautiyal, 2001]. В качестве единственного источника фосфора использовали  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Культуру в жидкой среде выращивали в течение трех суток, после чего центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин, супернатант отделяли и дополнительно центрифугировали при 13000 об/мин 10 мин. В полученной надосадочной жидкости анализировали состав органических кислот. На твердой среде бактерии выращивали 7 суток, после чего удаляли верхний слой агара с клетками, оставшуюся среду измельчали, заливали 20 мл стерильной дистиллированной воды и помещали на ночь на качалку при 4°C. Затем раствор

центрифугировали как описано выше. В полученной надосадочной жидкости методом ВЭЖХ определяли органические кислоты.

ВЭЖХ проводили на приборе Waters Breeze (Waters, США) со спектрофотометрическим детектором, используя колонку Luna C18 (Phenomenex, США) 250x4,6 мм, 5 мкм, и элюент состава ацетонитрил:0,006 М Н<sub>3</sub>Р<sub>4</sub> в соотношении 2:98. Элюент подавался в изократическом режиме со скоростью 1 мл/мин. Детектирование проводилось при длине волны 215 нм. В качестве стандартов использовали щавелевую, L-молочную, D-яблочную, малеиновую, D-винную, лимонную, янтарную, D,L-изолимонную, уксусную, пропионовую, малоновую, фумаровую кислоты (Supelco, США).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных программ пакета Microsoft Office, данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

#### Результаты и обсуждение

Все исследованные эндофитные штаммы *B. subtilis* обладали способностью к мобилизации фосфатов кальция и железа, а некоторые – также и алюминия (рис. 1).

Однако при культивировании бактерий на средах с разной консистенцией фосфат-мобилизующая активность штаммов проявлялась по-разному. Так, при культивировании в жидкой среде все штаммы растворяли Са<sub>3</sub>(Р<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, в то время как на плотной среде у таких штаммов, как М1, НТ, 118РН и 962РН, подобной активности не регистрировалось. Подобная зависимость от

консистенции среды особенно ярко проявлялась в случае с фосфатами алюминия и железа. В случае АlР<sub>4</sub> только часть штаммов растворяли соль в жидкой среде, и ни один - на плотной. При этом в случае с FeР<sub>4</sub>, наоборот, все штаммы обладали способностью к мобилизации этого соединения при росте на плотной среде, и только 832РН – в жидкой.

С одной стороны, это может объясняться тем, что осаждение, например, оксалата кальция мешает обнаружению зоны гало и, соответственно, фосфат-мобилизующей активности на плотной среде, несмотря на растворение фосфата [Hinsinger, 2001; Fankem et al, 2006]. С другой стороны, поскольку даже в стерильной жидкой среде присутствует растворенный фосфат-ион, это позволяет предполагать также и присутствие в ней ионов металлов, концентрация которых может возрастать в присутствии бактерий и оказаться токсичной для них, что особенно важно для катионов алюминия и железа. Это может привести не только к нарушению метаболической активности бактерий, но и к их гибели, что отразится и на способности к растворению фосфатов.

Эта гипотеза подтвердилась при анализе численности микроорганизмов (на примере штаммов 11ВМ и 26Д) на момент определения содержания свободного фосфора в среде культивирования (таблица 1). Согласно приведенным данным, увеличение числа микроорганизмов наблюдается только на среде с фосфатом кальция, в то время как фосфат железа ингибирует рост бактерий и приводят к снижению концентрации КОЕ в культуре.

Таблица 1.

Выживаемость клеток *B. subtilis* и проявление фосфат-мобилизующей активности в зависимости от солеобразующего катиона металла

Вариант	Количество подвижного фосфора в среде, мг Р <sub>2</sub> О <sub>5</sub>	Концентрация клеток, КОЕ/мл
Са <sub>3</sub> (Р <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Контроль	0,19
	<i>B. subtilis</i> 11ВМ*	0,59
	<i>B. subtilis</i> 26Д**	0,50
FeР <sub>4</sub>	Контроль	0,23
	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	0,23
	<i>B. subtilis</i> 26Д	0,24

\* Исходная концентрация культуры штамма 11ВМ 5,8×10<sup>7</sup> КОЕ/мл;

