

Биостимуляторы, биопестициды

УДК 579.64:631.811.2

doi: 10.15389/agrobiology.2022.1.158rus

ИЗУЧЕНИЕ ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ШТАММОВ *Agrobacterium radiobacter* 10 и *Pseudomonas chlororaphis* ПГ7 in vitro*С.В. ЖЕЛЕЗНЯКОВ, Т.В. КАЛИНИНА, В.К. ДЕЕВА, Ю.В. ЛАКТИОНОВ,
Л.М. ЯКОБИ[✉]

К числу важнейших характеристик штаммов ризосферных бактерий, селективированных для разработки биопрепаратов удобрительного, стимулирующего или защитного действия, относятся их способность к мобилизации фосфатов почвы и удобрений. В настоящей работе впервые была исследована фосфатмобилизующая способность двух штаммов бактерий — *Agrobacterium radiobacter* 10 и *Pseudomonas chlororaphis* ПГ7, имеющих научную и практическую значимость. Установлена способность *A. radiobacter* 10 метаболизировать фитат, используя его в качестве источника углерода и энергии в отсутствие других источников, и способность *P. chlororaphis* ПГ7 солиобилизовать неорганические (трикальций фосфат, гидроксиапатит) и органический (фитат кальция) фосфаты. Нашей целью было изучение потенциальной способности штаммов *Agrobacterium radiobacter* 10 и *Pseudomonas chlororaphis* ПГ7 мобилизовать фосфор из труднодоступных для питания растений минеральных и органических соединений. Для получения накопительной культуры штаммы размножали на гороховом агаре (по Хотяновичу). Исследование фосфатмобилизующей способности штаммов проводили in vitro на селективных питательных средах при 28 °С. Способность штаммов дефосфорилировать фитат натрия оценивали на двух жидких средах. Среда II имела следующий состав (г/л дистиллированной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1,0, K_2SO_4 — 0,2, фитат Na («Sigma-Aldrich», США) — 10, кукурузный экстракт — 0,2 (pH 6,8). Состав среды PSM (phytase screening medium) (г/л дистиллированной воды): D-глюкоза — 15,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 5,0, KCl — 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, NaCl — 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; фитат Na («Sigma-Aldrich», США) — 5 (pH 6,5). Содержание общего фосфора, вносимого в среды с фитатом Na, определяли по методу E. Truog и A.H. Meyer с модификацией по J.B. Rodriguez с соавт. (1994) после озоления препарата по методу Н.Е. Гинсбург и Г.М. Щегловой (1960). О способности штаммов расти на жидких средах судили по изменению численности (КОЕ/мл суспензии) за период инкубации. Оценивали накопление свободного ортофосфата в среде за период инкубации. Способность штаммов растворять неорганические и органические фосфаты изучали при культивировании на трех плотных питательных средах. Среда NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) имела следующий состав (г/л дистиллированной воды): D-глюкоза — 10, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ — 5,0, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 5,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,25, KCl — 2,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,1, агар-агар — 20 (pH 6,8). Состав глюкозо-аспарагиновой среды с гидроксиапатитом (по Г.С. Муромцеву) (43): D-глюкоза — 10, аспарагин — 1, K_2SO_4 — 0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2, кукурузный экстракт — 0,2, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{O}_5$ — 4, агар-агар — 20 (pH 6,8). Состав среды PSM представлен выше, дополнительно вносили 20 г/л агар-агара и доводили pH до 6,5, добавляя 10 % водный раствор $\text{Ca}(\text{OH})_2$, тем самым переводя растворимый фитат натрия в нерастворимый фитат кальция. Наблюдали за образованием зон просветления (гало) вокруг колоний. В опытах на жидкой среде II было показано, что штамм *A. radiobacter* 10 способен использовать фитат в качестве источника углерода и фосфора для роста и размножения и ферментативным путем дефосфорилировать фитат. Об этом свидетельствовало значительное увеличение численности за период культивирования (4 сут), сравнительно небольшое понижение pH относительно контроля (без инокуляции), а также накопление фосфора в осадке бактериальных клеток и свободного ортофосфата в среде. Штамм *P. chlororaphis* ПГ7 такой способностью не обладал: несмотря на увеличение численности, за учетный период не наблюдалось заметного накопления осадка бактериальных клеток и свободного ортофосфата в среде. Показано, что при культивировании на жидкой среде PSM оба штамма активно росли, очевидно, используя глюкозу в качестве источника углерода и энергии. В этих условиях накапливалось значительное количество иммобилизованного фосфора в осадке бактериальных клеток, тогда как содержание свободного ортофосфата в среде было сопоставимо с контролем. Рост бактерий сопровождался значительным подкислением среды, что способствовало неферментативному гидролизу фитата натрия. Результаты исследования, проведенного на плотных средах, свидетельствовали о способности штамма *P. chlororaphis* ПГ7 растворять неорганические фосфаты и фитин по схеме солиобилизации, на что указывало образование гало вокруг колоний. В отличие от псевдомонад, штамм *A. radiobacter* 10 такой способностью не обладал. Таким образом, способность штаммов к солиоби-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-016-00197.

лизации минеральных фосфатов целесообразно изучать на плотных питательных средах, где критерием оценки дефосфоризации фосфата является образование гало вокруг колоний, тогда как способность штаммов к мобилизации фосфора из фитатов необходимо оценивать на жидких средах во избежание ложноположительных или ложноотрицательных результатов. При этом к основным показателям способности штаммов к ферментативному гидролизу фитатов относится накопление иммобилизованного фосфора в осадке бактериальных клеток и свободного ортофосфата в среде.

Ключевые слова: фосфатмобилизующая способность, *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas chlororaphis*, фитаты, трикальцийфосфат, гидроксипатит, элективные питательные среды, иммобилизованный фосфор, ортофосфат.

Фосфор — один из ключевых элементов в жизнедеятельности растений. Он входит в состав ряда органических соединений, в частности нуклеиновых кислот, нуклеотидов, нуклеопротеидов, витаминов, фосфолипидов, фитина и многих других, играющих центральную роль в обмене веществ. Недостаток фосфора влияет практически на все процессы жизнедеятельности растений. Фосфор поступает в корневую систему и функционирует в растении в виде окисленных соединений, главным образом остатков ортофосфорной кислоты (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) (1, 2). Микоризообразующие грибы, участвующие в транспорте фосфора из почвенного раствора в корни растения-хозяина, также поглощают фосфор в основном в виде иона H_2PO_4^- (3-5).

В почвах фосфор встречается почти исключительно в виде ортофосфатов и входит в состав минеральных и органических соединений. Валовое содержание фосфора в пахотном слое почв составляет 0,03-0,2 %, или 1-6 т/га. Несмотря на значительные запасы фосфора в почвах, его доступность для растений во многом затруднена из-за низкого содержания ионов ортофосфорной кислоты в почвенном растворе, что обусловлено интенсивной ретроградацией фосфатов (переход легкоусвояемых форм в трудноусвояемые) (3, 6). В минеральных соединениях почв фосфор представлен большей частью малоподвижными формами, такими как первичные минералы почвообразовательных пород, разнообразные соединения вторичного происхождения в виде солей со щелочными и щелочноземельными основаниями и полуторными оксидами.

