

Н. И. Наумович, З. М. Алешенкова, И. Н. Ананьева, Г. В. Сафронова

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, УСТОЙЧИВЫХ К ЗАСОЛЕНИЮ ПОЧВ

Аннотация. Из образцов почвы, отобранной в районе Старобинского месторождения калийных солей (ОАО «Беларуськалий»), было выделено 315 изолятов солеустойчивых бактерий, в том числе азотфиксирующий СА-6 и фосфатсолюбилизирующий Ср-1, способные переносить абиотический стресс, вызванный хлоридом натрия в концентрациях 1710 и 2565 мМ соответственно, и дефицит влаги при водном потенциале $-0,20$ и $-0,42$ МПа. Изолят Ср-1 способен солюбилизовать фосфаты с образованием зон «гало» 9 мм, а изолят СА-6 обладает нитрогеназной активностью 44,0 нМ C_2H_2 /фл/3 сут. Изоляты Ср-1 и СА-6 являются ростстимулирующими микроорганизмами, что обусловлено их способностью синтезировать индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в концентрациях 89,7 и 37,8 мкг ИУК/мл культуральной жидкости соответственно. Отобранные солеустойчивые изоляты были идентифицированы на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и MALDI-TOF масс-спектрометрии и отнесены к видам *Rhodococcus jostii* и *Priestia megaterium*. Солеустойчивые штаммы *Priestia megaterium* Ср-1 и *Rhodococcus jostii* СА-6 депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номерами БИМ В-1314Д и БИМ В-1353Д соответственно.

Ключевые слова: солеустойчивость, азотфиксация, фосфатсолюбилизация, ростстимуляция, идентификация

Для цитирования: Выделение и идентификация микроорганизмов, устойчивых к засолению почв / Н. И. Наумович [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 54–65. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-54-65>

Nadezhda I. Naumovich, Zinaida M. Aleschenkova, Irina N. Ananyeva, Halina V. Safronava

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISM'S RESISTANT TO SOIL SALINIZATION

Abstract. 315 variants of halotolerant bacteria were isolated from soil samples taken around Starobin potash deposit mined by Belaruskali concern. Nitrogen-fixing isolate CA-6 and phosphate-solubilizing isolate Cp-1 capable to withstand abiotic stress caused by sodium chloride in concentration 1710 and 2565 mM, respectively and water deficiency characterized by osmotic potential -0.20 and -0.42 MPa were sorted out. Isolate Cp-1 may dissolve phosphates yielding halo zones 9 mm in diameter while isolate CA-6 displays nitrogenase activity 44.0 nM C_2H_2 /vial/3 days. Both isolates are growth-promoting organisms, distinguished by the ability to synthesize IAA in concentrations 89.7 and 37.8 μ g IAA/ml of cultural liquid, respectively. The selected salt-resistant isolates were identified based on analysis of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene and data of MALDI-TOF mass spectrometry and were referred to the species *Rhodococcus jostii* and *Priestia megaterium*. Halotolerant strains *Priestia megaterium* Cp-1 and *Rhodococcus jostii* CA-6 were deposited in Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms under the respective registration numbers BIM B-1314D and BIM B-1353D.

Keywords: salt resistance, nitrogen fixation, phosphate solubilization, growth stimulation, identification

For citation: Naumovich N. I., Aleschenkova Z. M., Ananyeva I. N., Safronava H. V. Isolation and identification of microorganism's resistant to soil salinization. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 54–65 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-54-65>

Введение. Гиперсоленые экосистемы – один из экстремальных видов экосистем, где могут существовать только организмы с комплексными адаптированными метаболическими механизмами снижения внутриклеточного осмотического давления. Известно, что адаптация почвенных микроорганизмов к экстремальным условиям, в том числе к условиям засоления, повышается при вступлении в симбиотические взаимоотношения с растениями [1].

В связи с этим особый интерес для исследователей во всем мире представляют галофильные и галотолерантные микроорганизмы, разнообразие которых в природе, экологическая роль и метаболизм изучены недостаточно. Исследование солеустойчивых ростстимулирующих микроор-

ганизмов показывает их огромный потенциал для минимизации негативного влияния засоления и биоремедиации засоленных почв. Солеустойчивые почвенные и ризосферные микроорганизмы являются биологически значимой частью почвообразовательных процессов и фитосанитарного состояния почвы, а также питания растений. Они обладают практически неограниченными возможностями, оказывая влияние на любые природные и неприродные соединения, способны трансформировать органические и неорганические вещества и изменять их химический состав, что приводит к обогащению почвы макро- и микроэлементами и восстановлению почвенного плодородия [2].