\*\* Исходная концентрация культуры штамма 26Д 5,04×10<sup>7</sup> КОЕ/мл

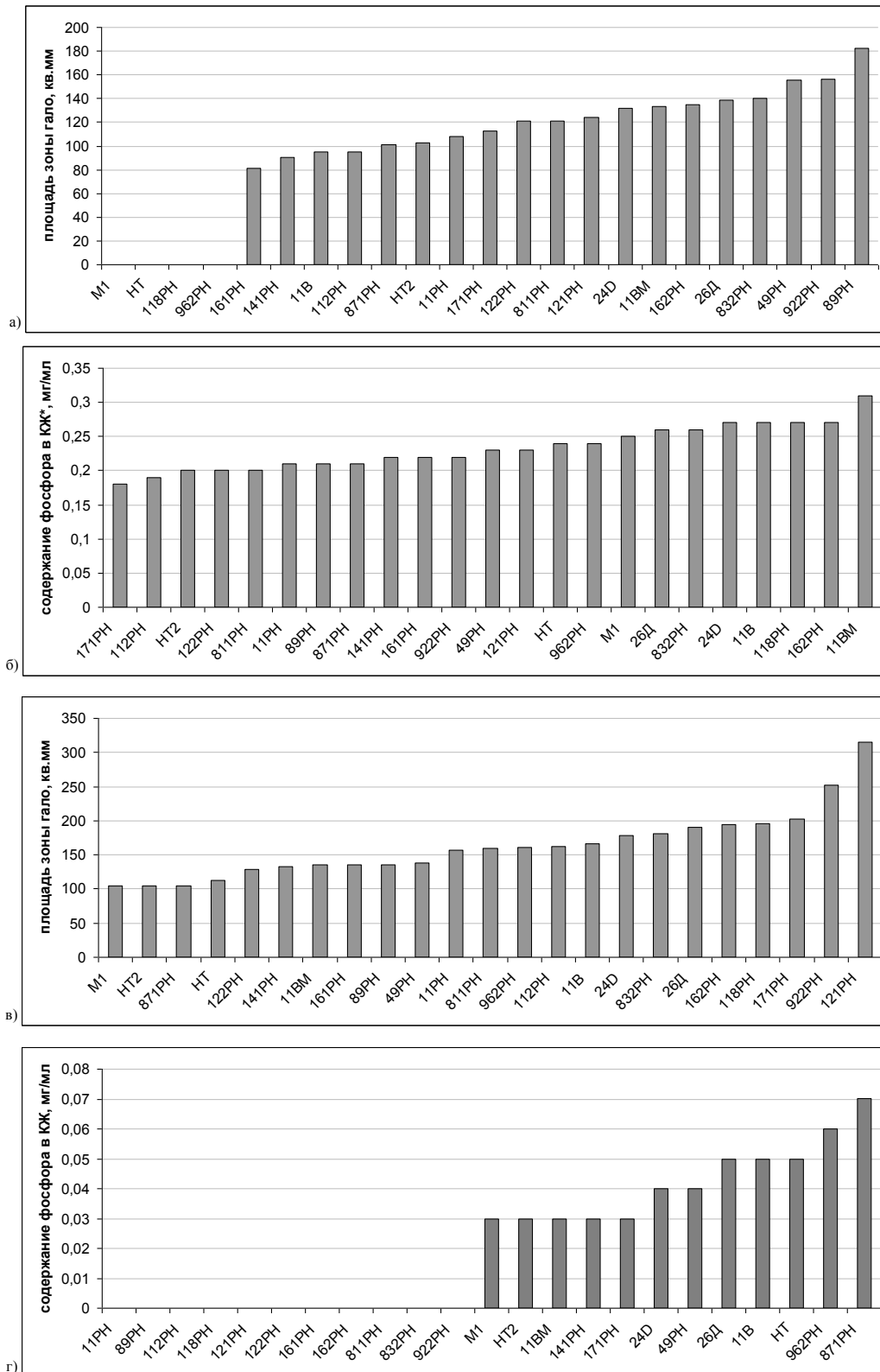


Рис. 1. Мобилизация фосфатов эндофитными штаммами *B. subtilis*: а)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , плотная среда; б)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , жидкая среда; в)  $\text{FePO}_4$ , плотная среда; г)  $\text{AlPO}_4$ , жидкая среда. \* КЖ – культуральная жидкость.