Растворимость минеральных фосфатов зависит от реакции почвы. Так, фосфаты кальция и магния становятся нерастворимыми в щелочной среде, а фосфаты алюминия и железа — в кислой. Наибольшее количество доступных для растений соединений фосфора присутствует в почвах со слабокислой и нейтральной реакцией, рН которых находится в диапазоне 6,5-7,0 (6, 7).

Известно, что почвенные микроорганизмы (бактерии и грибы) играют ключевую роль в циклическом круговороте почвенного фосфора и доступности его для питания растений (8). Ризосферные бактерии, участвующие в высвобождении (солубилизации) фосфатов из нерастворимого неорганического сырья, используют различные стратегии для преобразования недоступных для растений форм в доступные. Многие бактерии выделяют углекислоту и подкисляют среду или, утилизируя сахара, выделяют низкомолекулярные органические кислоты (уксусную, яблочную, глюконовую и др.), которые обладают хелатирующими свойствами и образуют органоминеральные комплексы с катионами, связанными с фосфором, тем самым переводя его в растворимые формы. Мобилизация связанного в ризосфере фосфора может быть результатом активизации транспорта протонов из клеток корней и подкисления среды в ответ на инокуляцию бактериями. Кроме того, важную роль в повышении доступности фосфора способны играть

бактериальные сидерофоры, хелатирующие железо и другие металлы с образованием устойчивых комплексов (9). В процессах солюбилизации неорганических фосфатов в почве участвуют представители родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Beijerinckia*, *Mesorhizobium*, *Flavobacterium* (10), *Rhizobium* (11, 12), *Pseudomonas* (13), *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas* (14), а также *Streptomyces*, *Leifsonia* (15) и *Lisinobacillus* (16), ассоциированные с микоризными грибами.

Органический фосфор почвы составляет от 30 до 50 % от общего его содержания и представлен двумя различными по природе группами соединений — продуктами биологического синтеза и гумусообразования. К первой группе относятся нуклеопротеиды, фитин, фосфолипиды, фосфопротеины и другие органические соединения, которые входят в состав живых организмов. Наибольшую долю (30–60 %) среди органических фосфатов почвы занимают фитаты — соли фитиновой кислоты (D-мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексаксидигидрофосфорная кислота), которая представляет собой сложный эфир циклического шестиатомного спирта мио-инозитола и шести остатков ортофосфорной кислоты. На распределение фитатов влияет кислотность почвы. Фитаты кальция и магния распространены в нейтральных почвах, фитаты железа и алюминия — в кислых (17). В большом количестве фитаты содержатся в растениях, особенно их много в семенах, где они представляют основную форму хранения фосфора. В почву фитаты попадают с растительными остатками и навозом (18).

Наиболее часто встречающийся в почве изомер инозитолфосфата мио-инозитол гексаксифосфат (InsP₆) — сильный хелатирующий полианионный агент. Он может образовывать нерастворимые комплексы с жизненно важными двухвалентными катионами металлов, а также с белками, углеводами, аминокислотами, превращая их в нерастворимые конгломераты (19). В кислых растворах протонирование (присоединение протонов к молекуле) фосфатных групп фитата способствует образованию свободной формы молекулы. В нейтральных и щелочных растворах депротонирование фосфатных групп увеличивает сродство к двухвалентным катионам металлов, что существенно снижает растворимость фитата (20).

Гидролиз InsP₆ осуществляется ферментами фитазами. Фитазы — это особая группа фосфатаз, способных к поэтапному дефосфорилированию фитата с образованием менее фосфорилированных производных мио-инозитолфосфата, неорганического фосфата и свободных ионов металлов (21). На основании рН оптимума фитазы разделяют на два класса — кислые и щелочные. В настоящее время изучены биохимические свойства и механизм катализа отдельных ферментов — представителей этих классов, а также их структурные особенности, субстратная специфичность, температурная зависимость (19).

Основными продуцентами фитаз в почве служат микроорганизмы, которые делают фосфор органических соединений доступным для питания растений (22–24). Слабая фитазная активность обнаружена и в корнях растений. Однако фермент не секретируется в ризосферу, поэтому растения не могут усваивать самостоятельно фосфор, связанный в фитате (25). Среди микроорганизмов, обитающих в почве, к наиболее активным продуцентам внеклеточных фитаз относятся микромицеты из родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Mucor* (26). Фитазы обнаружены у дрожжей (27) и бактерий различных таксонов, в том числе *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* и многих других (22). Фитазы бактерий — это в основном внутриклеточные ферменты, однако бактерии родов *Bacillus* (28) и *Enterobacter* (29) способны про-

дуцировать и внеклеточные фитазы, а у *Escherichia coli* фитаза представляет собой периплазматический белок, который с большой долей вероятности *in vivo* имеет доступ к фитатным субстратам (30). Способность к гидролизу фитатов выявлена также у некоторых представителей *Arthrobacter* (31), *Flavobacterium* (32), *Burkholderia* (33), *Pantoea* (34).

Согласно сформулированной Г.С. Муромцевым концепции, микробиологическая мобилизация фосфора из солей фитиновой кислоты протекает в две фазы: «неспецифическая» фаза (растворение фитатов Ca, Mg, Fe и Al) осуществляется разнообразными кислотообразующими микроорганизмами, «специфическая» (ферментативное дефосфорилирование фитиновой кислоты) — специфическими микроорганизмами, среди которых имеются формы, использующие фитин или продукт гидролиза фитина мио-инозитол в качестве источника углерода: *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium fredii*, *Corynebacterium glutamicum* и *Lactobacillus casei* (32). В целом катаболический путь мио-инозитола после поглощения его клеткой изучен у *Bacillus subtilis*. Он включает множественные и поэтапные реакции с участием дегидрогеназы, дегидратазы и других ферментов. Конечный результат катаболического пути мио-инозитола — эквимолярная смесь из дигидроксиацетонфосфата, ацетил-CoA и CO₂ (35).

Способность ризосферных бактерий мобилизовать труднодоступные почвенные фосфаты давно рассматривается учеными как важный механизм положительного действия на фосфорное питание растений (36, 37). Известно также, что большинство видов фосфатмобилизующих бактерий благотворно влияют на рост и развитие растения в целом. Это происходит в результате повышения доступности других минеральных элементов (N, Fe, Zn и др.), выделения витаминов и фитогормонов, продукции антибиотиков, ингибирующих развитие патогенов, индукции механизмов системной устойчивости к стрессам абиотической и биотической природы (9, 38) и, наконец, образования внутриклеточных сигнальных молекул (вторичных мессенджеров), таких как InsP₃ — положительный регулятор многих сигнальных путей (39), имеющий важное значение для растительно-микробного взаимодействия и специфического взаимодействия между растениями и азотфиксирующими бактериями (40).

