

УДК 579.22

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *PRIESTIA MEGATERIUM* Cp-1 И *RHODOCOCCUS JOSTII* CA-6, УСТОЙЧИВЫХ К СОЛЕВОМУ СТРЕССУ

Н. И. НАУМОВИЧ¹⁾, З. М. АЛЕЩЕНКОВА¹⁾,
И. Н. АНАНЬЕВА¹⁾, Г. В. САФРОНОВА¹⁾

¹⁾Институт микробиологии НАН Беларуси,
ул. Академика Купревича, 2, 220141, г. Минск, Беларусь

Показано, что штаммы *Priestia megaterium* Cp-1 и *Rhodococcus jostii* CA-6 сохраняют способность к фосфат-солубилизации, азотфиксации и синтезу индолил-3-уксусной кислоты в условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия в диапазоне концентраций 1197–2052 ммоль/л, а также положительно влияют на всхожесть семян и развитие проростков редиса розово-красного. Установлено, что пролин, бетаин и сахароза оказывают положительный эффект на рост штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 и их способность адаптироваться к осмотическому стрессу. В ходе масс-спектрометрического анализа выявлено, что внутриклеточное образование пролина и бетаина у исследованных бактерий пропорционально связано с концентрацией хлорида натрия: при увеличении содержания NaCl в среде до 1197 ммоль/л уровень пролина повышается с 0,062 до 1,502 мкг/мл (*Rh. jostii* CA-6) и с 0,089 до 2,105 мкг/мл (*P. megaterium* Cp-1), а уровень бетаина – с 0,071 до 0,118 мкг/мл (*Rh. jostii* CA-6) и с 0,055 до 0,219 мкг/мл (*P. megaterium* Cp-1).

Ключевые слова: азотфиксация; фосфатсолубилизация; ростостимуляция; осмолиты; солевой стресс.

CHARACTERISTIC OF STRAINS *PRIESTIA MEGATERIUM* Cp-1 AND *RHODOCOCCUS JOSTII* CA-6 DEMONSTRATING INCREASED SALT RESISTANCE

N. I. NAUMOVICH^a, Z. M. ALESCHENKOVA^a,
I. N. ANANYEVA^a, H. V. SAFRONOVA^a

^aInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
2 Akademika Kupreviča Street, Minsk 220141, Belarus
Corresponding author: N. I. Naumovich (naumovichnadezda@yandex.ru)

The strains *Priestia megaterium* Cp-1 and *Rhodococcus jostii* CA-6 were shown to preserve phosphate-solubilising ability, nitrogen-fixing activity and synthesis of indole-3-acetic acid under osmotic stress conditions caused by sodium

Образец цитирования:

Наумович НИ, Алещенкова ЗМ, Ананьева ИН, Сафронова ГВ. Характеристика штаммов *Priestia megaterium* Cp-1 и *Rhodococcus jostii* CA-6, устойчивых к солевому стрессу. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:60–72. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-60-72>

For citation:

Naumovich NI, Aleschenkova ZM, Ananyeva IN, Safronova HV. Characteristic of strains *Priestia megaterium* Cp-1 and *Rhodococcus jostii* CA-6 demonstrating increased salt resistance. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;2:60–72. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-60-72>

Авторы:

Надежда Ивановна Наумович – научный сотрудник лаборатории взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений.

Зинаида Михайловна Алещенкова – доктор биологических наук; главный научный сотрудник лаборатории взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений.

Ирина Николаевна Ананьева – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений.

Галина Владимировна Сафронова – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник лаборатории взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений.

Authors:

Nadezhda I. Naumovich, researcher at the laboratory of interactions between soil microorganisms and higher plants. naumovichnadezda@yandex.ru

Zinaida M. Aleschenkova, doctor of science (biology); chief researcher at the laboratory of interactions between soil microorganisms and higher plants.

z_aleschenkova@tut.by

Irina N. Ananyeva, PhD (biology), docent; head of the laboratory of interactions between soil microorganisms and higher plants.

ananeva@mbio.bas-net.by

Halina V. Safronova, PhD (biology), docent; leading researcher at the laboratory of interactions between soil microorganisms and higher plants.

hsafronova@mail.ru

chloride in concentration range of 1197–2052 mmol/L, as well as to promote seed germination rate and development of small radish seedlings. Proline, betaine and sucrose were found to exert a beneficial effect on growth and ability of strains *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6 to adapt to osmotic stress. Mass spectrometric analysis has revealed that intracellular synthesis of proline and betaine in both bacteria was directly proportional to sodium chloride concentration: rising NaCl level in the medium to 1197 mmol/L was accompanied by increase in proline level from 0.062 to 1.502 µg/mL (*Rh. jostii* CA-6) and from 0.089 to 2.105 µg/mL (*P. megaterium* Cp-1), in a similar manner betaine production grew up from 0.071 to 0.118 µg/mL (*Rh. jostii* CA-6) and from 0.055 to 0.219 µg/mL (*P. megaterium* Cp-1).

Keywords: nitrogen fixation; phosphate solubilisation; growth stimulation; osmolytes; salt-induced stress.

Введение

Высокое содержание солей в почве является серьезным экологическим стрессом, который негативно влияет на биологическую активность почвы и рост растений. Для минимизации отрицательного воздействия абиотических факторов окружающей среды на растения активно применяются микроорганизмы, способные стимулировать рост растений в условиях засоления [1].

Солеустойчивые микроорганизмы используют различные механизмы адаптации к осмотическому стрессу, положительно влияющие на рост и развитие растений. К ним относят обеспечение растений питательными веществами посредством азотфиксации, фосфатсолубилизации, синтеза осмопротекторов различной химической природы [2; 3]. Использование солеустойчивых ростостимулирующих ризобактерий в фиторемедиации агроэкосистем, страдающих от высокой концентрации солей в почве, указывает на их огромный потенциал [4].

В связи с вышеизложенным особый интерес представляют бактерии рода *Priestia* и рода *Rhodococcus*, которые широко распространены в экстремальных экосистемах и характеризуются высокой адаптивной способностью [5]. Ранее авторами были выделены и идентифицированы ростостимулирующий азотфиксирующий штамм *Rh. jostii* CA-6 и ростостимулирующий фосфатсолубилизирующий штамм *P. megaterium* Cp-1, растущие на среде, содержащей хлорид натрия в концентрации 2052 и 2565 ммоль/л соответственно. Данные штаммы перспективны для использования в технологии биоремедиации засоленных почв и улучшения роста растений в условиях солевого стресса [6].