Основываясь на многочисленных данных, свидетельствующих о том, что мобилизация нерастворимых фосфатов микроорганизмами в почве происходит благодаря секреции ими органических кислот [Hinsiger, 2001; Fankem et al., 2006], можно полагать, что их анионные остатки способствуют переходу в почвенный раствор как минеральных, так и органических фосфатов, после чего становится возможным ферментативное освобождение фосфатной группы, осуществляемое фосфатазами [Lambers et al., 2006; Plassard и Dell, 2010].

Органические кислоты, продуцируемые некоторыми из штаммов, представлены в таблице 2. Набор кислот зависел от штамма и консистенции среды. Все штаммы продуцировали

монокарбоновую молочную кислоту на всех средах. Присутствие в составе метаболитов бацилл ди-(винная, малоновая, янтарная, щавелевая) и трикарбоновых (изолимонная, лимонная) кислот позволяет предполагать, что мобилизация фосфатов может происходить не только благодаря снижению рН среды, но и за счет хелатирования ионов металлов, что особенно важно в случае фосфатов алюминия и железа, преобладающих в кислых почвах, и растворимость которых с понижением рН среды снижается [Afif, 1993]. При этом важно отметить, что лимонная и изолимонная кислоты, помимо растворения фосфатов, могут препятствовать образованию труднорастворимых кристаллов оксалата кальция [Hennequin et al., 1993].

Таблица 2.

Органические кислоты в составе экзометаболитов некоторых штаммов при культивировании на среде NBRIP с добавлением  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ , нг/мл

Кислоты		Штаммы				
		26Д	832РН	11РН	922РН	11ВМ
Лимонная	Ж*	сл**	-	-	сл**	-
	П***	_****	-	-	-	-
Пропионовая	Ж	-	161	-	100	-
	П	-	-	-	-	-
Малоновая	Ж	-	-	316	576	1106
	П	177	447	447	382	508
Янтарная	Ж	255	289	-	-	426
	П	-	114	сл**	-	-
Щавелевая	Ж	сл**	-	сл**	сл**	сл**
	П	-	-	-	-	-
Винная	Ж	-	сл**	483	сл**	158
	П	-	-	-	-	-
Изолимонная	Ж	326	1006	2190	-	719
	П	-	125	112	210	207
Молочная	Ж	737	794	1076	735	935
	П	269	276	236	305	636

\* - жидкая среда; \*\* - следы, менее 100 нг/мл; \*\*\* - плотная среда;

\*\*\*\*- кислота не была обнаружена

Интересным, на наш взгляд, является отсутствие идентичности в спектрах кислот, выделяемых штаммами на средах с разной консистенцией. У большинства штаммов среди метаболитов в плотной среде удалось идентифицировать меньше видов кислот, по сравнению с жидкой. Интересен также факт продукции малоновой кислоты всеми штаммами на плотной среде, тогда как при росте в жидкой среде эту кислоту продуцировали только штаммы 11ВМ, 11РН и 922РН.

Некоторые различия в спектрах кислот, продуцируемых бациллами при культивировании на твердой и жидкой средах одинакового состава могут объясняться особенностями структуры бактериальной популяции, формируемой в этих условиях. В жидкости, особенно при глубинном культивировании при перемешивании, клетки в меньшей степени физически контактируют друг с другом, практически не прикрепляются друг к другу и к поверхности (стеклу) в отличие от их поведения на твердых питательных средах, где бактериальная

популяция существует в виде колоний (в нашем случае - газона, формирующегося благодаря "срастанию" множества отдельных колоний) [Davey и O'Toole, 2000]. Регуляция жизнедеятельности клеток в этих популяциях осуществляется по-разному, что может проявляться в изменении спектра продуцируемых метаболитов, в частности органических кислот. Появление малоновой кислоты в плотной среде у штаммов 832PH и 26Д может являться следствием того, что нижние слои колоний (газона), прилегающие к агару, оказываются в условиях кислородного дефицита [Волошин и Капрелянц, 2004]. В подобных условиях происходит торможение цикла Кребса, и в этом существенную роль может играть малоновая кислота, поскольку известно, что малонат конкурентно ингибирует активность фермента сукцинатдегидрогеназы, катализирующей в цикле трикарбоновых кислот обратимое окисление янтарной кислоты до фумаровой, и поэтому являются ингибиторами клеточного дыхания.