Однако для эффективного применения биопрепаратов нужны более полные знания о физиологических особенностях входящих в их состав микроорганизмов. К числу важнейших характеристик штаммов ризосферных бактерий, селектированных для разработки биопрепаратов удобрительного, стимулирующего или защитного действия, относится их способность к мобилизации фосфатов почвы и удобрений. При отсутствии таких сведений результаты действия биопрепаратов на фосфорное питание растений остаются мало предсказуемыми (7, 13). Исследования в этом направлении будут способствовать лучшему пониманию потенциальных взаимодействий между PGPB (plant growth-promoting bacteria) и растениями, а также между PGPB и микоризами грибами.

В настоящей работе впервые была исследована фосфатмобилизующая способность двух штаммов бактерий — *A. radiobacter* 10 и *P. chlororaphis* ПГ7, имеющих научную и практическую значимость. Установлена способность *A. radiobacter* 10 метаболизировать фитат, используя его в качестве источника углерода и энергии в отсутствие других источников, и способность *P. chlororaphis* ПГ7 солиubilизировать неорганические (трикальций фосфат, гидроксиапатит) и органический (фитат кальция) фосфаты.

Нашей целью было изучение потенциальной способности штаммов

Agrobacterium radiobacter 10 и *Pseudomonas chlororaphis* ПГ7 мобилизовать фосфор из труднодоступных для питания растений минеральных и органических соединений.

Методика. В работе использовали штаммы *Agrobacterium radiobacter* 10 и *Pseudomonas chlororaphis* ПГ7, которые хранятся в коллекции Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ). Известно, что первый способен фиксировать атмосферный азот при выращивании на безазотистой среде Виноградского, обладает ростостимулирующим действием для многих видов сельскохозяйственных растений и служит основой коммерческого биопрепарата Агрофил («ЭКОС БИОПРЕПАРАТЫ», Россия) (41, 42). Второй как потенциальный агент в биоконтроле фитопатогенных микроорганизмов проходит испытания в географической сети опытов (42). Штаммы были идентифицированы на основе анализа последовательности гена 16S рНК в отделении геномных технологий ЦКП ФГБНУ ВНИИСХМ.

Для получения накопительной культуры штаммы размножали на бобовом агаре (по прописи А.В. Хотяновича) следующего состава (г/л горохового бульона): сахароза — 10, KH_2PO_4 — 0,5, K_2HPO_4 — 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3, мел — 1, агар-агар — 20 (рН 6,8–7,0).

Исследование фосфатмобилизующей способности штаммов проводили *in vitro* на селективных питательных средах при 28 °С согласно методическим рекомендациям Г.С. Муромцева (43), В.Ф. Павловой с соавт. (43), В. Sasirekha с соавт. (44) и С.С. Nautiyal (45).

Способность штаммов дефосфорилировать фитат натрия оценивали в двух жидких средах. Среда II (43) имела следующий состав (г/л дистиллированной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1,0, K_2SO_4 — 0,2, фитат-Na («Sigma-Aldrich», США) — 10, кукурузный экстракт — 0,2 (рН 6,8); среда PSM (phytase screening medium) (44) (г/л дистиллированной воды): D-глюкоза — 15,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 5,0, KCl — 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, NaCl — 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; фитат-Na («Sigma-Aldrich», США) — 5 (рН 6,5). С этой целью по 25 мл сред разливали в стерильных условиях в плоскодонные колбы объемом 200 см³. Предварительно готовили по 100 мл исходных суспензий бактерий в 0,9 % водном растворе NaCl (смыв с поверхности одной чашки Петри с бобового агара. Затем по 400 мкл исходных суспензий бактерий вносили в колбы со средами (в контроле бактерии не вносили) и культивировали на орбитальном шейкере GFL 3015 («LAUDA-GFL», Германия) при 220 об/мин в течение 4 сут. Содержание общего фосфора, вносимого в среды с фитатом Na, определяли по методу E. Truog и A.H. Meyer (46) с модификацией по Rodriguez J.V. с соавт. (47) после озоления препарата по методу Н.Е. Гинсбург и Г.М. Щегловой (48). В пересчете на 1 мл среды II оно составило 3,98 мг P_2O_5 , в пересчете на 1 мл среды PSM — 1,99 мг P_2O_5 .

О способности штаммов расти на жидких средах судили по изменению титров (КОЕ/мл) за период инкубации. Титры определяли методом серийных разведений суспензии бактерий в физрастворе с высевом (по 100 мкл) на чашки Петри с бобовым агаром. Рост колоний учитывали после 2 сут культивирования при 28 °С. Измеряли рН суспензий с помощью комбинированного электрода Н1230В на портативном рН-метре HI 83141 («Hanna Instruments, Inc.», США) и мутность на фотоэлектроколориметре КФК-2 (ОАО «Загорский оптико-механический завод», Россия) при $\lambda = 590$ нм. Бактериальные клетки (4 мл суспензии) осаждали центрифугированием в пробирках Эппендорфа в течение 5 мин при 12000 g на центрифуге ПЭ-

6926 (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия). Полученные осадки дважды промыли от культуральной среды физраствором, после удаления надосадочной жидкости в пробирке приливали по 1 мл концентрированной H_2SO_4 и обугливали осадки в течение 2 сут при 24 °С. Интенсивность окрашивания кислоты в бурый цвет напрямую зависела от количества осадка в пробирке. Накопление иммобилизованного фосфора (общий фосфор в осадке бактериальных клеток) определяли вышеописанными методами, пересчитывая его в мг P_2O_5 на 1 мл суспензии.

Оценивали накопление свободного ортофосфата в среде за период инкубации, для чего суспензии бактерий центрифугировали в течение 5 мин при 12000 g, затем фильтровали надосадочную жидкость через мембранный фильтр Whatman FP 30/0,2 CA-S («Cytiva», Великобритания). Содержание фосфора определяли по методу E. Truog и A.H. Meyer (46) в модификации J.V. Rodriguez с соавт. (47).

Способность штаммов растворять неорганические и органические фосфаты изучали при культивировании на плотных питательных средах следующего состава (г/л дистиллированной воды): NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) (45) — D-глюкоза 10, $Ca_3(PO_4)_2$ 5,0, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5,0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25, KCl 2,0, $(NH_4)_2SO_4$ 0,1, агар-агар 20 (pH 6,8); глюкозо-аспарагиновая с гидроксиапатитом (по Г.С. Муромцеву) (43) — D-глюкоза 10, аспарагин 1, K_2SO_4 0,2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2, кукурузный экстракт 0,2, $Ca_5(PO_4)_3O_5$ 4, агар-агар 20 (pH 6,8); PSM (44) — состав среды представлен выше, дополнительно вносили 20 г/л агар-агара и доводили pH до 6,5, добавляя 10 % водный раствор $Ca(OH)_2$, чтобы перевести растворимый фитат натрия в нерастворимый фитат кальция. Наблюдали за образованием зон просветления питательной среды (гало) вокруг колоний.

