

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ВЫХОДА БИОМАССЫ И СОХРАНЕНИЯ ФОСФАТ-МОБИЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ШТАММА *PANTOEA BRENNERI* 3.5.2

Е.А. Егорова, Л.В. Сокольников, Д.С. Бульмакова, А.Д. Сулейманова  
Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, г. Казань, Россия  
e-mail: egorova.evgenia@mail.ru

**Аннотация.** Оптимизированы условия культивирования и состав питательной среды для максимального выхода биомассы и сохранения высокой фосфат-мобилизующей активности штамма *P. brenneri* 3.5.2. Установлены оптимальные условия: температура культивирования 35°C, рН среды – 9.0, концентрация глюкозы – 9.8 г/л, концентрация сульфата аммония – 0.1 г/л.

**Ключевые слова:** фосфор, фосфат-солубилизирующие бактерии, PGPR, *Pantoea*, оптимизация.

**Введение.** Фосфор (P) является одним из важнейших минеральных элементов, необходимых для роста и развития растений [4]. Фосфор в почвах присутствует как в органической ( $P_{орг}$ ), так и в неорганической формах ( $P_{неорг}$ ).  $P_{неорг}$  в основном представлен в виде фосфатов кальция, алюминия и железа, а  $P_{орг}$  присутствует в виде фитатов и других хелатов. Несмотря на то, что почвы богаты данным макроэлементом, в виду его способности к комплексообразованию большая часть P является недоступной и тяжело усваивается растениями. Для удовлетворения потребности растений в фосфоре в сельском хозяйстве используются химические минеральные удобрения [5]. Однако после внесения большая часть фосфора из удобрений вступает во взаимодействие с компонентами почвы, переходит в труднорастворимые формы и становятся недоступной для растений. В свою очередь, чрезмерное внесение в почву фосфорных удобрений приводит к экологическим проблемам, таким как загрязнение грунтовых вод, эвтрофикации водоемов и другим [2].

Известно, что некоторые почвенные микроорганизмы способны переводить нерастворимые формы фосфора в растворимые. Их выделяют в группу микроорганизмов, солубилизирующих фосфаты (PSM) [4]. Высвобождение фосфатов может осуществляться путем синтеза микроорганизмами ферментов (фитазы, фосфатазы, C-P-лиазы), органических и неорганических кислот, сидерофоров [1]. Данная особенность позволила использовать PSM в качестве биоудобрений для повышения урожайности растений. При этом внесение таких биоудобрений в почву безопасно для окружающей среды и является экологически чистой альтернативой использованию или дополнению минеральных удобрений [4].

Известно, что в группу PSM входят бактерии рода *Pantoea* [2]. Помимо фосфатсолубилизирующей способности, представители *Pantoea sp.* обладают рядом других механизмов, способствующих росту растений, к которым относят биосинтез сидерофоров и ауксинов, выработка АСС-дезаминазы, фиксация азота. Данные микроорганизмы часто встречаются в ризосфере и являются эндофитами многих растений [3]. Использование биоудобрений на основе бактерий рода *Pantoea* может стать основой для решения проблемы недостатка доступного фосфора в почвах. Целью работы явилась оптимизация состава питательной среды и условий культивирования для максимального выхода биомассы клеток и эффективной фосфат-солубилизации штаммом *P. brenneri* 3.5.2.

**Материалы и методы.** Объектом исследования явился фосфат-мобилизующий штамм *P. brenneri* 3.5.2, выделенный ранее из проб почвы Республики Татарстан. Культивирование бактерий проводили на среде NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) (г/л dH<sub>2</sub>O): глюкоза – 10, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> – 5, MgCl – 5, MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O

– 0.25, KCl – 0.20, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0.10 (рН среды довели до 7.0 ± 0.2) в колбах объемом 100 мл при соотношении объема среды к объему колбы 1:5 в вибростенде с интенсивностью качания 200 об/мин при температуре 30°C. Образцы отбирали на 3 сутки культивирования. Контроль за ростом культуры осуществляли по изменению оптической плотности (ОП), которую определяли на спектрофотометре (X-Mark, BioRad) при длине волны 600 нм.