Цель настоящей работы – изучить сохранность агрономически ценных свойств солеустойчивых бактерий *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 и их способность синтезировать осмолиты в условиях засоления.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись бактериальные штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6, выделенные из образцов почвы, отобранной на территории ОАО «Беларуськалий». Как указывалось выше, они способны расти на среде, содержащей 2565 ммоль/л (15 %) и 2052 ммоль/л (12 %) NaCl соответственно. Штаммы были идентифицированы с помощью секвенирования фрагмента гена 16S рРНК и масс-спектрометрии MALDI-TOF и депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под регистрационными номерами БИМ В-1314Д (*P. megaterium* Cp-1) и БИМ В-1353Д (*Rh. jostii* CA-6) [6].

Физиолого-биохимические свойства исследуемых штаммов изучены с использованием автоматического бактериологического анализатора VITEK® 2 Compact (BioMérieux, Франция) и тест-системы Mikrolatest (*Erba Lachema*, Германия) для идентификации микроорганизмов. Каталазную и оксидазную активность штаммов определяли согласно методике, изложенной в работе [7]. Окраску бактериальных штаммов осуществляли по Граму [7], микроскопирование проводили с помощью микроскопа Nikon E200 (Nikon, Япония).

В работе использовали следующие концентрации хлорида натрия, ммоль/л: 171 (1 %), 342 (2 %), 513 (3 %), 855 (5 %), 1197 (7 %), 1710 (10 %), 2052 (12 %).

Действие бактериальных штаммов *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 на всхожесть семян, рост и развитие проростков редиса розово-красного (*Raphanus sativus* var. *radicula*) в условиях засоления изучали с применением методов, изложенных в работе [8]. Семена контрольных растений замачивали в стерильной водопроводной воде, семена опытных растений – в 2 % растворе культуральной жидкости (КЖ), полученном путем внесения 2 мл КЖ в 98 мл стерильной водопроводной воды. Саму КЖ получали раздельным культивированием исследуемых штаммов в среде LB при скорости вращения лабораторной качалки (200 ± 20) об/мин и температуре (28 ± 2) °C в течение 48 ч. В чашках с контрольными образцами фильтровальную бумагу увлажняли стерильной водопроводной водой, в чашках с опытными образцами – раствором хлорида натрия в концентрации 171–855 ммоль/л.

Влияние хлорида натрия на способность штаммов синтезировать индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) исследовали в процессе культивирования штаммов в течение 48 ч в жидкой среде LB [9, р. 1335–1885], содержащей 0,1 % триптофана и 1197; 1710; 2052 ммоль/л хлорида натрия. Концентрацию ИУК определяли колориметрическим методом при длине волны 530 нм путем сравнения оптической плотности образцов со стандартной кривой, полученной при измерении оптической плотности раствора, содержащего ИУК в концентрации 10–100 мкг/мл [10].

Активность растворения фосфатов кальция в условиях засоления определяли в жидкой среде NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) [11], содержащей 5 г/л $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и 1197; 1710; 2052 ммоль/л NaCl, по методу, изложенному в работах [12; 13], с использованием спектрофотометра РВ 2201А (SOLAR, Беларусь) при длине волны 540 нм. Концентрацию растворимого фосфора определяли путем сравнения оптической плотности исследуемых образцов со стандартной кривой, полученной при измерении оптической плотности раствора, содержащего KH_2PO_4 в концентрации 2; 4; 8; 12; 20; 30 мкг/мл [13].

Азотфиксирующую активность штамма *Rh. jostii* CA-6 в условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия, измеряли ацетиленовым методом на газовом хроматографе Хромос ГХ-1000 (Хромос Инжиниринг, Россия) [14].

Влияние осмолитов различной химической природы на рост солеустойчивых штаммов изучали путем культивирования их в жидкой среде М9 [7], содержащей пролин, бетаин и сахарозу в концентрации 1 ммоль/л и хлорид натрия в концентрации 1197; 1710 и 2052 ммоль/л, в течение 72 ч с последующим высевом на поверхность плотной среды LB для определения титра жизнеспособных клеток [15].

Содержание пролина и бетаина в клетках определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 с масс-селективным детектором типа «тройной квадруполь» Agilent 6410 (Agilent Technologies Inc., США). Бактериальную биомассу штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 получали путем культивирования в среде М9, содержащей 1197 ммоль/л хлорида натрия, с последующим центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 5 мин. Полученную бактериальную биомассу разрушали с помощью ультразвука и фильтровали через шприцевый мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. ВЭЖХ проводили с использованием колонки Agilent Zorbax XDB-C18 (4,6 × 150 мм, 5 мкм) с температурой 40 °С в 0,1 % растворе трифторуксусной кислоты в деионизированной воде при скорости потока 0,5 мл/мин. Для количественного анализа бетаина и пролина осуществляли мониторинг заданных реакций (MRM) в режиме генерации положительных ионов при следующих переходах:

- m/z 118 → m/z 59 (бетаин);
- m/z 116 → m/z 70 (пролин).

В обоих случаях напряжение на фрагменторе и энергия в ячейке соударений составляли 100 и 20 В соответственно. Для построения калибровочной кривой использовали растворы пролина (*Acros Organics*, США) и бетаина (*Беллехимкомплект*, Беларусь) в деионизированной воде в диапазоне концентраций от 0,02 до 2,00 мкг/мл. Количественный анализ хроматограмм проводили с применением программного обеспечения *Agilent MassHunter Workstation* (версия B.01.03) (Agilent Technologies Inc.).

Статистическую обработку результатов осуществляли в программе *Microsoft Excel 2016*. Данные представлены в виде средних арифметических величин со среднестатистической ошибкой средних арифметических величин.

Результаты и их обсуждение

Использованные в работе штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 обладают комплексом агрономически ценных свойств и способны переносить абиотический стресс, вызванный повышенным содержанием хлорида натрия и дефицитом влаги в среде [6].

Бактерии *P. megaterium* Cp-1 – грамположительные спорообразующие аэробные палочки размером 5–7 мкм (рис. 1, а). Они образуют белые, округлые, выпуклые, непрозрачные, с жирно-блестящим и волнисто-бахромчатым краем колонии, способны расти в присутствии 2565 ммоль/л NaCl, при росте на МПА и среде Кинга В не образуют флуоресцирующий пигмент.