В целом, органические кислоты, продуцируемые штаммами, помимо мобилизации почвенных фосфатов, по-видимому, могут обладать и другой важной биологической ролью как в ризосфере, так и в тканях растения-хозяина после их колонизации. Во-первых, практически все продуцируемые бактериями карбоновые кислоты могут быть источниками углерода для других микроорганизмов, обитающих в ризосфере, например, для фитопатогенных бактерий *Agrobacterium vitis* [Salomonr et al., 1998], *Pseudomonas syringae* [Koike et al., 1998], *P. viridiflava* [Mirik et al., 2004], *Dickeya* sp. [Huang et al., 2010] и других, а также азотфиксирующих бактерий *Azotobacter*, *Azospirillum* и др. [Pereg-Gerk et al., 1998]. Некоторые из продуцируемых бактериями кислот могут также участвовать в подавлении развития фитопатогенной микрофлоры. Например, пропионовая кислота и пропионат кальция ингибируют рост грибов *Colletotrichum* spp. [Biggs, 1999], *Monilinia fructicola* [Biggs et al., 1997], *Helminthosporium solani* [Olivier et al., 1999], *Allantophomopsis cytisporae*, *A. lycopodina*, *Coleophoma empetri*, *Fusicoccum putrefaciens*, *Physalospora vaccinii* [Blodgett et al., 2002] и бактерии *Erwinia chrysanthemi* [Llama-Palacios et al., 2005]. Кроме того, лактат алюминия и цитрат натрия способны угнетать рост *H. solani* [Hervieux et al., 2002].

Растения также могут отзываться на присутствие органических кислот. Известно, что пропионовая кислота у чувствительного к заболачиванию сорта ячменя обуславливает выход из клеток корней катионов калия и кальция и

поступление в них протонов, нарушая тем самым баланс катионов в растениях [Pang et al., 2007]. Цитрат и изоцитрат, помимо участия в цикле Кребса, относятся к ключевым соединениям в функционировании глиоксилатного шунта в клетках растений [Popova, de Carvalho, 1998]. Также следует отметить, что изоцитрат является активатором дигидродипиколонатсинтазы - ключевого фермента биосинтеза лизина из аспартата у растений [Yamakura et al., 1974; Silk и Matthews, 1997].

Интерес может представлять возможная биологическая активность малоновой кислоты. Благодаря способности ингибировать сукцинатдегидрогеназу в цикле трикарбоновых кислот, эта кислота может проявлять токсические свойства по отношению к растениям и представителям почвенной микрофлоры. Однако известно, что малоновая кислота обнаруживается в тканях некоторых растений, таких как пшеница, табак и у представителей семейства бобовых [Li и Copeland, 2000; Chen et al., 2011]. Более того, у *Arabidopsis thaliana* обнаружен фермент малонил-CoA синтетазы, непосредственно превращающий экзогенный малонат в малонил-CoA [Chen et al., 2011], который в свою очередь является предшественником для синтеза и элонгации жирных кислот [Baud et al., 2004], образования флавоноидов, изофлавоноидов [Peer et al., 2001], поликетидов [Berg et al., 1988; Lombo et al., 2001] и многих малонилированных соединений [Taguchi et al., 2010]. Li и Copeland [2000] высказали предположение о защитной роли малоновой кислоты в растениях, однако не исключено, что малонат выступает скорее в качестве сигнальной молекулы или(и) предшественника защитных соединений, поскольку экспрессия гена малонил-CoA синтетазы индуцировалась при осмотическом стрессе и обработке АБК [Chen et al., 2011]. В связи с этим можно предполагать, что малоновая кислота, продуцируемая бактериями, является одним из индукторов системной устойчивости растений. Также следует отметить, что у некоторых бобовых растений малонат, по-видимому, выполняет функцию основного, если не единственного, источника углерода для бактериоидов, образованных *Bradyrhizobium japonicum* и *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* [Kim, 2002]. Более того, в симбиозах *B. japonicum* малонат частично превращается в малонамат, который предположительно является донором аминогруппы, поскольку в его составе осуществляется перенос аммония в клетки растений [Kim и Chae, 1990]. Не исключено, что при ассоциации с бобовыми растениями исследуемые эндофиты, продуцируя малонат, способствуют, с одной стороны,

дополнительному снабжению бактериоидов источником углерода, а с другой - получают взамен свою долю связанного азота.