Для определения свободных фосфатов в культуральной жидкости клетки осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 8000 об/мин. Концентрацию свободных фосфатов в супернатанте определяли колориметрически по методике, основанной на способности неорганических фосфатов в кислой среде образовывать фосфорномолибденовокислый аммоний. В две опытные пробирки вносили по 100 мкл культуральной жидкости, в качестве контроля использовали среду без инокулята. Во все пробирки вносили по 750 мкл свежеприготовленного раствора ААМ (10 мМ гептомолибдат аммония, раствор 5Н Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и ацетон в соотношении 1:1:2). Спустя 2 мин в пробирки добавляли по 50 мкл 1М лимонной кислоты. Пробирки центрифугировали 5 минут при 8000 об/мин. Пробы выдерживали 1 минуту и измеряли ОП при длине волны 355 нм против контрольной пробы. Концентрацию свободных фосфатов высчитывали с помощью калибровочной кривой.

Оптимизацию условий культивирования и состава питательной среды проводили путем постановки двух многофакторных экспериментов. В качестве основы использовали питательную среду NBRIP. В первом случае варьировали значения рН среды (5.0, 7.0 и 9.0) и температуры культивирования (30, 35 и 40°C), во втором – концентрацию глюкозы (5.0, 10.0 и 15.0 г/л) и сульфата аммония (0.05, 0.1 и 0.15 г/л) в составе среды. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в программном обеспечении «STATGRAPHICS Plus».

**Результаты и их обсуждение.** На основе многофакторного эксперимента проводили оптимизацию условий культивирования и состава питательной среды для максимального выхода биомассы и эффективной фосфат-солюбилизации штаммом *P. brenneri* 3.5.2. На первом этапе варьировали значения рН среды и температуры культивирования. Показано, что максимальное накопление биомассы *P. brenneri* 3.5.2 (ОП<sub>600</sub>=9.5) наблюдали при температуре культивирования 34.9°C и значении рН среды - 9.0 (рисунок 1). Максимальная эффективность Р-солюбилизации штаммом наблюдалась при температуре культивирования 34.6°C и рН среды 7.0 (рисунок 2).

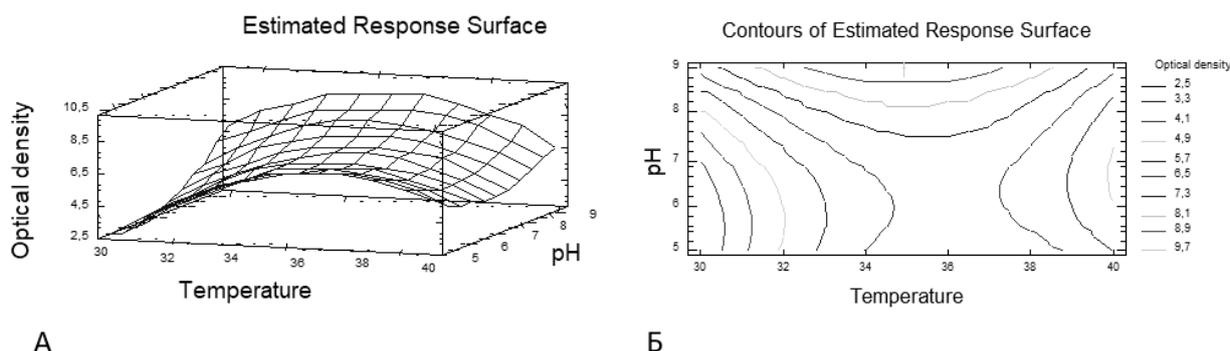
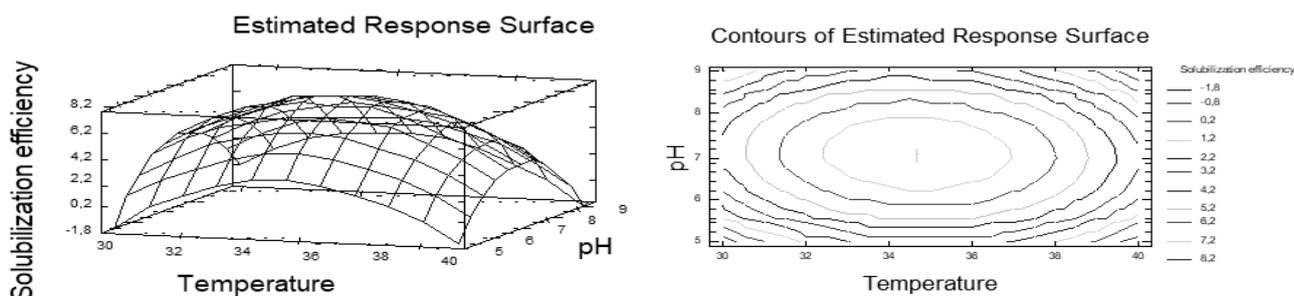


Рисунок 1. Корреляция между температурой культивирования, значением рН среды и биомассой *P. brenneri* 3.5.2 в виде поверхности отклика (А) и контурной диаграммой поверхности отклика (Б).