Бактерии *Rh. jostii* CA-6 – неподвижные прямые и слегка изогнутые грамположительные не образующие спор аэробные палочки (рис. 1, б). Они образуют округлые, с валиком по краю, выпуклые, непрозрачные, матовые, с концентрическими кругами и гладким краем колонии с розовым оттенком, способны расти в присутствии 2052 ммоль/л NaCl.

Изучение физиолого-биохимических свойств солеустойчивых штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 предполагало анализ их ферментативной и сахаролитической активности, а также устойчивости к антибиотикам и токсическим соединениям (табл. 1).

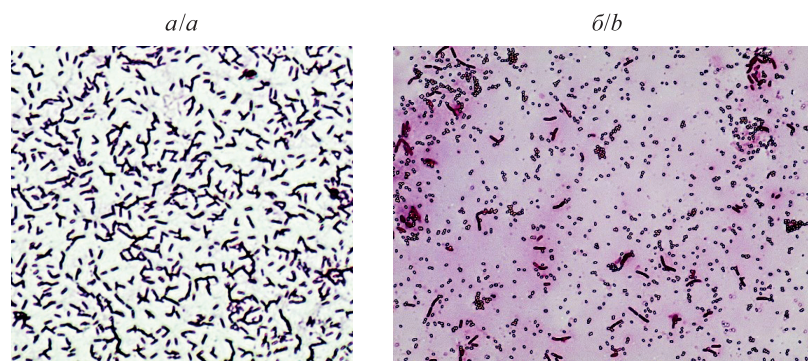


Рис. 1. Вид клеток штаммов *P. megaterium* Cp-1 (а) и *Rh. jostii* CA-6 (б) в световом микроскопе (увеличение $\times 1000$)

Fig. 1. The image of bacterial cells of *P. megaterium* Cp-1 (a) and *Rh. jostii* CA-6 (b) under light microscope (magnification $\times 1000$)

Таблица 1

Физиолого-биохимические свойства
штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6

Table 1

Physiological-biochemical properties
of strains *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6

Вещество	Штамм	
	<i>P. megaterium</i> Cp-1	<i>Rh. jostii</i> CA-6
Ферментативная активность		
Аланин-фенилаланин-пролинариламидаза	—	—
Аланинариламидаза	—	+
Лейцинариламидаза	—	+
Тирозинариламидаза	—	+
L-пролинариламидаза	—	—
L-пирролидонилиариламидаза	—	—
L-аспартатариламидаза	—	—
L-лизинариламидаза	—	—
α -Маннозидаза	—	—
β -Маннозидаза	—	—
α -Галактозидаза	+	+
β -Галактозидаза	+	+
α -Глюкозидаза	—	—
β -Галактопиранозидаза	+	—
β -Глюкоронидаза	—	—
β -Ксилозидаза	—	—
N-ацетил-D-глюкозамин	+	—
Аланиндигидролаза I	—	—
Аргининдигидролаза II	—	—
Уреаза	+	+
Фосфатидилинозитолфосфолипаза C	—	—
Алкализатор L-лактата	—	+
Метил-B-D-глюкопиранозидаза	+	—
Фосфатаза	+	+

Окончание табл. 1
Ending table 1

Вещество	Штамм	
	<i>P. megaterium</i> Cp-1	<i>Rh. jostii</i> CA-6
Сахаролитическая активность		
D-амигдалин	–	–
D-глюкоза	–	–
D-рибоза	+	+
D-раффиноза	+	–
D-ксилоза	+	–
D-сорбитол	–	–
D-манитол	+	+
D-манноза	–	–
D-мальтоза	+	+
D-трегалоза	+	+
Лактоза	+	–
Сахароза	+	+
Циклодекстрин	–	–
Инозитол	+	+
Гликоген	+	–
Салицин	+	–
Устойчивость к антибиотикам и токсическим соединениям		
Новобиоцин	–	–
Оптохин	+	–
Полимиксин В	–	+
Бацитрацин	+	–
O129	–	–
Олеандомицин	–	–

Результаты изучения влияния осмотического стресса, вызванного содержанием хлорида натрия в среде в концентрации 1197; 1710 и 2052 ммоль/л, на азотфиксирующую активность (*Rh. jostii* CA-6) и фосфат-солюбилизующую способность (*P. megaterium* Cp-1), а также синтез ИУК исследуемыми штаммами приведены в табл. 2 и 3.

Таблица 2

Влияние осмотического стресса на азотфиксирующую
активность и синтез ИУК штаммом *Rh. jostii* CA-6

Table 2

Effect of osmotic stress on nitrogen-fixing activity
and synthesis of indole-3-acetic acid by the strain *Rh. jostii* CA-6

Концентрация NaCl, ммоль/л	Азотфиксирующая активность, нмоль/л этилена на флакон за 3 сут	Количество ИУК, мкг/мл
0 (контроль)	43,90 ± 0,14	37,80 ± 0,09
1197	35,60 ± 0,24	12,40 ± 0,12
1710	26,20 ± 0,29	12,10 ± 0,03
2052	21,00 ± 0,28	9,90 ± 0,11

Таблица 3

Влияние осмотического стресса на фосфатсольбилизирующую
способность и синтез ИУК штаммом *P. megaterium* Cp-1

Table 3

Effect of osmotic stress on phosphate-solubilising ability
and synthesis of IAA by the strain *P. megaterium* Cp-1

Концентрация NaCl, ммоль/л	Концентрация растворимого фосфора, мкг/мл	Количество ИУК, мкг/мл
0 (контроль)	65,00 ± 0,71	89,70 ± 0,05
1197	64,10 ± 0,43	22,90 ± 0,03
1710	36,60 ± 0,92	15,20 ± 0,06
2052	29,60 ± 0,06	11,40 ± 0,03

Установлено, что засоление, вызванное содержанием хлорида натрия в среде в диапазоне концентраций 1197–2052 ммоль/л, снижает фосфатсольбилизирующую способность, азотфиксирующую активность и синтез ИУК. У штамма *Rh. jostii* CA-6 в условиях засоления выявлено уменьшение азотфиксирующей активности с 43,9 до 21,0 нмоль/л C_2H_4 на флакон за 3 сут и количества ИУК с 37,8 до 9,9 мкг на 1 мл КЖ (см. табл. 2). Показано, что концентрация растворенного фосфора в КЖ штамма *P. megaterium* Cp-1 в условиях засоления снижается с 65,0 до 29,6 мкг/мл, а ИУК – с 89,7 до 11,4 мкг/мл (см. табл. 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 сохраняют способность к фосфатсольбилизации, азотфиксации и синтезу ИУК в условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия.

