

**ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ПОДЗЕМНЫМИ ОРГАНАМИ
DACTYLORHIZA INCARNATA (L.) SOO (ORCHIDACEAE)**

Ю.В. Зайцева, А.В. Сидоров, А.А. Бычкова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова», Ярославль, Россия, zjv9@mail.ru

Аннотация. Из ризосферы *Dactylorchiza incarnata* (L.) Soo (Orchidaceae) выделено 304 штамма ассоциативных бактерий, из которых 78 обладали фосфатмобилизирующей активностью, наиболее выраженной у бактерий рода *Pseudomonas*. Активная мобилизация нерастворимого фосфата кальция происходит на фоне активного роста бактериальных культур и сопровождается понижением рН культуральной жидкости, вероятно, вследствие накопления в ней бактериальных органических кислот.

Ключевые слова: фосфатмобилизирующая активность, ассоциативные бактерии, ризосфера, *Dactylorchiza incarnata*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1241-1243

Способность определенных групп ассоциативных бактерий переводить малодоступные для растений формы фосфатов из органических и неорганических источников в подвижные и легкоусвояемые определяет условия минерального питания растений и, как следствие, их рост, развитие и устойчивость [Sharma et al., 2013]. Среди почвенных бактерий такой способностью, согласно разным источникам литературы, обладают до 50% штаммов ризосферных бактерий [Chen et al., 2006]. Фосфатмобилизирующая активность обнаружена у бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Xanthomonas* и др. [Sharma et al., 2013]. На сегодняшний день наиболее изученными являются ассоциативные фосфатмобилизирующие бактерии сельскохозяйственных растений. В ряде работ показано, что инокуляция растений фосфатмобилизирующими штаммами приводит к увеличению их темпов роста и урожайности [Arcand, Schneider, 2006; Chen et al., 2006; Sharma et al., 2013].

Однако для редких и находящихся под угрозой исчезновения видов семейства Орхидных, произрастающих на территории Центрально-европейской России, данных об ассоциативных бактериях и их роли в процессах роста и развития растений крайне мало. Известно, что в природных условиях их онтогенез может протекать только в тесной взаимосвязи с ассоциативной микробиотой, свойства которой определяют эффективность прорастания семян, рост, развитие и устойчивость растений данной группы [Коломейцева и др., 2012]. Изучение фосфатмобилизирующей активности ризосферных бактерий имеет важное значение для установления путей и характера взаимодействий внутри микробно-растительных ассоциаций [Sharma et al., 2013].

В связи с этим целью работы являлось изучение фосфатмобилизирующей активности бактерий, ассоциированных с подземными органами пальчатокоренника мясокрасного (*Dactylorchiza incarnata* (L.) Soo).

D. incarnata – многолетнее травянистое растение семейства Орхидных, включенное в Европейский список краснокнижных сосудистых растений, II Приложение к конвенции CITES, а также региональные Красные книги [Маракаев, 2015].

Бактерии были выделены из ризосферы генеративных растений *D. incarnata*, произрастающих в осоково-разнотравном сообществе на территории Национального

парка «Плещеево озеро» в Переславском районе Ярославской области. Выделение ассоциативного бактериального сообщества проводили методом последовательных разведений с последующим посевом на плотные питательные среды. Для идентификации штаммов использовали молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

Способность исследуемых штаммов к фосфатмобилизации оценивали методом, основанным на образовании зоны просветления на минимальной агаризованной среде с добавлением фосфата кальция (ТКФ) [Jimtha et al., 2014]. Для количественного определения фосфатмобилизирующей активности исследуемых штаммов в колбы вместимостью 750 мл вносили 100 мл стерильной минеральной среды следующего состава (г/л): NH_4Cl – 0,16; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 5,0; глюкоза – 10. В среду вносили 300 мкл ночной культуры бактерий и культивировали в орбитальном шейкер-инкубаторе Biosan ES-20 при 180 об/мин при 28 °С. Для определения количества фосфата, перешедшего в раствор, использовали одностадийный метод, основанный на измерении интенсивности окраски его молибденового комплекса с Твином 80 [Пупышев, 1991] на спектрофотометре UNICO 2802S UV/VIS при 350 нм. Измерения проводили в трех повторностях ежедневно на протяжении 10 дней. Одновременно с содержанием фосфора, измеряли уровень рН раствора (рН-метр АНИОН 4100), а также количество живых клеток бактерий. Оценку фитопатогенных свойств исследуемых штаммов проводили по их способности мацерировать растительную ткань в экспериментах *in vitro* [Желдакова, Мямин, 2006].