Следует обратить внимание на продукцию всеми штаммами щавелевой кислоты в небольших количествах. Эта кислота, с одной стороны, является основным соединением, участвующим в мобилизации фосфатов, у микоризообразующих грибов [Jones, 1998], а с другой стороны, представляет собой фактор вирулентности у фитопатогенного гриба *Sclerotinium sclerotiorum*, нарушая процессы открывания и закрывания устьиц и подавляя окислительный взрыв при развитии защитного ответа [Sexton и Howlett, 2006]. Это позволяет предполагать важную роль щавелевой кислоты не только в мобилизации фосфатов, но и при проникновении эндофитов в ткани растения-хозяина.

Полученные экспериментальные данные и приведенный краткий анализ имеющихся в литературе сведений о биологической активности некоторых органических кислот свидетельствует о важной роли эндофитных представителей *B. subtilis*, не только как известных антагонистов фитопатогенов и агентов биоконтроля, но и как продуцентов соединений, мобилизующих элементы питания в почве, а также способных играть регуляторную роль во взаимоотношениях между растениями и микроорганизмами.

#### Литература

1. Волошин С.А, Капрельянц А.С. Межклеточные взаимодействия в бактериальных популяциях // Биохимия. – 2004. – Т.69. – С. 1555–1564.
2. Недорезков В.Д. Биологическое обоснование применения эндофитных бактерий в защите пшеницы от болезней на Южном Урале: Дис. ... д-ра с.-х. наук / ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет». – Уфа, 2003. – 280 с.
3. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. – М.: Колос, 1983. – 162 с.
4. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т.42. – С. 133–143.
5. Afif E., Matar A., Torrent J. Availability of phosphate applied to calcareous soils of West Asia and North Africa // Soil Sci. Soc. Am. J. – 1993. – V.57. – P. 756–760.
6. Antoun H., Prévost D. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria // PGPR: Biocontrol and Biofertilization / Siddiqui Z.A. (ed.). – Springer, 2005. – P. 1-38.
7. Baca B.E., Elmerich C. Microbial production of plant hormones // Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations / Elmerich C., Newton W.E. – Springer, 2007. – P. 113-143.
8. Bally R., Elmerich C. Biocontrol of plant diseases by associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria // Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations / Elmerich, C., Newton, W.E. – Springer, 2007. – P. 171–190.
9. Bashan Y., Holguin G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB // Soil Biol. Biochem. – 1998. – V.30. – P. 1225–1228.
10. Baud S., Bellec Y., Miquel M., Bellini C., Caboche M., Lepiniec L., Faure J.D., Rochat C. gurke and pasticcino3 mutants affected in embryo development are impaired in acetyl-CoA carboxylase // EMBO Rep. – 2004. – V.5. – P. 515–520.
11. Beauchamp C. J. Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agents // Phytoprotection. – 1993. – V.71. – P. 19–27.
12. Berg A.J.J., Radema M.H., Labadie R.P. Influence of acetate and malonate on the production of 1,8-dihydroxyanthracene derivatives in suspension cultures of *Rhamnus purshiana* // Planta. – 1988. – V.174. – P. 417–421.
13. Biggs A.R., El-Kholi M.M., El-Neshawy S., Nickerson R. Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola* // Plant Dis. – 1997. – V.81. – P. 399–403.
14. Biggs A.R. Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. // Plant Dis. – 1999. – Vol. 83. – P. 1001–1005.
15. Blodgett A.B., Caldwell R.W., McManus P.S. Effects of calcium salts on the cranberry fruit rot disease complex // Plant Dis. – 2002. – V.86. – P. 747–752.
16. Chen H., Kim H.U., Weng H., Browse J. Malonil-CoA synthetase, encoded by *ACYL ACTIVATING ENZYME13*, is essential for growth and development of *Arabidopsis* // Plant Cell. – 2011. – V.23. – P. 2247–2262.
17. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka E.A. Use plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases principles, mechanism of action, and future prospects // Appl.