В ходе дальнейшей работы изучено влияние осмолитов различной химической природы (пролин, бетаин и сахара в концентрации 1 ммоль/л) на рост солеустойчивых штаммов *P. megaterium* Cp-1 (табл. 4) и *Rh. jostii* CA-6 (табл. 5) в условиях засоления, вызванного хлоридом натрия в диапазоне концентраций 1197–2052 ммоль/л.

Установлено, что при глубинном культивировании штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 в среде, содержащей хлорид натрия в концентрации 1197 ммоль/л, соединение не оказывает негативного эффекта. Максимальный титр жизнеспособных клеток штамма *P. megaterium* Cp-1 ($1,17 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) достигается через 48 ч культивирования, а максимальный титр жизнеспособных клеток штамма *Rh. jostii* CA-6 ($2,60 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) – через 72 ч.

При культивировании штамма *P. megaterium* Cp-1 в среде, содержащей 1197 ммоль/л NaCl и осмолиты пролин, бетаин или сахарозу, установлено, что через 48 ч роста титр клеток равен $1,09 \cdot 10^8$; $1,14 \cdot 10^8$; $1,14 \cdot 10^8$ КОЕ/мл соответственно. Полученные данные свидетельствуют, что клетки *P. megaterium* при низких концентрациях соли в среде способны самостоятельно справляться с осмотическим стрессом, так как осмолиты не оказывают на них стимулирующего влияния (см. табл. 4).

Увеличение числа жизнеспособных клеток *Rh. jostii* CA-6 отмечено при выращивании штамма в среде, содержащей 1197 ммоль/л хлорида натрия и 1 ммоль/л осмолитов. Максимальное число колониеобразующих единиц штамма *Rh. jostii* выявлено при культивировании в среде, содержащей пролин и сахарозу ($4,93 \cdot 10^8$ и $5,20 \cdot 10^8$ КОЕ/мл соответственно) (см. табл. 5).

При концентрации хлорида натрия в среде 1710 ммоль/л для штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 отмечается снижение титра клеток, особенно заметное в первые 24 ч, что свидетельствует о негативном влиянии осмотического шока на бактериальные клетки. Для обоих штаммов характерно уменьшение количества клеток до 10^5 КОЕ/мл через 24 ч культивирования и восстановление их титра до 10^6 КОЕ/мл на 2-е сутки. В процессе культивирования штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 в среде, содержащей осмолиты в концентрации 1 ммоль/л и хлорид натрия в концентрации 1710 ммоль/л, не наблюдается снижения численности бактерий через 24 ч по сравнению с контролем. При глубинном культивировании штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 в средах, содержащих осмолиты, происходит постепенное увеличение титра жизнеспособных клеток. Максимальный титр клеток (10^7 КОЕ/мл) отмечается на 3-е сутки культивирования.

При культивировании штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 в условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия в концентрации 2052 ммоль/л, титр клеток через 24 ч падает до 10^5 КОЕ/мл. У штамма *P. megaterium* Cp-1 через 72 ч культивирования титр клеток равен $4,80 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, а у штамма *Rh. jostii* CA-6 – $3,33 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Под действием осмолитов (пролин, бетаин или сахароза в концентрации 1 ммоль/л) численность популяции штамма *P. megaterium* Cp-1 через 72 ч культивирования в среде, содержащей 2052 ммоль/л NaCl, составляет $3,07 \cdot 10^6$; $3,13 \cdot 10^6$ и $3,07 \cdot 10^6$ КОЕ/мл соответственно, а численность популяции штамма *Rh. jostii* CA-6 – $4,07 \cdot 10^6$; $4,87 \cdot 10^6$ и $3,20 \cdot 10^6$ КОЕ/мл соответственно. Можно предположить, что осмолиты обеспечивают выживание клеток исследуемых штаммов бактерий в условиях повышенной минерализации.

Таблица 4

**Влияние осмолитов различной химической природы
на рост штамма *P. megaterium* Cr-1 при разных уровнях засоления**

Table 4

**Effect of different chemical osmolytes on growth
of strain *P. megaterium* Cr-1 exposed to diverse salinisation levels**

Концентрация NaCl, ммоль/л	Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл			
		Контроль	NaCl + 1 ммоль/л пролина	NaCl + 1 ммоль/л бетаина	NaCl + 1 ммоль/л сахарозы
1197	0	$(3,000 \pm 0,346) \cdot 10^6$	$(2,930 \pm 0,353) \cdot 10^6$	$(3,000 \pm 0,346) \cdot 10^6$	$(3,330 \pm 0,291) \cdot 10^6$
	24	$(5,200 \pm 0,462) \cdot 10^7$	$(5,470 \pm 0,481) \cdot 10^7$	$(6,000 \pm 0,231) \cdot 10^7$	$(5,930 \pm 0,231) \cdot 10^7$
	48	$(1,170 \pm 0,018) \cdot 10^8$	$(1,090 \pm 0,035) \cdot 10^8$	$(1,140 \pm 0,231) \cdot 10^8$	$(1,140 \pm 0,291) \cdot 10^8$
	72	$(1,130 \pm 0,066) \cdot 10^8$	$(1,120 \pm 0,031) \cdot 10^8$	$(1,170 \pm 0,406) \cdot 10^8$	$(1,180 \pm 0,416) \cdot 10^8$
1710	0	$(2,600 \pm 0,306) \cdot 10^6$	$(2,200 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,600 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,400 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	24	$(5,200 \pm 0,611) \cdot 10^5$	$(4,400 \pm 0,462) \cdot 10^6$	$(4,800 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,730 \pm 0,291) \cdot 10^6$
	48	$(1,330 \pm 0,291) \cdot 10^6$	$(6,130 \pm 0,176) \cdot 10^7$	$(1,480 \pm 0,046) \cdot 10^7$	$(5,930 \pm 0,291) \cdot 10^7$
	72	$(1,330 \pm 0,133) \cdot 10^7$	$(2,400 \pm 0,115) \cdot 10^7$	$(5,670 \pm 0,240) \cdot 10^7$	$(4,930 \pm 0,481) \cdot 10^7$
2052	0	$(2,400 \pm 0,115) \cdot 10^6$	$(3,070 \pm 0,306) \cdot 10^6$	$(3,000 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(3,200 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	24	$(3,200 \pm 0,200) \cdot 10^5$	$(2,730 \pm 0,176) \cdot 10^6$	$(2,400 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,400 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	48	$(4,830 \pm 0,231) \cdot 10^5$	$(3,100 \pm 0,291) \cdot 10^6$	$(3,150 \pm 0,240) \cdot 10^6$	$(3,100 \pm 0,353) \cdot 10^6$
	72	$(4,800 \pm 0,231) \cdot 10^5$	$(3,070 \pm 0,291) \cdot 10^6$	$(3,130 \pm 0,240) \cdot 10^6$	$(3,070 \pm 0,353) \cdot 10^6$