В связи с этим поиск солеустойчивых микроорганизмов, обладающих комплексом полезных свойств, таких как азотфиксация, фосфатмобилизация и ростстимуляция, и перспективных для создания биопрепаратов, стимулирующих рост и развитие растений в условиях абиотического стресса, является актуальным [3].

Цель работы – выделение, отбор и идентификация солеустойчивых штаммов микроорганизмов, обладающих комплексом полезных свойств.

Материалы и методы исследования. Солеустойчивые микроорганизмы из образцов почвы, отобранных на территории ОАО «Беларуськалий», выделяли из накопительных культур путем поверхностного посева почвенной суспензии на среду LB [4], содержащую хлорид натрия в концентрации 3 %. Для адаптивной селекции отобранных бактериальных культур осуществляли их последовательные пересевы на агаризованную среду LB, содержащую хлорид натрия в концентрациях 3 % (513 мМ), 5 % (855 мМ), 7 % (1197 мМ), 10 % (1710 мМ), 12 % (2052 мМ), 15 % (2565 мМ), методом истощающегося штриха [5]. Выделение и учет численности азотфиксирующих бактерий проводили на безазотистых средах Эшби и Бёрка [6], фосфатмобилизующих – на глюкозо-аспарагиновой среде с осажденными фосфатами кальция [7]. Значения эффективности солубилизации фосфатов кальция и индекс солубилизации рассчитывали согласно [8, 9]. Нитрогеназную активность чистых культур солеустойчивых олигонитрофильных изолятов определяли ацетиленовым методом, используя газовый хроматограф «Хромос ГХ-1000» [10]. Количество индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в культуральной жидкости определяли колориметрическим методом [11]. Ростстимулирующее действие солеустойчивых бактериальных изолятов на всхожесть семян, рост и развитие проростков редиса розово-красного изучали с помощью методов, изложенных в работе [12]. Влияние NaCl и полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ-6000) на рост отобранных штаммов на жидких средах изучали в лабораторных условиях, используя колбы Эрленмейра объемом 250 мл со 100 мл питательной среды LB с 7, 10 и 12 % NaCl или 3 % (–0,20 МПа), 5 % (–0,42 МПа), 15 % (–1,31 МПа) ПЭГ-6000 [13, 14]. Исследуемые образцы культивировали в течение 72 ч, а затем высевали на поверхность агаризованной среды LB.

Для выделения геномной ДНК использовали набор реактивов Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience, Германия) согласно прилагаемой инструкции. Наличие *nifH* гена у микроорганизмов определяли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя праймеры *nifH-1F* и *nifH-1R* с параметрами амплификации, приведенными в работе [15]. Видовую принадлежность бактерий устанавливали на основании данных сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, амплификацию которого проводили методом ПЦР с универсальными праймерами 8f и 1492r (режим ПЦР указан в работе [16]). Детекцию ПЦР-продукта осуществляли в горизонтальном 1,5 %-ном агарозном геле в 1×TAE буфере с бромистым этидием (0,5 мкг/мл). Для определения размеров фрагмента генов *nifH* и 16S рРНК использовали маркеры молекулярного веса O'GeneRuler™ 100 bp и O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermetas, Литва) соответственно. Секвенирование переменных участков гена, кодирующих 16S рРНК, осуществляли по методу Сэнгера с помощью набора реактивов DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience, Германия) и меченого Cy5.5 праймера 926r (ОДО «Праймтех»). Продукты секвенирующей реакции детектировали, используя автоматический секвенатор 4300 DNA Analyzer (Li-COR Biosciences, США). Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью компьютерных программ eSeq V.3.1.10 (Li-COR Biosciences, США), а сравнительный анализ полученной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и референтных последовательностей из базы данных GenBank – с использованием компьютерной программы BLAST (<http://>

www.ncbi.nlm.nih.gov/ blast) и базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Филогенетическое дерево было построено с помощью программы MEGA-X (методом «присоединения соседей») и по результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК. Идентификацию солеустойчивых бактериальных изолятов осуществляли методом масс-спектрометрии на Microflex LRF system (Bruker Daltonic GmbH, Германия).