Статистическую обработку полученных результатов (расчет средних значений, стандартных отклонений и ошибок выборочных средних) выполняли в программе Microsoft Excel 2010. Для проверки нулевой гипотезы при сравнении выборочных средних использовали интервальную оценку параметров распределения, для чего рассчитывали доверительные интервалы для генеральных средних. Использовали значения *t*-критерия Стьюдента для 5 % уровня значимости по Б.А. Доспехову (число степеней свободы 3, таблица 1 приложения) (49).

Результаты. Анализ фосфатмобилизующей способности штамма *A. radiobacter* 10 при культивировании в жидкой среде II показал, что он способен мобилизовать фосфор из фитата натрия ферментативным путем. Отмечалось увеличение содержания свободного ортофосфата в среде по сравнению с контролем (без инокуляции), а также значительное накопление иммобилизованного фосфора в осадке бактериальных клеток (табл.).

О росте бактерий, использующих фитат в качестве источника углерода, свидетельствовало увеличение титров (с $3,59 \times 10^6$ до $9,71 \times 10^8$ КОЕ/мл), помутнение суспензии, понижение pH среды (см. табл.), накопление биомассы бактериальных клеток (рис. 1, А, Б). Для проверки достоверности вывода о биологической природе дефосфоризации фитата был проведен анализ на содержание свободного ортофосфата в 1 % водном растворе фитата натрия при изменении pH в рабочем диапазоне от 6,83 до 6,11, по результатам которого не выявили существенного влияния повышения кислотности среды на гидролиз фитата. Полученные результаты согласуются с данными литературы о наличии внеклеточной фитазы у некоторых представителей рода *Agrobacterium*, благодаря чему они осуществ-

ляют гидролиз фитиновой кислоты с образованием субстратов, содержащих менее шести остатков фосфорной кислоты, — инозитолфосфатов, иноzitола и неорганического фосфата (32). Вероятно, способность штамма *A. radiobacter* 10 ферментативным путем гидролизовать фитат в условиях, когда тот служит единственным источником углерода в среде, напрямую связана со способностью усваивать мио-инозитол в качестве источника углерода и энергии с участием тех механизмов, которые описаны для *Bacillus subtilis* (35).

Дефосфорирующие способности штаммов *Pseudomonas chlororaphis* ПГ7 и *Agrobacterium radiobacter* 10 при культивировании в жидких питательных средах с фитатом натрия при 28 °С (n = 4, учет на 4-е сут)

Вариант	pH среды	OD590	Свободный фосфор в среде, мг P ₂ O ₅ /мл	Общий фосфор в бактериальном осадке, мг P ₂ O ₅ /мл суспензии
Среда II				
<i>P. chlororaphis</i>	6,47±0,15	0,10±0,01	1,34±0,16	0,0005±0,0002
<i>A. radiobacter</i>	6,12±0,13	0,53±0,09	3,04±0,47	0,0440±0,0100
Без инокуляции (контроль)	6,47±0,09	0,08±0,01	1,34±0,11	0,0001±0,0000 ^к
Среда PSM				
<i>P. chlororaphis</i>	4,25±0,13	1,50±0,22	0,02±0,01	0,0720±0,0180
<i>A. radiobacter</i>	4,52±0,13	1,50±0,18	0,04±0,02	0,0380±0,0070
Без инокуляции (контроль)	6,13±0,12	0,01±0,00	0,04±0,01	0,0001±0,0000 ^к

Примечание. Состав сред см. в разделе «Методика». В таблице представлены доверительные интервалы для генеральных средних при 5 % уровне значимости; к — представлены показатели контроля реактивов.

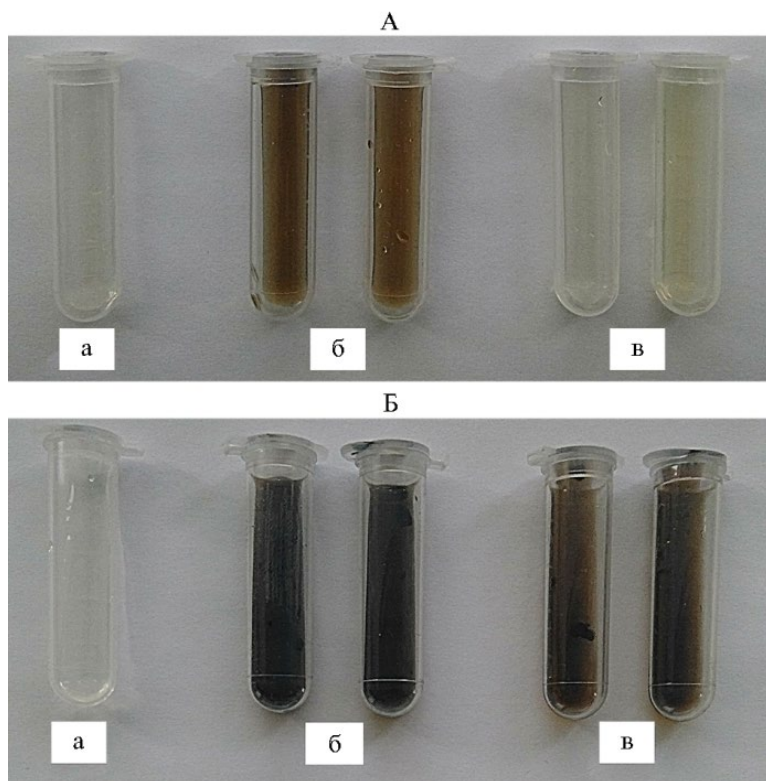


Рис. 1. Обугленные концентрированной H₂SO₄ осадки клеток бактерий, выращенных в разных средах: А — среда II, Б — среда PSM; а — контроль (без бактерий), б — штамм *Agrobacterium radiobacter* 10, в — штамм *Pseudomonas chlororaphis* ПГ7. Состав сред см. в разделе «Методика».

В свою очередь, штамм *P. chlororaphis* ПГ7 не показал способность к

ферментативному гидролизу фитата натрия при культивировании в жидкой среде П. Несмотря на рост титров с $1,03 \times 10^6$ до $3,34 \times 10^8$ КОЕ/мл, за учетный период не происходило накопления свободного ортофосфата в среде, изменения рН и помутнения среды, а образование осадка бактериальных клеток и накопление в нем иммобилизованного фосфора было незначительным (см. табл., рис. 1, А, в). Можно предположить, что бактерии не могли использовать фитат в качестве источника углерода и энергии в отсутствие других источников и активировали иные метаболические пути.

При культивировании в жидкой среде PSM с двумя источниками углерода отмечали активный рост обоих штаммов. Так, за период инкубации титры *A. radiobacter* 10 и *P. chlororaphis* ПГ7 увеличилась соответственно с $3,59 \times 10^6$ до $1,33 \times 10^9$ и с $1,03 \times 10^6$ до $1,41 \times 10^8$ КОЕ/мл. При этом происходило значительное помутнение бактериальных культур и понижение рН среды относительно контроля, происходило увеличение биомассы осадков клеток и количества иммобилизованного фосфора в осадках, тогда как содержание свободного ортофосфата в растворе оставалось сопоставимым с контролем (см. табл., рис. 1, Б, б, в).