Таблица 5

Влияние осмолитов различной химической природы
на рост штамма *R. jostii* CA-6 при разных уровнях засоления

Table 5

Effect of different chemical osmolytes on growth
of strain *R. jostii* CA-6 exposed to diverse salinisation levels

Концентрация NaCl, ммоль/л	Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл			
		Контроль	NaCl + 1 ммоль/л пролина	NaCl + 1 ммоль/л бетаина	NaCl + 1 ммоль/л сахарозы
1197	0	$(2,870 \pm 0,467) \cdot 10^6$	$(2,800 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,800 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,530 \pm 0,353) \cdot 10^6$
	24	$(4,800 \pm 0,231) \cdot 10^7$	$(4,930 \pm 0,481) \cdot 10^7$	$(5,600 \pm 0,462) \cdot 10^7$	$(4,000 \pm 0,231) \cdot 10^7$
	48	$(2,600 \pm 0,346) \cdot 10^8$	$(2,800 \pm 0,462) \cdot 10^8$	$(1,090 \pm 0,029) \cdot 10^8$	$(4,930 \pm 0,291) \cdot 10^8$
	72	$(3,000 \pm 0,346) \cdot 10^8$	$(4,930 \pm 0,291) \cdot 10^8$	$(1,470 \pm 0,353) \cdot 10^8$	$(5,200 \pm 0,231) \cdot 10^8$
1710	0	$(2,870 \pm 0,240) \cdot 10^6$	$(2,800 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,600 \pm 0,416) \cdot 10^6$	$(3,000 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	24	$(3,530 \pm 0,267) \cdot 10^5$	$(3,000 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(3,470 \pm 0,291) \cdot 10^6$	$(3,400 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	48	$(2,870 \pm 0,467) \cdot 10^6$	$(3,000 \pm 0,231) \cdot 10^7$	$(1,050 \pm 0,029) \cdot 10^7$	$(7,000 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	72	$(5,200 \pm 0,611) \cdot 10^7$	$(4,670 \pm 0,406) \cdot 10^7$	$(1,000 \pm 0,023) \cdot 10^7$	$(3,130 \pm 0,291) \cdot 10^7$
2052	0	$(2,870 \pm 0,240) \cdot 10^6$	$(2,800 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(3,000 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,800 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	24	$(3,200 \pm 0,115) \cdot 10^5$	$(3,530 \pm 0,176) \cdot 10^6$	$(3,000 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(3,130 \pm 0,291) \cdot 10^6$
	48	$(3,400 \pm 0,306) \cdot 10^5$	$(4,100 \pm 0,291) \cdot 10^6$	$(4,900 \pm 0,353) \cdot 10^6$	$(3,250 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	72	$(3,330 \pm 0,240) \cdot 10^5$	$(4,070 \pm 0,291) \cdot 10^6$	$(4,870 \pm 0,467) \cdot 10^6$	$(3,200 \pm 0,231) \cdot 10^6$

В лабораторной модели установлено влияние засоления на синтез штаммами *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 пролина (рис. 2 и 3) и бетаина (рис. 4 и 5).

В результате масс-спектрометрического анализа биомассы клеток штаммов *P. megaterium* Cp-1 (см. рис. 2) и *Rh. jostii* CA-6 (см. рис. 3) было установлено, что концентрация пролина внутри клеток пропорциональна связана с концентрацией хлорида натрия в среде: при увеличении содержания хлорида натрия с 0 до 1197 ммоль/л отмечается повышение содержания пролина в клетках с 0,089 до 2,105 мкг/мл и с 0,062 до 1,502 мкг/мл соответственно.

Масс-спектрометрический анализ биомассы клеток штаммов *P. megaterium* Cp-1 (см. рис. 4) и *Rh. jostii* CA-6 (см. рис. 5) показал, что концентрация внутриклеточного бетаина пропорционально связана с концентрацией хлорида натрия: при увеличении содержания хлорида натрия в среде до 1197 ммоль/л содержание бетаина в клетках возрастает с 0,055 до 0,219 мкг/мл и с 0,071 до 0,118 мкг/мл соответственно.

В лабораторном опыте изучено влияние штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 на всхожесть семян, рост и развитие проростков редиса розово-красного (*R. sativus* var. *radicula*) в условиях засоления, вызванного хлоридом натрия в диапазоне концентраций 171–855 ммоль/л.

Установлено, что обработка семян редиса 2 % раствором КЖ исследуемых бактерий оказала положительное влияние на всхожесть семян и длину проростков культуры в условиях засоления (табл. 6).

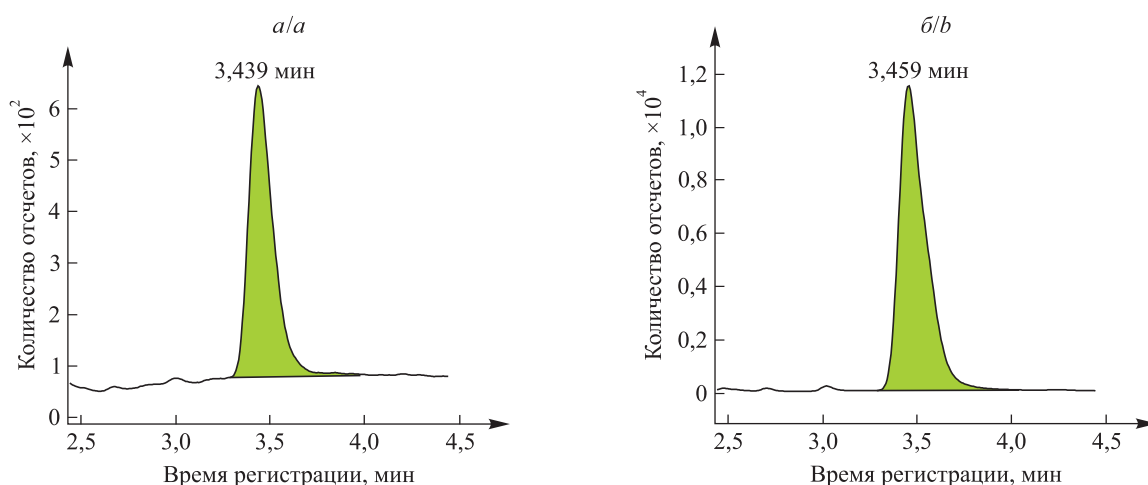


Рис. 2. Внутриклеточное содержание пролина в клетках штамма *P. megaterium* Cp-1: а – без хлорида натрия (контроль); б – в присутствии 1197 ммоль/л NaCl