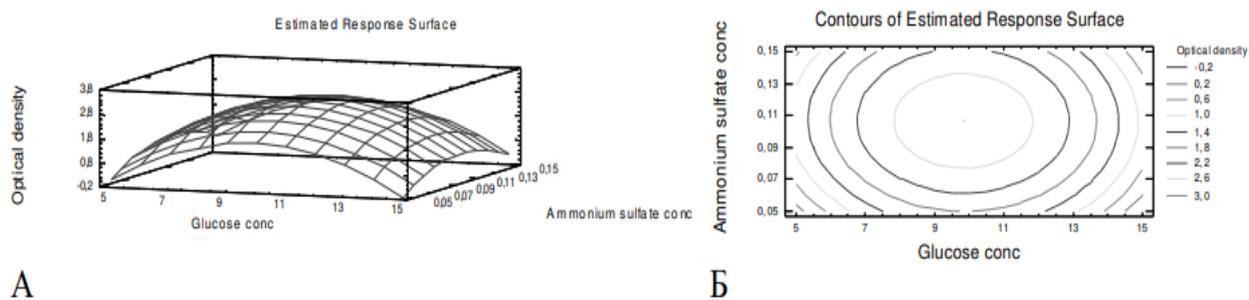
А

Б

Рисунок 2. Корреляция между температурой культивирования, значением рН среды и эффективностью Р-солубилизации штаммом *P. brenneri* 3.5.2 в виде поверхности отклика (А) и контурной диаграммой поверхности отклика (Б).

При анализе результатов многофакторного эксперимента установили, что как для максимального накопления биомассы, так и для сохранения высокой Р-солубилизующей активности штаммом *P. brenneri* 3.5.2 следует использовать температуру культивирования равную 35°C. Значения рН среды выше 6.0 не оказывали существенного влияния на эффективность биосолубилизации фосфора штаммом, тогда как накопление биомассы при более щелочном значении рН (9.0) выше, чем при рН 7.0. Таким образом, установлено, что оптимальными условиями для накопления биомассы и высокой Р-солубилизующей активности *P. brenneri* 3.5.2 является температура культивирования 35°C и исходный рН среды 9.0.

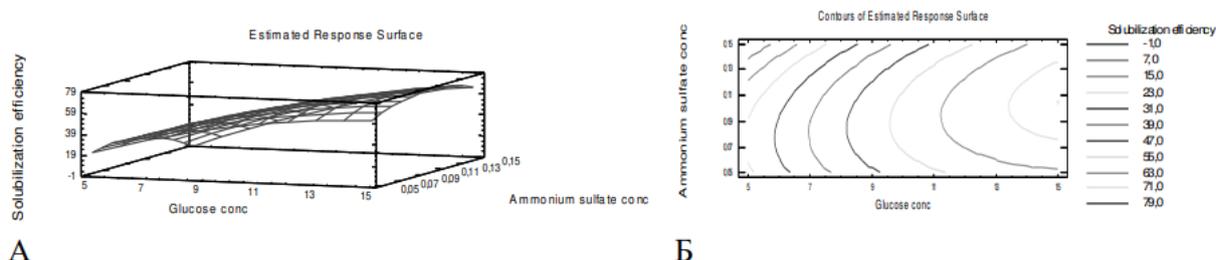
На втором этапе исследования варьировали концентрации источников углерода (глюкозы) и азота (сульфата аммония). Показано, что максимальное накопление биомассы *P. brenneri* 3.5.2 ( $ОП_{600}=2.9$ ) происходит при концентрации глюкозы в среде 9.8 г/л и сульфата аммония 0.1 г/л (рисунок 3). Анализируя данные эффективности Р-солубилизации, установили, что максимальное значение соответствовало 75% и наблюдалось при концентрации глюкозы в среде 15.0 г/л и сульфата аммония – 0.1 г/л (рисунок 4).