В опытах со штаммом *Bacillus subtilis* 60015, который способен метаболизировать инозитол, было показано, что наличие D-глюкозы и других легко метаболизируемых углеводов в среде подавляет продукцию инозитол-2-дегидрогеназы (первый фермент в катаболическом пути мио-инозитола) (30). Исходя из этих данных, мы сделали предварительное заключение, что штаммы *A. radiobacter* 10 и *P. chlororaphis* ПГ7 при культивировании на жидкой среде PSM используют глюкозу, а не фитат в качестве источника углерода и энергии.

Опыты, проведенные на жидкой среде PSM, не позволили однозначно сделать вывод о способности штаммов к ферментативному гидролизу фитата натрия, поскольку проверка влияния подкисления среды на дефосфоризацию фитата в этом случае дала положительные результаты. При понижении рН 0,5 % водного раствора фитата натрия с 6,50 до 4,19 наблюдалось существенное (на 16,7 %) увеличение содержания свободного ортофосфата в растворе — с $0,048 \pm 0,001$ до $0,056 \pm 0,006$ мг P_2O_5 /мл за 1 ч при комнатной температуре. В то же время существенное положительное влияние на продукцию внеклеточной фитазы у микроорганизмов может оказывать наличие в среде фитата натрия и глюкозы, а также аэрация, о чем свидетельствуют данные, полученные для *P. aeruginosa* (50), *Mucor racemosus* NRRL (51) и *Bacillus subtilis* DR6 (52). На этом основании мы сделали предварительное заключение, что фосфорное питание штаммов в жидкой среде PSM осуществлялось за счет свободного ортофосфата, запасы которого пополнялись в результате как неферментативного гидролиза фитата при подкислении среды, так и ферментативного гидролиза фитата.

В опытах на плотных средах мы установили, что *P. chlororaphis* ПГ7 способен растворять неорганические фосфаты (трикальцийфосфат, гидроксипатит), а также органический фосфат (фитат кальция). Об этом свидетельствовало образование зон гало вокруг колоний при культивировании штамма на средах NBRIP, глюкозо-аспарагиновой (по Г.С. Муромцеву) и PSM (рис. 2, А). Полученные результаты согласуются с данными о способности некоторых видов граммотрицательных бактерий из рода *Pseudomonas* растворять фосфаты кальция по схеме солюбилизации (13). Данные о солюбилизующей способности *P. chlororaphis* в специальной литературе очень скудны (53). Полученные нами сведения позволяют рассматривать штамм *P. chlororaphis* ПГ7 не только как агент в биологической защите растений от патогенов, но и как стимулятор роста, улучшающий фосфор-

ное питание.

Отсутствие зон гало вокруг колоний, образованных штаммом *A. radiobacter* 10 на тех же плотных средах, указывало на то, что он не обладал способностью к солюбилизации минеральных фосфатов и фитата кальция (см. рис. 2, Б). Как следует из источников литературы, многие представители рода *Rhizobium* — такие потенциальные солюбилизаторы. Они выделяют низкомолекулярные органические кислоты и растворяют неорганические фосфаты (11), чему способствует наличие глюкозы в среде (12). Остается необъяснимым отсутствие гало на агаризованной среде PSM, поскольку, как отмечалось ранее, жидкая среда PSM сильно подкислялась при культивировании штамма (см. табл.). Можно предположить, что это обусловлено меньшей метаболической активностью штамма *A. radiobacter* 10 на плотной среде по сравнению с жидкой.

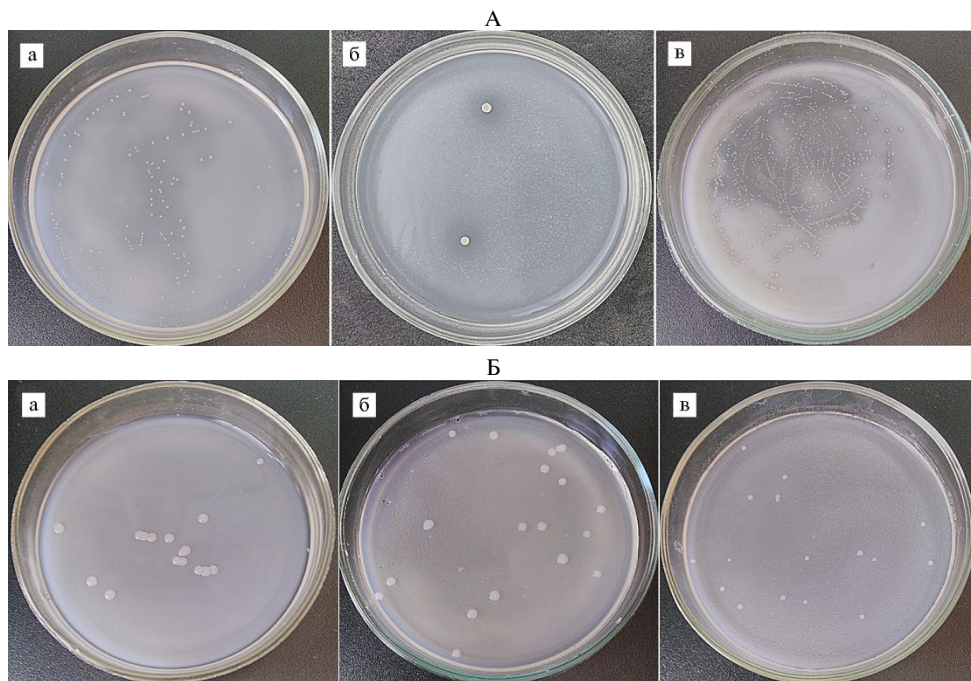


Рис. 2. Рост штаммов *Pseudomonas chlororaphis* ПГ7 (А) и *Agrobacterium radiobacter* 10 (Б) на среде NBRIP с трикальцийфосфатом (а), на глюкозо-аспарагиновой среде с гидроксипатитом (по Г.С. Муромцеву) (б) и на среде PSM с фитатом кальция (в). Состав сред см. в разделе «Методика».

Обсуждая наличие у штаммов фитазной активности с учетом физико-химических свойств фитиновой кислоты и ее комплексов с металлами (20, 54), можно сделать заключение о том, что зоны просветления вокруг бактериальных колоний на плотной среде не могут служить убедительным признаком дефосфоризации фитата кальция под действием фитазы, поскольку кислотообразующие бактерии способны растворять фитат кальция по схеме солюбилизации, как видно на примере с *P. chlororaphis* ПГ7. О ложноположительных результатах, получаемых на плотных средах при тестировании кислотообразующих бактерий на способность к ферментативному гидролизу фитата кальция, известно также из литературы (55). На этом основании можно рекомендовать для изучения способности бактерий к мобилизации фосфора из фитатов использовать жидкие, а не плотные среды или воспользоваться приемом, который позволяет нейтрализовать зоны гало, образованные в результате подкисления среды PSM, и сохранить те, что по-

явились в результате ферментативного гидролиза фитата кальция (55).