- Environ. Microbiol. – 2005. – V.71. – P. 4951–4959.
18. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics // Microbiol. Mol Biol. Rev. – 2000. – V.64. – P. 847–67.
  19. Dobbelaere S., Okon Y. The plant growth-promoting effect and plant responses // Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations / Elmerich C., Newton W.E. – Springer, 2007. – P. 145–170.
  20. Fankem H., Nwaga D., Deubel A., Dieng L., Merbach W., Etoa F.X. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon // African J. Biotechnol. – 2006. – V.56. – P. 2450–2460.
  21. Hallman J., Berg G. Spectrum and population dynamic of bacterial root endophytes // Microbial root endophytes / Schulz B., Boyle C., Sieber T.N. - Springer-Verlag, 2006. – P. 15–31.
  22. Hennequin C., Lalanne V., Daudon M., Lacour B., Druke T. A new approach to studying inhibitors of calcium oxalate crystal growth // Urological Research. – 1993. – V.21. – P. 101–108.
  23. Hervieux V., Yaganza E.S., Arul J., Tweddell R.J. Effect of organic and inorganic salts on the development of *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf // Plant Dis. – 2002. – V.86. – P. 1014–1018.
  24. Hinsinger P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review // Plant and Soil. – 2001. – V.237. – P. 173–195.
  25. Huang L. F., Fang B. P., Luo Z. X., Chen J. Y., Zhang X. J., Wang Z. Y. First report of bacterial stem and root rot of sweetpotato caused by a *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysanthemi*) in China // Plant Dis. – 2010. – V.94. – P. 1503.
  26. Jones D. L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review // Plant Soil. – 1998. – V.205. – P. 25–44.
  27. Kim Y.S. Malonate metabolism: biochemistry, molecular biology, physiology, and industrial application // J. Biochem. Mol. Biol. – 2002. – V.35. – P. 443–451.
  28. Koike S. T., Henderson D. M., Azad H. R., Cooksey D. A., Little E. L. Bacterial blight of broccoli raab: A new disease caused by a pathovar of *Pseudomonas syringae* // Plant Dis. – 1998. – V.82. – P. 727–731.
  29. Lambers H., Shane M.W., Cramer M.D., Pearce S.J., Veneklaas E.J. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits // Ann. Bot. – 2006. – V.98. – P. 693–713.
  30. Lazarovits G., Nowak J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment // Hortiscience. – 1997. – V.32. – P. 188–192.
  31. Li J., Copeland L. Role of malonate in chickpea // Phytochemistry. – 2000. – V.54. – P. 585–589.
  32. Llama-Palacios A., López-Solanilla E., Rodríguez-Palenzuela P. Role of the PhoP-PhoQ system in the virulence of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937: involvement in sensitivity to plant antimicrobial peptides, survival at acid pH, and regulation of pectolytic enzymes // J. Bacteriol. – 2005. – V.187. – P. 2157–2162.
  33. Lombo F., Pfeifer B., Leaf T., Ou S., Kim Y.S., Cane D.E., Licari P., Khosla C. Enhancing the atom economy of polyketide biosynthetic processes through metabolic engineering // Biotechnol. Prog. – 2001. – V.17. – P. 612–617.
  34. Mantelin S., Touraine B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impact on root development and nitrate uptake // J. Exp. Bot. – 2004. – V.55. – P. 27–34.
  35. Mehta S., Nautiyal C.S. An efficient method for quantitative screening of phosphate-solubilizing bacteria // Curr. Microbiol. – 2001. – V.43. – P. 51–56.
  36. Mirik M., Aysan Y., Cetinkaya-Yildiz R., Sahin F., Saygili H. Watermelon as a new host of *Pseudomonas viridiflava*, causal agent of leaf and stem necrosis, discovered in Turkey // Plant Dis. – 2004. – V.88. – P. 907.
  37. Newman L., Reynolds C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants // Trends Biotechnol. – 2005. – V.23. – P. 6–8.
  38. Olivier C., MacNeil C.R., Loria R. Application of organic and inorganic salts to field-grown potato tubers can suppress silver scurf during potato storage // Plant Dis. – 1999. – V.83. – P. 814–818.
  39. Pang J., Cui T., Shabala L., Zhou M., Mendham N., Shabala S. Effect of secondary metabolites associated with anaerobic soil conditions on ion fluxes and electrophysiology in barley roots // Plant Physiol. – 2007. – V.145. – P. 266–276.
  40. Patten C.L., Glick B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid // Can. J. Microbiol. – 1996. – V.42. – P. 207–220.
  41. Peer W.A., Brown D.E., Tague B.W., Muday G.K., Taiz L., Murphy A.S. Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2001. – V.126. – P. 536–548.
  42. Pereg-Gerk L., Paquelin A., Gounon P., Kennedy I.R., Elmerich C. A transcriptional regulator of the LuxR-UhpA family, FlcA, controls flocculation and wheat root surface colonization by *Azospirillum*