Fig. 2. Intracellular proline concentration in strain *P. megaterium* Cp-1: а – free from sodium chloride (control); б – in the presence of 1197 mmol/L NaCl

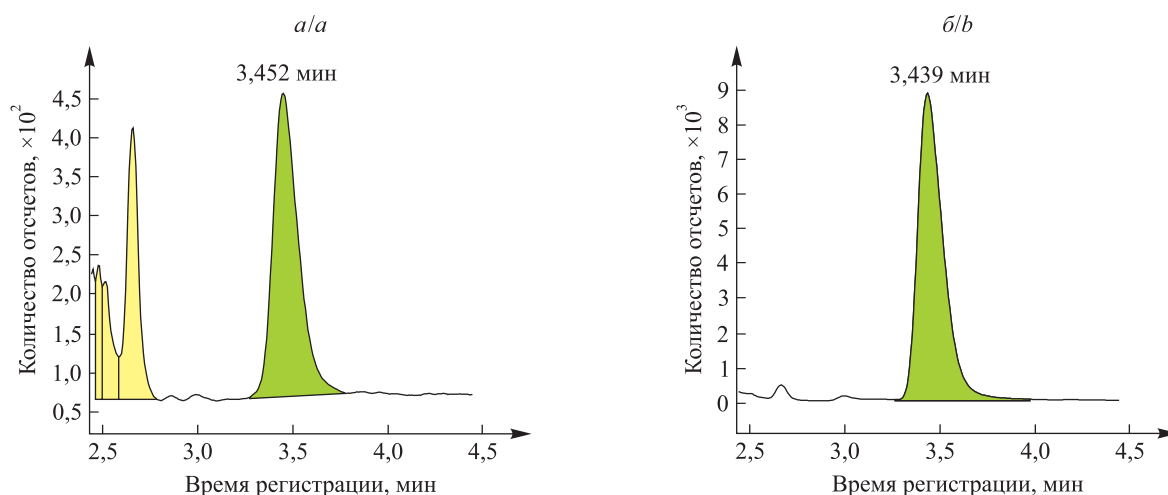


Рис. 3. Внутриклеточное содержание пролина в клетках штамма *Rh. jostii* CA-6: а – без хлорида натрия (контроль); б – в присутствии 1197 ммоль/л NaCl

Fig. 3. Intracellular proline concentration in strain *Rh. jostii* CA-6: а – free from sodium chloride (control); б – in the presence of 1197 mmol/L NaCl

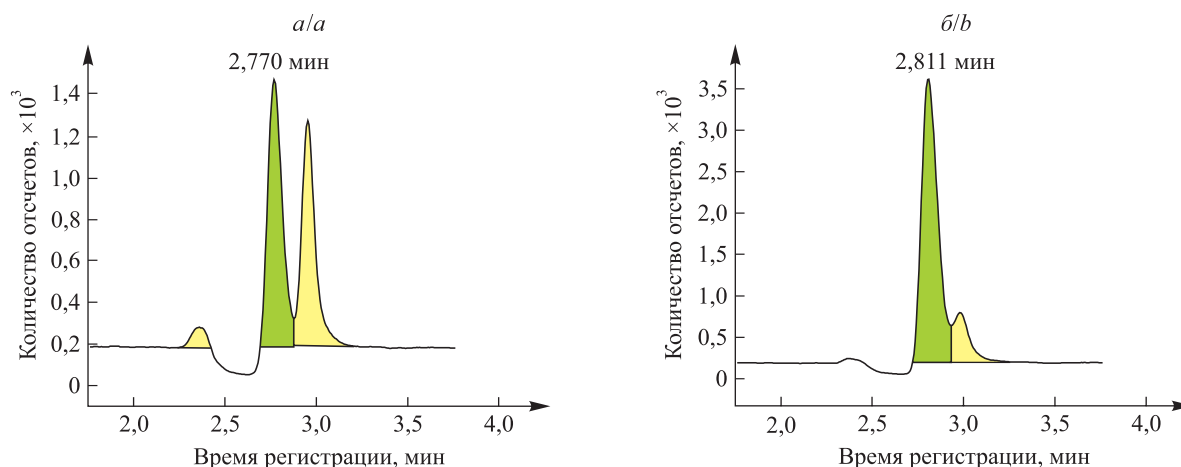


Рис. 4. Внутриклеточное содержание бетаина в клетках штамма *P. megaterium* Cp-1:
а – без хлорида натрия (контроль); б – в присутствии 1197 ммоль/л NaCl

Fig. 4. Intracellular betaine concentration in strain *P. megaterium* Cp-1:
а – free from sodium chloride (control); б – in the presence of 1197 mmol/L NaCl

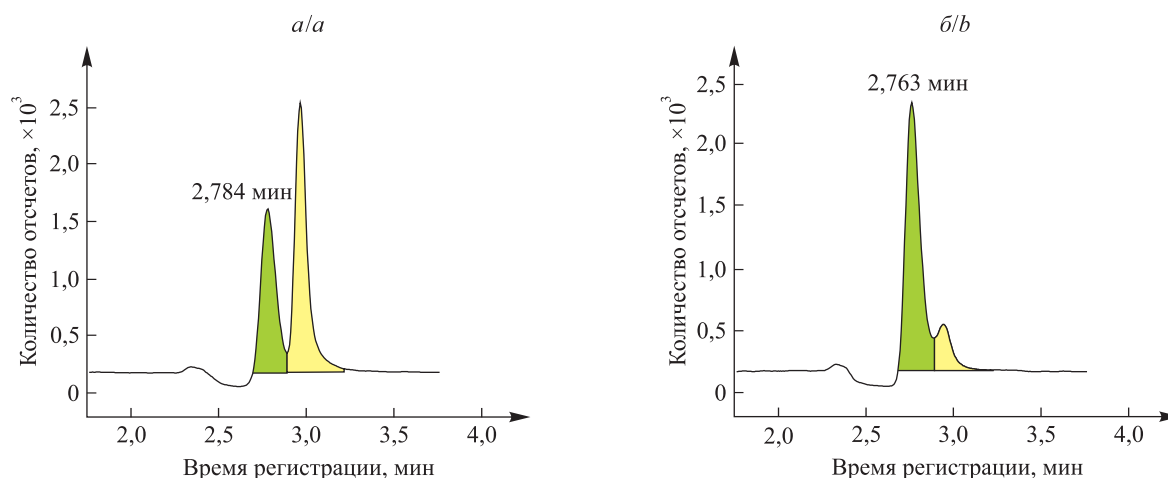


Рис. 5. Внутриклеточное содержание бетаина в клетках штамма *Rh. jostii* CA-6:
а – без хлорида натрия (контроль); б – в присутствии 1197 ммоль/л NaCl