Таким образом, штамм *Agrobacterium radiobacter* 10 может использоваться фитат натрия в качестве источника углерода и фосфора при отсутствии других более доступных источников, тогда как штамм *Pseudomonas chlororaphis* ПГ7 такой способностью не обладает. При этом *A. radiobacter* 10 ферментативно гидролизует фитат, в результате чего в среду выделяется свободный ортофосфат, а в осадке бактериальных клеток накапливается иммобилизованный фосфор. Показано, что при культивировании в жидкой среде с двумя источниками углерода, глюкозой и фитатом натрия, оба штамма активно размножаются, используя глюкозу в качестве источника углерода. При этом происходит сильное подкисление среды, что способствует неферментативному гидролизу фитата. Это не позволяет сделать однозначной вывод о способности штаммов к ферментативному гидролизу фитата. Показано, что штамм *P. chlororaphis* ПГ7 способен растворять неорганические фосфаты (трикальцийфосфат, гидроксиапатит) и органический фосфат (фитат кальция) по схеме солиubilизации при культивировании на плотных питательных средах, тогда как *A. radiobacter* 10 таким свойством не обладает. Анализ на способность штаммов бактерий к растворению минеральных и органических фосфатов по схеме солиubilизации целесообразно проводить на плотных питательных средах с выявлением зон просветления вокруг колоний, тогда как ферментативный гидролиз фитатов необходимо оценивать в жидких средах во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Основным показателем способности штаммов осуществлять ферментативный гидролиз фитатов служит накопление иммобилизованного фосфора в осадке бактериальных клеток и свободного ортофосфата в культуральной среде.

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
микробиологии,

196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: krosh15_02@mail.ru, sotvk@yandex.ru, vdvalerie21@mail.ru,
laktionov@list.ru, lidija-jacobi@yandex.ru ✉

Поступила в редакцию
15 ноября 2021 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2022, V. 57, № 1, pp. 158-170

THE STUDY OF *Agrobacterium radiobacter* 10 AND *Pseudomonas fluorescens* PG7 PHOSPHATE-MOBILIZING ABILITIES *in vitro*

S.V. Zheleznyakov, T.V. Kalinina, V.K. Deeva, Yu.V. Laktionov, L.M. Jacobi ✉

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail krosh15_02@mail.ru, sotvk@yandex.ru, vdvalerie21@mail.ru, laktionov@list.ru, lidija-jacobi@yandex.ru (✉ corresponding author)

ORCID:

Zheleznyakov S.V. orcid.org/0000-0001-5321-4051

Laktionov Y.V. orcid.org/0000-0001-6241-0273

Kalinina T.V. orcid.org/0000-0003-1255-6498

Jacobi L.M. orcid.org/0000-0003-0387-5024

Deeva V.K. orcid.org/0000-0001-8387-2602

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially from the Russian Foundation for Basic Research (the project No. 19-016-00197)

Received November 15, 2021

doi: 10.15389/agrobiology.2022.1.158eng

Abstract

There is a need to improve the phosphorus nutrition of agricultural plants due to the mobilization of phosphorus from hard-to-reach soil compounds and fertilizers by useful rhizosphere microorganisms (PGPB). For this purpose, phosphate-mobilizing bacteria are being selected to create biologicals with a fertilizing action. Here, our research data for the first time show that the strain *Agrobacterium radiobacter* 10 can metabolize phytate to utilize it as a source of carbon and energy in the absence of other sources, and the strain *Pseudomonas chlororaphis* PG7 can solubilize inorganic phosphates (tricalcium phosphate, hydroxyapatite) and organic phosphates (calcium phytate). The aim of the work is to investigate the potential of phosphate-mobilizing ability of two strains, *A. radiobacter* 10 and *P. chlororaphis* PG7. The stock cultures were propagated on pea agar (according to Khotyanovich).

The phosphate mobilizing ability of the strains was assessed in vitro on selective nutrient media at 28 °C. Dephosphorylation of sodium phytate was examined in two liquid media. Medium II had the following composition (g/l distilled water): (NH₄)₂SO₄ — 1.0, K₂SO₄ — 0.2, Na phytate (Sigma-Aldrich, USA) — 10, corn extract — 0.2, pH 6.8. PSM (phytase screening medium) composition was as follows (g/l distilled water): D-glucose — 15.0, (NH₄)₂SO₄ — 5.0, KCl — 0.5, MgSO₄ · 7H₂O — 0.1, NaCl — 0.1, CaCl₂ · 2H₂O — 0.1; FeSO₄ · 7H₂O — 0.01, MnSO₄ · 7H₂O — 0.01; Na phytate (Sigma-Aldrich, USA) — 5, pH 6.5. The content of total phosphorus added to media with Na phytate was determined by the method of E. Truog and A.H. Meyer modified by J.B. Rodriguez et al. (1994) after ashing as per N.E. Ginsburg and G.M. Shcheglova (1960). The growth of strains in liquid media was estimated by the bacteria abundance (CFU/ml of suspension) during incubation. The ability of the strains to solubilize inorganic phosphates (tricalcium phosphate, hydroxyapatite) and organic phosphate (calcium phytate) was carried out on three solid nutrient media, the NBRIP, glucose-aspartic medium (according to G.S. Muromtsev) and PSM. NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) composition was as followed (g/l of distilled water): D-glucose — 10, Ca₃(PO₄)₂ — 5.0, MgCl₂ · 6H₂O — 5.0, MgSO₄ · 7H₂O — 0.25, KCl — 2.0, (NH₄)₂SO₄ — 0.1, agar-agar — 20, pH 6.8. The glucose-aspartic medium with hydroxyapatite (according to G.S. Muromtsev) (43) contained (g/l of distilled water) D-glucose — 10, asparagine — 1, K₂SO₄ — 0.2, MgSO₄ · 7H₂O — 0.2, corn extract — 0.2, Ca₅(PO₄)₃O₅ — 4, agar-agar — 20, pH 6.8. The PSM composition is as hereinabove, added with agar-agar 20 g/l, pH 6.5 adjusted to by adding a 1 % aqueous solution of Ca(OH)₂ to convert soluble sodium phytate into insoluble calcium phytate. The formation of halos around the colonies was recorded. The research revealed that *A. radiobacter* 10 cultured in the liquid medium uses phytate as a source of carbon and phosphorus for growth and enzymatically dephosphorylates phytate. This was evidenced by a significant increase in abundance of the bacteria during 4-day growth, a relatively small decrease in pH of the liquid broth compared to the control without inoculation, and the accumulation of immobilized phosphorus in the bacterial cell sediment and free orthophosphate in the liquid medium. *P. chlororaphis* PG7 could not mobilize phytate in the medium II. In particular, despite an increase in the *P. chlororaphis* PG7 abundance, there was no noticeable accumulation of bacterial cell sediment and free orthophosphate in the liquid medium. It was shown that when cultured in the liquid PSM, both strains actively grew and multiplied, obviously using glucose as a source of carbon and energy. Under these conditions, a significant amount of immobilized phosphorus accumulated in the bacterial cell sediment, while the content of free orthophosphate in the medium remained at the control level. In addition, bacterial growth led to significant acidification of the medium, which contributed to the non-enzymatic hydrolysis of sodium phytate. Therefore, the research data could not drive to an unambiguous conclusion about the ability of strains to enzymatic hydrolysis of sodium phytate when cultured in the liquid PSM with two carbon sources. The halos around the colonies of *P. chlororaphis* PG7 on solid media indicated its ability to dissolve inorganic phosphates and phytin by solubilization. Unlike the *Pseudomonas* strain, the *A. radiobacter* 10 showed no solubilizing ability. This indicates its individual physiological features, since, as follows from special publication, many representatives of the genus *Rhizobium* are potential solubilizers. Thus, the ability of strains to solubilize mineral phosphates should be tested on solid nutrient media, where the formation of halos around colonies is a criterion for evaluating phosphate dephosphorization. The ability of strains to mobilize phosphorus from phytates should be assessed in liquid media in order to avoid false positive or false negative results. The main indicators of the enzymatic hydrolysis of phytates are the accumulation of immobilized phosphorus in the sediment of bacterial cells and free orthophosphate in the medium.