Результаты и их обсуждение. Из накопительных культур образцов почвы, отобранных на территории ОАО «Беларуськалий», методом посева на твердую питательную среду LB, содержащую хлорид натрия в концентрации 3 %, было выделено 315 бактериальных морфотипов, среди которых путем последовательного пересева на среду LB, содержащую хлорид натрия в концентрациях 513, 855, 1197, 1710, 2052 и 2565 мМ, был проведен скрининг на наибольшую солеустойчивость микроорганизмов (табл. 1).

Таблица 1. Адаптивная селекция солеустойчивых бактериальных изолятов, выделенных из засоленной почвы и почвы с дефицитом влаги, на среде LB в присутствии хлорида натрия

Table 1. Adaptive selection of halotolerant bacterial isolates isolated from saline soils and water deficiency soils on LB medium in presence of sodium chloride

Изолят	Рост на агаризованной среде						
	Контроль	LB + 513 мМ NaCl	LB + 855 мМ NaCl	LB + 1197 мМ NaCl	LB + 1710 мМ NaCl	LB + 2052 мМ NaCl	LB + 2565 мМ NaCl
Со-2	+++	+++	++	++	++	+	–
Со-3	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
Со-5	+++	+++	++	+	–	–	–
Со-6	+++	+++	+++	+++	++	+	–
Со-7	+++	+++	+++	+++	+	–	–
Со-8	+++	+++	+++	++	+	+	–
СА-1	+++	+	–	–	–	–	–
СА-6	+++	+++	++	++	+	+	+
СА-7	+++	+	–	–	–	–	–
СП-2	+++	+	–	–	–	–	–
СП-3	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
DST71	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
DST72	+++	+++	+++	++	+++	+	+
DST73	+++	++	+	+	–	–	–
DST74	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
DST75	+++	+++	+++	++	++	+	+
DST76	+++	+++	+++	++	–	–	–
DST77	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
DST78	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
DST101	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
DST102	+++	+++	+++	+	–	–	–
DST103	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
DST104	+++	++	++	+	–	–	–
DST105	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
E9	+++	++	–	–	–	–	–
E10	+++	+++	+++	+++	++	+	–
Ср-1	+++	+++	+++	+++	++	+	+
Ср-7	+++	+++	+++	++	+	+	–
Ср-8	+++	+++	+++	++	++	+	+
СБ-1	+++	+++	+++	+++	++	+	–
СБ-3	+++	+++	+	–	–	–	–
С-1	+++	+++	+++	++	++	+	–
С-4	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
С-10	+++	+++	+++	++	++	+	+
С-12	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
С-14	+++	+++	+++	++	++	+	–
С-15	+++	+++	+++	+++	++	+	–

Окончание табл. 1

Изолят	Рост на агаризованной среде						
	Контроль	LB + 513 мМ NaCl	LB + 855 мМ NaCl	LB + 1197 мМ NaCl	LB + 1710 мМ NaCl	LB + 2052 мМ NaCl	LB + 2565 мМ NaCl
DST106	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
DST107	+++	+	–	–	–	–	–
DST108	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
DST109	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
DST110	+++	+++	+++	+++	+++	–	–
DST111	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
G101	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
G102	+++	+++	+++	+++	+++	–	–
G103	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
G104	+++	+++	+++	–	–	–	–
G105	+++	+++	+++	+++	++	+	+
G106	+++	+++	+++	+	+	+	+
ФП2/1	+++	+++	+++	+++	++	+	–
ФП2/2	+++	+++	++	++	+	+	–
ФП2/3	+++	+++	++	++	+	–	–

Примечание. Здесь и в табл 2: «+++» – хороший рост; «++» – средний рост; «+» – слабый рост; «–» – отсутствие роста бактерий.

Анализ полученных данных показывает, что при низком содержании хлорида натрия в среде он менее токсичен для исследуемых микроорганизмов. Так, внесение в среду LB 513 и 855 мМ хлорида натрия не оказывало негативного влияния на рост большинства бактериальных изолятов. Большая часть бактерий были способны расти на среде, содержащей хлорид натрия в концентрациях 1197 и 1710 мМ. Наиболее устойчивыми к хлориду натрия были бактериальные изоляты Cp-1, Cp-8, C-4, C-10, C-12, DST72, DST74, DST75, DST77, DST78, DST101, DST103, DST111, G105, G106, ФП2/1, ФП2/2, E10. Максимальные концентрации NaCl для них составили 2052 и 2565 мМ, остальные изоляты не росли на агаризованной среде, содержавшей хлорид натрия в концентрации 2052–2565 мМ.