- brasiliense* Sp7 // Mol. Plant-Microbe Interact. – 1998. – V. 11. – P. 177–187.
43. Plassard C., Dell B. Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees // Tree Physiol. – 2010. – V.30. – P. 1129–1139.
44. Popova T.N., Pinheiro de Carvalho M.A. Citrate and isocitrate in plant metabolism // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – V.1364. – P. 307–325.
45. Rajendran L., Samiyappan R. Endophytic *Bacillus* species confer increased resistance in cotton against damping off disease caused by *Rhizoctonia solani* // Plant Pathol. J. – 2008. – V.7. – P. 1–12.
46. Rodriguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y. Genetic of phosphate solubilization and its potencial applications for improving plant growth-promoting bacteria // Plant Soil. – 2006. – V.287. – P. 15–21.
47. Ryu C.-M., Farag M.A., Hu C.-H., Reddy M.S., Wei H.-X., Paré P.W., Kloepper J.W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – V.100. – P. 4927–4932.
48. Salomone J.-Y., Szegedi E., Cobanov P., Otten L. Tartrate utilization genes promote growth of *Agrobacterium* spp. on grapevine // Mol. Plant-Microbe Interact. – 1998. – V.11. – P. 836–838.
49. Sexton A.C., Howlett B.J. Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts // Eukaryotic Cell. – 2006. – V.5. – P. 1941–1949.
50. Silk G.W., Matthews B.F. Soybean *DapA* mutations encoding lysine-insensitive dihydrodipicolinate synthase // Plant Mol. Biol. – 1997. – V.33. – P. 931–933.
51. Sturz A. V., Christie B. R., Matheson B. G., Nowak J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth // Biol. Fertil. Soils. – 1997. – V.25. – P. 13–19.
52. Taguchi G., Ubukata T., Nozue H., Kobayashi Y., Takahi M., Yamamoto H., Hayashida N. Malonylation is a key reaction in the metabolism of xenobiotic phenolic glucosides in *Arabidopsis* and tobacco // Plant J. – 2010. – V.63. – P. 1031–1041.
53. Whipps, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // J. Exp. Bot. – 2001. – V.52. – P. 487–511.
54. Yamakura F., Ikeda Y., Kimura K., Sasakawa T. Partial purification and some properties of pyruvate-aspartic semialdehyde condensing enzyme from sporulating *Bacillus subtilis* // J. Biochem. – 1974. – V.76. – P. 611–621.

#### MOBILIZATION OF PHOSPHATES AND PRODUCTION OF ORGANIC ACIDS BY *BACILLUS SUBTILIS* ENDOPHYTIC STRAINS

Egorshina A.A., Khairullin R.M.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa, [krm62@mail.ru](mailto:krm62@mail.ru)

#### Resume

Ability of 23 *Bacillus subtilis* endophytic strains to mobilize insoluble phosphates has been investigated. All strains dissolved calcium and iron phosphates, and 12 strains dissolve also aluminum phosphate. At the same time it has been revealed, that depending on a way experiment statement of it is possible to receive different results. It is shown, death of bacillus cells occurs during the cultivation in the liquid medium with the iron phosphate. That, apparently, is the reason for the bacterial strains inability to dissolve FePO<sub>4</sub> in a liquid medium in contrast to the solid medium. One of the key mechanisms of dissolution of phosphates under the influence of endophytes is the production of organic di- and tricarboxylic acids to the culture medium. The presence and the quantitative ratio of these acids differed both depending on a strain, and on consistence of the culture medium.

*Keywords:* *Bacillus subtilis* endophytic strains, dissolution of phosphates, organic acids