Keywords: phosphate-mobilizing ability, *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens*, phytate, tricalcium phosphate, hydroxyapatite, selective nutrient media, immobilized phosphorus, orthophosphate.

REFERENCES

1. Polevoi V.V. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology]. Moscow, 1989 (in Russ.).
2. Lambers H., Chapin F.S., Pons T.L. *Plant Physiological Ecology*. Second edition. Springer, New York, 2008.
3. Marschner H. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London, 1995 (doi: 10.1016/B978-0-12-473542-2.X5000-7).
4. Karandashov V., Bucher M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(1): 22-29 (doi: 10.1016/j.tplants.2004.12.003).
5. Casieri L., Lahmidi N.A., Doidy J., Veneault-Fourrey C., Migeon A., Bonneau L., Courty P. E., Garcia K., Charbonnier M., Delteil A., Brun A., Zimmermann S., Plassard C., Wipf D. Biotrophic transportome in mutualistic plant-fungal interactions. *Mycorrhiza*, 2013, 23(8): 597-625 (doi: 10.1007/s00572-013-0496-9).
6. Ganzhara N.F. *Pochvovedenie s osnovami geologii* [Soil science with the basics of geology]. Moscow, 2013 (in Russ.).
7. Sheudzhen A.KH. *Agrokimiya. CH. 4. Fundamental'naya agrokimiya: uchebnoe posobie* [Agrochemistry. Part 4. Fundamental agrochemistry: textbook]. Krasnodar, 2016 (in Russ.).

8. Richardson A.E., Lynch J.P., Ryan P.R., Delhaize E., Smith F.A., Smith S.E., Harvey P.R., Ryan M.H., Veneklaas E.J., Lambers H., Oberson A., Culvenor R.A., Simpson R.J. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil*, 2011, 349: 121-156 (doi: 10.1007/s11104-011-0950-4).
9. Shaposhnikov A.I., Belimov A.A., Kravchenko L.V., Vivanko D.M. Interaction of rhizosphere bacteria with plants: mechanisms of formation and factors of efficiency in associative symbiosis (review). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*, 2011, 3: 16-22 (in Russ.).
10. Goldstein A.H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*, 1986, 1(2): 51-57 (doi: 10.1017/S0889189300000886).
11. Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabharathi R., Varshney R.K., Laxmipathi Gowda C.L., Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 2015, 5: 355-377 (doi: 10.1007/s13205-014-0241-x).
12. Jinturkar B.P. An application of phosphate solubilization by rhizobium strains: a study. *Accent Journal of Economics Ecology & Engineering*, 2016, 1(5): 1-3.
13. Oteino N., Lally R.D., Kiwanuka S., Lloyd A., Ryan D., Germaine K.J., Dowling D.N. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6(745): 1-9 (doi: 10.3389/fmicb.2015.00745).
14. Liu M., Liu X., Cheng B.-S., Ma X.-L., Lyu X.-T., Zhao X.-F., Ju Y.-L., Min Z., Fang Y.-L. Selection and evaluation of phosphate-solubilizing bacteria from grapevine rhizospheres for use as biofertilizers. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2016, 14(4): e1106 (doi: 10.5424/sjar/2016144-9714).
15. Mohandas S., Poovarasan S., Panneerselvam P., Saritha B., Upreti K.K., Kamal R., Sita T. Guava (*Psidium guajava* L.) rhizosphere *Glomus mosseae* spores harbor actinomycetes with growth promoting and antifungal attributes. *Scientia Horticulturae*, 2013, 150: 371-376 (doi: 10.1016/j.scienta.2012.11.019).
16. Battini F., Cristani C., Giovannetti M., Agnolucci M. Multifunctionality and diversity of culturable bacterial communities strictly associated with spores of the plant beneficial symbiont *Rhizophagus intraradices*. *Microbiological Research*, 2016, 183: 68-79 (doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.012>).
17. Vozbutskaya A.E. *Khimiya pochvy* [Soil chemistry]. Moscow, 1968.
18. Sparvoli F., Cominelli E. Biofortification and phytic acid reduction: a conflict of interest for the plant? *Plants*, 2015, 4(4): 728-755 (doi: 10.3390/plants4040728).
19. Balaban N.P., Suleimanova A.D., Valeeva L.R., Shakirov E.V., Sharipova M.R. *Biokhimiya*, 2016, 81(8): 1011-1020 (in Russ.).
20. Oh B.-C., Choi W.-C., Park S.-C., Kim Y.-O., Oh T.-K. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63: 362-372 (doi: 10.1007/s00253-003-1345-0).
21. Lei X.G., Porres J.M. Phytase: an enzyme to improve soybean nutrition. In: *Soybean and nutrition*. H.A. El-Shemy (ed.). InTech, Rijeka, Croatia, 2011 (doi: 10.5772/20128).
22. Jorquera M., Martinez O., Maruyama F., Marschner P., de la Luz Mora M. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase producing bacteria. *Microbes and Environments*, 2008, 23(3): 182-191 (doi: 10.1264/jsme2.23.182).
23. Mukhametzhanova A.D., Akhmetova A.I., Sharipova M.R. *Mikrobiologiya*, 2012, 81(3): 291-300 (in Russ.).
24. Hayatsu M. Utilization of phytic acid by cooperative interaction in rhizosphere. *Microbes and Environments*, 2013, 28(1): 1-2 (doi: 10.1264/jsme2.ME2801rh).
25. Lei X.G., Porres J.M., Mullaney E.J., Brinch-Pedersen H. Phytase: source, structure and application. In: *Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications*. J. Polaina, A.P. Maccabe (eds.). Springer, Dordrecht, 2007: 505-529 (doi: 10.1007/1-4020-5377-0_29).
26. Jatuwong K., Suwannarach N., Kumla J., Penkhrue W., Kakumyan P., Lumyong S. Bioprocess for production, characteristics and biotechnological applications of fungal phytases. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 188 (doi: 10.3389/fmicb.2020.00188).
27. Quan Ch., Zhang L., Wang Y., Ohta Y. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 92(2): 154-160 (doi: 10.1016/S1389-1723(01)80217-6).
28. Demirkan E., Baygin E., Usta A. Screening of phytate hydrolysis *Bacillus* sp. isolated from soil and optimization of the certain nutritional and physical parameters on the production of phytase. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2014, 39(2): 206-214 (doi: 10.5505/TJB.2014.26817).
29. Onawola O.O., Akande I.S., Okunowo W.O., Osuntoki A.A. Isolation and identification of phytase-producing *Bacillus* and *Enterobacter* species from Nigerian soils. *Nigeria Journal of Biotechnology*, 2019, 36(2): 127-138 (doi: 10.4314/njb.v36i2.13).
30. Mukhametzhanova A.D., Marenova I.O., Sharipova M.R. *Mikrobiologiya*, 2013, 82(1): 52-58 (in Russ.).
31. Hill J.E., Kysela D., Elimelech M. Isolation and assessment of phytate-hydrolysing bacteria from the DelMarVa Peninsula. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(12): 3100-3107 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01420.x).
32. Tereshchenko N.N. *Bioudobreniya na osnovе mikroorganizmov: uchebnoe posobie* [Biofertilizers based on microorganisms: a study guide]. Tomsk, 2003 (in Russ.).
33. Unno Y., Okubo K., Wasaki J., Shinano T., Osaki M. Plant growth promotion abilities and

- microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(3): 396-404 (doi: 10.1111/J.1462-2920.2004.00701.X).
34. Balaban N.P., Suleimanova A.D., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Rudakova N.L., Sharipova M.R., Shakirov E.V. Microbial phytases and phytate: exploring opportunities for sustainable phosphorus management in agriculture. *American Journal of Molecular Biology*, 2017, 7(1): 11-29 (doi: 10.4236/ajmb.2017.71002).
 35. Yoshida K., Yamaguchi M., Morinaga T., Kinehara M., Ikeuchi M., Ashida H., Fujita Y. myo-inositol catabolism in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(16): 10415-10424 (doi: 10.1074/jbc.M708043200).
 36. Rodriguez H., Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 1999, 17(4-5): 319-339 (doi: 10.1016/S0734-9750(99)00014-2).
 37. Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P., van der Putten W.H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11: 789-799 (doi: 10.1038/nrmicro3109).
 38. Pérez-García A., Romero D., de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological application of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(2): 187-193 (doi: 10.1016/j.copbio.2010.12.003).
 39. Krinke O., Novotná Z., Valentová O., Martinec J. Inositol trisphosphate receptor in higher plants: is it real? *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(3): 361-376 (doi: 10.1093/jxb/erl220).
 40. Johnson T.D. *Use of synergistic microorganisms and nutrients to produce signals that facilitate the germination and plant root colonization of mycorrhizal fungi in phosphorus rich environments. United States Patent No.: US 9,017,442 B2. Date of Patent: Apr. 28, 2015.*
 41. Pavlova V.F., Muromtsev G.S., Getmanskaya O.I. *Shtamm bakterii Agrobacterium radiobacter VNIISKhM-10 dlya polucheniya udobreniya pod ovoshchnye kul'tury. Baza patentov SSSR, № patenta: 1756318. Vsesoyuznyi nauchno-issledovatel'skii institut sel'skokhozyaystvennoi mikrobiologii. Zayavka 4665197 23.03.1989. MPK: C05F 11/08, C12N 1/20. Opubl. 23.08.1992* [Bacterial strain *Agrobacterium radiobacter* VNIISKhM-10 for obtaining fertilizer for vegetable crops. Base of patents of the USSR, patent number: 1756318. All-Union Research Institute of Agricultural Microbiology. Application 4665197 23.03.1989. MPK: C05F 11/08, C12N 1/20. Publ. 23.08.1992] (in Russ.).
 42. Kozhemyakov A.P., Belobrova S.N., Orlova A.G. Creating and analyzing a database on the efficiency of microbial preparations of complex action. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*, 2011, 3: 112-115 (in Russ.).
 43. *Metodicheskie ukazaniya po vydeleniyu mikroorganizmov, rastvoryayushchikh trudnodostupnye mineral'nye i organicheskie soedineniya fosfora /Pod redaktsiei G.S. Muromtseva* [Guidelines for the isolation of microorganisms that dissolve hard-to-reach mineral and organic phosphorus compounds. G.S. Muromtsev (ed.)]. Leningrad, 1981 (in Russ.).
 44. Sasirekha B., Bedashree T., Champa K.I. Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6. *European Journal of Experimental Biology*, 2012, 2(1): 95-104.
 45. Nautiyal C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 170(1): 265-270 (doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x).
 46. *Agrokhimicheskie metody issledovaniya pochv /Pod redaktsiei A.V. Sokolova* [Agrochemical methods of soil research. A.V. Sokolova (ed.)]. Moscow, 1975 (in Russ.).
 47. Rodriguez J.B., Self J.R., Soltanpour P.N. Optimal conditions for phosphorus analysis by the ascorbic acid-molybdenum blue method. *Soil Scienc Society of America Journal*, 1994, 58(3): 866-870 (doi: 10.2136/sssaj1994.03615995005800030034x).
 48. Ginzburg K.E., Shecheglova G.M. *Pochvovedenie*, 1960, 5: 100-105 (in Russ.).
 49. Dospikhov B.A. *Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoi obrabotki rezul'tatov issledovaniy)* [Methods of field trials]. Moscow, 1973 (in Russ.).
 50. Sasirekha, B., Bedashree T., Champa K.I. Statistical optimization of medium components for improved phytase production by *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of ChemTech Research*, 2012, 4(3): 891-895.
 51. Bogar B., Szakacs G., Pandey A., Abdulhameed S., Linden J.C., Tengerdy R.P. Production of phytase by *Mucor racemosus* in solid-state fermentation. *Biotechnology Progress*, 2003, 19(2): 312-319 (doi: 10.1021/bp020126v).
 52. Singh N.K., Joshi D.K., Gupta R.K. Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2013, 6(5): 6419 (doi: 10.5812/jjm.6419).
 53. Klykova M.V., Dunajtsev I.A., Zhigletsova S.K., Kondrashenko T.N., Lev I.O., Sosna I. M., Torgonina I.V., Varlamova T.A. *Phosphate-dissolving strain Pseudomonas chlororaphis ssp chlororaphis vsk-26a3 with fungicidal and bactericidal activity. Russian Federation Patent No.: RU 2 603 281(13) C1. Date of publication: 27.11.2016. Bull. № 33.*
 54. *Spravochnik khimika 21. Fitinovaya kislota* [Chemist's handbook 21. Phytic acid] (in Russ.). Available: <https://www.chem21.info/>. No date.
 55. Bae H.D., Yanke L.J., Cheng K.-J., Selinger L.B. A novel staining method for detecting phytase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 39(1): 17-22 (doi: 10.1016/S0167-7012(99)00096-2).