А

Б

Рисунок 3. Корреляция между концентрациями глюкозы, сульфата аммония и биомассой *P. brenneri* 3.5.2 в виде поверхности отклика (А) и контурной диаграммой поверхности отклика (Б).



А

Б

Рисунок 4. Корреляция между концентрациями глюкозы, сульфата аммония и эффективностью солубилизации штаммом *P. brenneri* 3.5.2 в виде поверхности отклика (А) и контурной диаграммой поверхности отклика (Б).

При дальнейшем анализе результатов многофакторного эксперимента определили, что для максимального накопления биомассы штаммом *P. brenneri* 3.5.2 следует, использовать концентрацию глюкозы 9.8 г/л и сульфата аммония 0.1 г/л. При варьировании концентраций компонентов питательной среды в большую и меньшую стороны наблюдалось снижение уровня накопления биомассы бактериальными клетками. В то же время, эффективность Р-солубилизации была максимальной при концентрации глюкозы и сульфата аммония в среде 15.0 и 0.1 г/л, соответственно. Таким образом, для определения оптимальной концентрации глюкозы с целью повышения эффективности Р-солубилизации штаммом необходимо расширить диапазон исследуемых значений. Однако концентрации глюкозы выше 9.8 г/л ингибировали рост культуры, но не оказывали сильного влияния на эффективность солубилизации, которая составляла более 60% при концентрации глюкозы 9 г/л и выше. Исходя из этого, оптимальная концентрация глюкозы в среде для достижения максимальной продукции биомассы и сохранения высокой Р-солубилизирующей активности составила 9.8 г/л. При этом концентрацию сульфата аммония необходимо использовать в установленной нами оптимальной концентрации 0.1 г/л. Для штамма *P. agglomerans* ZB показано положительное влияние глюкозы в концентрации от 12.5 до 15.0 г/л на рост бактерий и биосолубилизацию. Тогда как при повышении концентрации глюкозы исследователи наблюдали ингибирование обоих параметров. Также авторы сообщают, что при изменении концентрации сульфата аммония в диапазоне 0.2-0.4 г/л наблюдалось увеличение роста культуры, однако повышение количества свободных фосфатов в среде было не очевидным [2].

Таким образом, установлен оптимизированный состав среды NBRIP для максимального выхода биомассы *P. brenneri* 3.5.2 с сохранением высокой фосфатмобилизующей активности (г/л dH<sub>2</sub>O): глюкоза – 9.8, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> – 5, MgCl — 5, MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O – 0.25, KCl – 0.20, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0.10, pH 9.0. При этом культивирование следует проводить при температуре 35°C.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансирована грантом РФФ 22-16-00138.

#### Библиографический список

1. Alori E.T., Glick B.R., Babalola O.O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture // *Frontiers in Microbiology*. 2017. V.8. P. 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
2. Li L., Chen R., Zuo Z., Lv Z., Yang Z., Mao W., Liu Y., Zhou Y., Huang J., Song Z. Evaluation and improvement of phosphate solubilization by an isolated bacterium *Pantoea agglomerans* ZB // *World J Microbiol Biotechnol*. 2020. V.36(2). P. 27. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2744-4>
3. Mei C., Chretien R.L., Amaradasa B.S., He Y., Turner A., Lowman S. Characterization of Phosphate Solubilizing Bacterial Endophytes and Plant Growth Promotion In Vitro and in Greenhouse // *Microorganisms*. 2021. V.9(9). P. 1-11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091935>
4. Tariq M.R., Shaheen F., Mustafa S., Ali S., Fatima A., Shafiq M., Safdar W., Sheas M.N., Hamees A., Nasir M.A. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from medicinal plants improve growth of mint // *PeerJ*. 2022. V.10. P. 1-19. <https://doi.org/10.7717/peerj.13782>
5. Qiao H., Sun X.R., Wu X.Q., Li G.E., Wang Z., Li D.W. The phosphate-solubilizing ability of *Panicillium guanacastense* and its effects on the growth of *Pinus massoniana* in phosphate-limiting conditions // *Biol Open*. 2019. V.8(11). P. 1-10. <https://doi.org/10.1242/bio.046797>