В результате проведенных исследований из ризосферы *D. incarnata* было выделено 304 изолята ассоциативных бактерий, принадлежащих к разным систематическим группам. При качественном анализе фосфатмобилизирующей активности было выявлено 78 штаммов (26% от общего числа), образующих зоны просветления (диаметром от 0,5 до 4,5 см) на агаре, содержащем нерастворимый ТКФ. При проверке отобранных штаммов на фитопатогенность было установлено, что менее 5% из них были способны к мацерации растительной ткани *in vitro*.

По результатам количественной оценки накопления фосфора в культуральной жидкости под действием исследуемых штаммов установлено, что наиболее активными фосфатмобилизирующими свойствами обладают бактерии, принадлежащие к роду *Pseudomonas* – *P. chlororaphis* GPR225, *P. brassicacearum* GTR221 и *P. yamanorum* GOTE18. Концентрация фосфора в культуральной жидкости исследуемых штаммов увеличивалась на протяжении всего времени культивирования. Однако наиболее активное накопление свободного фосфора в среде происходило в течение первых шести суток. При сопоставлении динамики накопления в культуральной жидкости свободного фосфора с изменением рН среды и количеством жизнеспособных клеток бактерий установлено, что наиболее активное растворение ТКФ происходит на фоне активного роста бактериальных культур и сопровождается понижением уровня рН. Снижение уровня рН культуральной жидкости может быть обусловлено образованием бактериями органических кислот в результате прямого окисления глюкозы, которое, в свою очередь, зависит от количества жизнеспособных бактериальных клеток в среде.

Дальнейшие исследования в этом направлении будут способствовать установлению характера взаимодействий редких видов семейства Орхидных с ассоциативной микробиотой, а также поиску перспективных штаммов с выраженными фосфатмобилизирующими свойствами, способных составить основу новых эффективных биопрепаратов для оптимизации минерального питания и регуляции роста растений.

Литература

- Желдакова Р.А., Мямин В.Е. Фитопатогенные микроорганизмы: Учеб.- метод. комплекс для студентов биол. фак. – Минск: БГУ, 2006. – 116 с.
- Коломейцева Г.Л., Антипина В.А., Широков А.И., Хомутовский М.И., Бабоша А.В., Рябченко А.С. Семена орхидей: развитие, структура, прорастание. – Москва: Геос, 2012. – 352 с.
- Маракаев О.А. Семейство Орхидные – Orchidaceae // Красная книга Ярославской области. – 2015. – С. 114–138.
- Пупышев А.Б. Стабильный реактив для одностадийного определения неорганического фосфата // Лабораторное дело. – 1991. – Т. 3, № 9. – С.12–16.
- Arcand M.M., Schneider K.D. Plant-and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review // An. Acad. Bras. Cienc. – 2006. – V. 78. – P. 791–807.
- Chen Y.P., Rekha P.D., Arun A.B., Shen F.T., Lai W.A., Young C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities // Appl. Soil. Ecol. – 2006. – V. 34, No. 33. – P. 41.
- Jimtha J.C., Smitha P.V., Anisha C., Deepthi T., Meekha G., Radhakrishnan E.K., Gayatri G.P., Remakanthan A. Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties // Plant. Cell Tiss. Organ. Cult. – 2014. – V. 118 (1). – P. 57–66.
- Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils // Springerplus. – 2013. – V. 2. – P. 587.

PHOSPHATE-MOBILIZING ACTIVITY OF BACTERIA ASSOCIATED WITH UNDERGROUND ORGANS OF *DACTYLORHIZA INCARNATA* (L.) SOO (ORCHIDACEAE)

Yu.V. Zaytseva, A.V. Sidorov, A.A. Bychkova

P.G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia, zjv9@mail.ru

Abstract. 304 strains of associative bacteria were isolated from the rhizosphere of *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo (Orchidaceae). 78 of them has phosphate-mobilizing activity which were mostly expressed at *Pseudomonas*. Active mobilization of undissolved calcium phosphate was observed during active growth of bacterial culture and was followed by lowering the pH of cultural media due to putative accumulation of bacterial organic acids.

Keywords: phosphate-mobilizing activity, associative bacteria, rhizosphere, *Dactylorhiza incarnata*