Fig. 5. Intracellular betaine concentration in strain *Rh. jostii* CA-6:
а – free from sodium chloride (control); б – in the presence of 1197 mmol/L NaCl

Таблица 6

Влияние солеустойчивых штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6
на всхожесть семян и длину проростков редиса розово-красного

Table 6

Effect of halotolerant strains *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6
on seed germination and length of small radish seedlings

Вариант опыта	Всхожесть семян, % к контролю	Длина проростков	
		мм	% к контролю
<i>P. megaterium</i> Cp-1			
Без инокуляции (контроль)	100	38,60 ± 0,52	100
Инокуляция штаммом + 171 ммоль/л NaCl	119	46,20 ± 0,44	120
Инокуляция штаммом + 342 ммоль/л NaCl	115	43,80 ± 0,32	114
Инокуляция штаммом + 513 ммоль/л NaCl	113	46,30 ± 0,47	120
Инокуляция штаммом + 855 ммоль/л NaCl	109	40,60 ± 0,81	105

Окончание табл. 6
Ending table 6

Вариант опыта	Всхожесть семян, % к контролю	Длина проростков	
		мм	% к контролю
Rh. jostii CA-6			
Без инокуляции (контроль)	100	37,70 ± 0,26	100
Инокуляция штаммом + 171 ммоль/л NaCl	114	40,60 ± 0,40	107
Инокуляция штаммом + 342 ммоль/л NaCl	112	41,50 ± 0,32	110
Инокуляция штаммом + 513 ммоль/л NaCl	100	42,10 ± 0,47	114
Инокуляция штаммом + 855 ммоль/л NaCl	105	41,40 ± 0,81	110

Выявлено, что инокуляция семян редиса розово-красного 2 % раствором КЖ солеустойчивого штамма *P. megaterium* Cp-1 максимально увеличивает всхожесть семян по сравнению с контролем на 19 % (171 ммоль/л NaCl), а длину проростков – на 20 % (171 и 513 ммоль/л NaCl). Всхожесть семян и длина проростков редиса, инокулированного штаммом *Rh. jostii* CA-6, возрастает на 14 % (171 и 513 ммоль/л NaCl соответственно).

Инокуляция семян редиса розово-красного 2 % раствором КЖ штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 положительно влияет на накопление проростками сырой (рис. 6, а) и сухой (рис. 6, б) фитомассы. Установлено, что при обработке семян 2 % раствором КЖ солеустойчивого штамма *P. megaterium* Cp-1 наблюдается увеличение сухой и сырой фитомассы на 12 и 29 % соответственно при концентрации хлорида натрия, равной 171 и 855 ммоль/л. При содержании хлорида натрия 171 ммоль/л инокуляция семян редиса 2 % раствором КЖ штамма *Rh. jostii* CA-6 повышает накопление сухой фитомассы на 17 %, сырой – на 76 %. Прирост сухой фитомассы данной сельскохозяйственной культуры семейства капустных в присутствии 513 ммоль/л хлорида натрия составляет 17 %, сырой – 52 %.

Штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6, сохраняющие свои агрономически ценные свойства в условиях засоления, перспективны для использования в биотехнологии для минимизации негативного влияния засоления на рост и развитие растений.

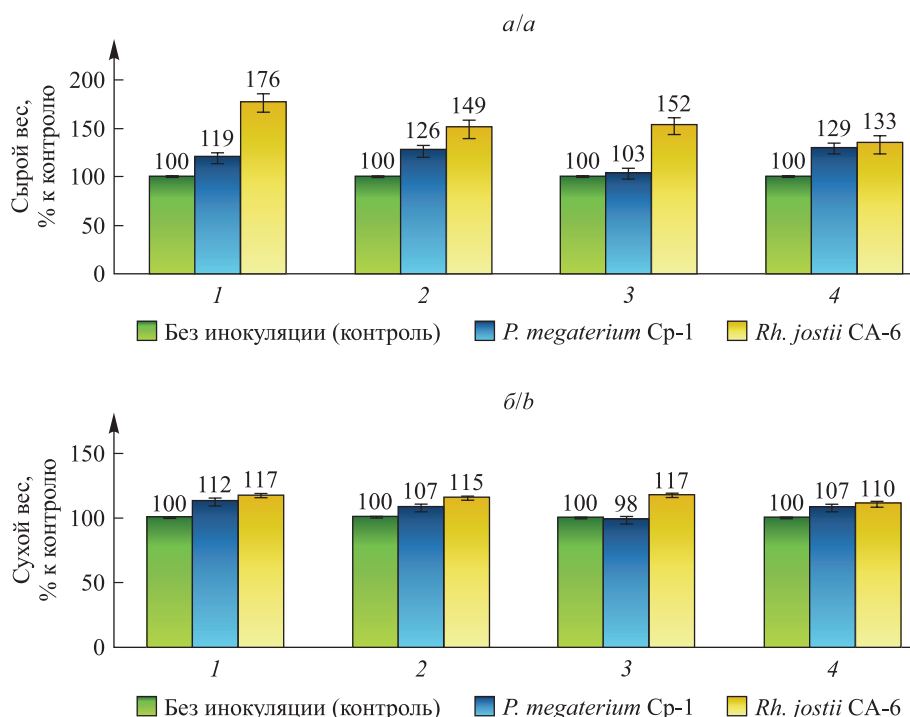


Рис. 6. Влияние штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 на сырую (а) и сухую (б) фитомассу проростков редиса в условиях засоления: 1 – 171 ммоль/л NaCl; 2 – 342 ммоль/л NaCl; 3 – 513 ммоль/л NaCl; 4 – 855 ммоль/л NaCl
Fig. 6. Impact of strains *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6 on crude (a) and dry (b) phytomass of small radish seedlings in saline media: 1 – 171 mmol/L NaCl; 2 – 342 mmol/L NaCl; 3 – 513 mmol/L NaCl; 4 – 855 mmol/L NaCl

Заключение

Установлено, что в условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия в диапазоне концентраций 1197–2052 ммоль/л, исследуемые штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 сохраняют фосфатсолубилизирующую, азотфиксирующую и ИУК-синтезирующую активность.

Показано, что осмолиты пролин, бетаин и сахараза оказывают положительный эффект на рост штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 и их способность адаптироваться к осмотическому стрессу. Внутриклеточное образование пролина и бетаина у исследуемых штаммов пропорционально связано с концентрацией хлорида натрия: при увеличении содержания хлорида натрия в среде до 1197 ммоль/л уровень пролина повышается с 0,062 до 1,502 мкг/мл (*Rh. jostii* CA-6) и с 0,089 до 2,105 мкг/мл (*P. megaterium* Cp-1), уровень бетаина – с 0,071 до 0,118 мкг/мл (*Rh. jostii* CA-6) и с 0,055 до 0,219 мкг/мл (*P. megaterium* Cp-1).

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что штаммы *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 сохраняют свои агрономически ценные свойства в условиях засоления и положительно влияют на всхожесть семян и развитие проростков редиса розово-красного (*R. sativus* var. *radicula*), являющегося наиболее чувствительной тест-культурой при определении фитотоксичности микроорганизмов и почвы. Штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 перспективны для использования в биотехнологиях, обеспечивающих минимизацию негативного влияния засоления на рост и развитие растений.

Библиографические ссылки

1. Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove: a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014;3(2):97–110. DOI: 10.1016/j.bcab.2013.09.008.
2. Grover M, Ali SkZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27:1231–1240. DOI: 10.1007/s11274-010-0572-7.
3. Ramadoss D, Lakkineni VK, Bose P, Ali S, Annapurna K. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *SpringerPlus*. 2013;2(1):6. DOI: 10.1186/2193-1801-2-6.
4. Ha-Tran DM, Nguyen TTM, Hung SH, Huang E, Huang CC. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(6):3154. DOI: 10.3390/ijms22063154.
5. Arora NK, Fatima T, Mishra J, Mishra I, Verma S, Verma R, et al. Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. *Journal of Advanced Research*. 2020;26:69–82. DOI: 10.1016/j.jare.2020.07.003.
6. Наумович НИ, Алещенкова ЗМ, Ананьева ИН, Сафронова ГВ. Выделение и идентификация микроорганизмов, устойчивых к засолению почв. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2022;67(1):54–65. DOI: 10.29235/1029-8940-2022-67-1-54-65.
7. Lányi B. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods in Microbiology*. 1988;19:1–67. DOI: 10.1016/S0580-9517(08)70407-0.
8. Возняковская ЮМ. *Микрофлора растений и урожай*. Ленинград: Колос; 1969. 240 с.
9. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. 2028 p.
10. Sarwar M, Kremer RJ. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and Soil*. 1995;172:261–269. DOI: 10.1007/BF00011328.
11. Nautiyal CS. 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.
12. Murphy J, Riley JP. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 1962;27:31–36. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)88444-5.
13. Горшкова ОМ, Горецкая АГ, Корешкова ТН, Краснушкин АВ, Марголина ИЛ, Потапов АА и др. *Методы лабораторных и полевых исследований* [CD-ROM]. Слипечук МВ, редактор. Москва: МГУ; 2015. 220 с. 1 CD-ROM: текст.
14. Умаров ММ. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях. *Почвоведение*. 1976;11:119–123.
15. Fan D, Smith DL. Characterization of selected plant growth-promoting rhizobacteria and their non-host growth promotion effects. *Microbiology Spectrum*. 2021;9(1):1–20. DOI: 10.1128/Spectrum.00279-21.

References

1. Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove: a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014;3(2):97–110. DOI: 10.1016/j.bcab.2013.09.008.
2. Grover M, Ali SkZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27:1231–1240. DOI: 10.1007/s11274-010-0572-7.
3. Ramadoss D, Lakkineni VK, Bose P, Ali S, Annapurna K. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *SpringerPlus*. 2013;2(1):6. DOI: 10.1186/2193-1801-2-6.

4. Ha-Tran DM, Nguyen TTM, Hung SH, Huang E, Huang CC. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(6):3154. DOI: 10.3390/ijms22063154.
5. Arora NK, Fatima T, Mishra J, Mishra I, Verma S, Verma R, et al. Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. *Journal of Advanced Research*. 2020;26:69–82. DOI: 10.1016/j.jare.2020.07.003.
6. Naumovich NI, Aleschenkova ZM, Ananyeva IN, Safronava HV. Solation and identification of microorganism's resistant to soil salinization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2022;67(1):54–65. Russian. DOI: 10.29235/1029-8940-2022-67-1-54-65.
7. Lányi B. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods in Microbiology*. 1988;19:1–67. DOI: 10.1016/S0580-9517(08)70407-0.
8. Voznyakovskaya YuM. *Mikroflora rastenii i urozhai* [Plant microflora and harvest]. Leningrad: Kolos; 1969. 240 p. Russian.
9. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. 2028 p.
10. Sarwar M, Kremer RJ. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and Soil*. 1995;172:261–269. DOI: 10.1007/BF00011328.
11. Nautiyal CS. 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.
12. Murphy J, Riley JP. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 1962;27:31–36. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)88444-5.
13. Gorshkova OM, Goretskaya AG, Koreshkova TN, Krasnushkin AV, Margolina IL, Potapov AA, et al. *Metody laboratornykh i polevykh issledovaniy* [Laboratory and field research methods] [CD-ROM]. Slipenchuk MV, editor. Moscow: Moscow State University; 2015. 220 p. 1 CD-ROM: text. Russian.
14. Umarov MM. [Acetylene method for studying nitrogen fixation in soil microbiological studies]. *Pochvovedenie*. 1976;11:119–123. Russian.
15. Fan D, Smith DL. Characterization of selected plant growth-promoting rhizobacteria and their non-host growth promotion effects. *Microbiology Spectrum*. 2021;9(1):1–20. DOI: 10.1128/Spectrum.00279-21.

Получена 04.02.2022 / исправлена 28.02.2022 / принята 21.04.2022.
Received 04.02.2022 / revised 28.02.2022 / accepted 21.04.2022.