На следующем этапе работы проводили отбор солеустойчивых бактерий с учетом их азотфиксирующей активности и способности солюбилизировать фосфаты. Скрининг азотфиксирующих изолятов проводили среди отобранных 43 солеустойчивых бактерий, которые росли на среде, содержавшей хлорид натрия в концентрации 1710–2565 мМ, путем посева на твердые селективные питательные безазотистые среды Эшби и Бёрка (табл. 2).

Таблица 2. Рост солеустойчивых бактериальных изолятов на безазотистых средах Эшби и Бёрка

Table 2. Growth of halotolerant bacterial isolates on nitrogen-free Ashby and Bürk'a media

Изолят	Рост на агаризованной среде		Изолят	Рост на агаризованной среде	
	Эшби	Бёрка		Эшби	Бёрка
Co-2	+++	+++	DST74	+	+
Co-3	+++	+++	DST75	+	+
Co-5	–	–	DST76	+	+
Co-6	+++	+++	DST77	+	+
Co-7	–	–	DST78	+++	+++
Co-8	+++	+++	DST101	+	+
CA-6	+++	+++	DST102	+	+
СП-3	–	–	DST103	+	+
Cp-1	–	–	DST104	+++	+++
Cp-7	–	–	DST105	–	–
Cp-8	–	–	DST106	–	–
СБ-1	–	–	DST108	–	–
СБ-3	–	–	DST109	–	–

Окончание табл. 2

Изолят	Рост на агаризованной среде		Изолят	Рост на агаризованной среде	
	Эшби	Бёрка		Эшби	Бёрка
C-1	+++	+++	DST110	–	–
C-4	+++	+++	DST111	–	–
C-10	–	–	G101	–	–
C-12	+++	+++	G102	++	++
C-14	+++	+++	G103	++	++
C-15	+++	+++	G104	++	++
DST71	–	–	G105	++	++
DST72	+++	+++	G106	++	++
DST73	+	+	ФП2/1	+	+
E9	–	+	ФП2/2	–	–
E10	+++	+++	ФП2/3	–	+

Из выделенных и отобранных 43 солеустойчивых изолятов 28 имели хороший или средний рост на безазотистых средах Эшби и Бёрка. Далее для выявления азотфиксирующей активности у 28 выделенных олигонитрофильных изолятов определяли наличие *nifH*-гена в их геноме (рис. 1, 2).

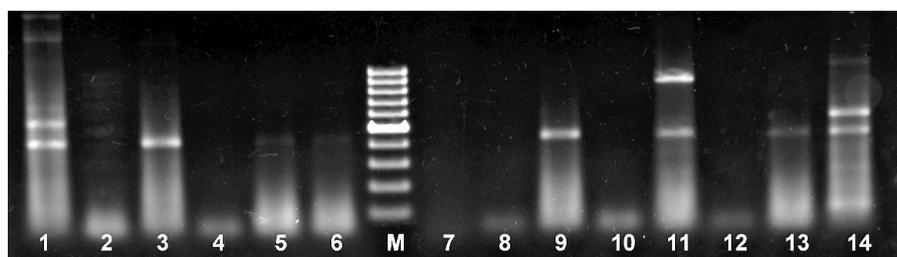


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-анализа солеустойчивых изолятов бактерий с парой праймеров *nifH*-1F и *nifH*-1R: 1 – E10; 2 – *E. coli* (отрицательный контроль); 3 – DST72; 4 – DST73; 5 – DST74; 6 – DST75; M – маркер молекулярной массы ДНК (100 bp); 7 – DST76; 8 – DST77; 9 – DST78; 10 – DST101; 11 – DST102; 12 – DST103; 13 – DST104; 14 – ФП2/1

Fig. 1. Electrophoregram of PCR analysis of halotolerant bacterial isolates with a couple of primers *nifH*-1F and *nifH*-1R: 1 – E10; 2 – *E. coli* (negative control); 3 – DST72; 4 – DST73; 5 – DST74; 6 – DST75; M – DNA molecular weight marker (100 bp); 7 – DST76; 8 – DST77; 9 – DST78; 10 – DST101; 11 – DST102; 12 – DST103; 13 – DST104; 14 – ФП2/1

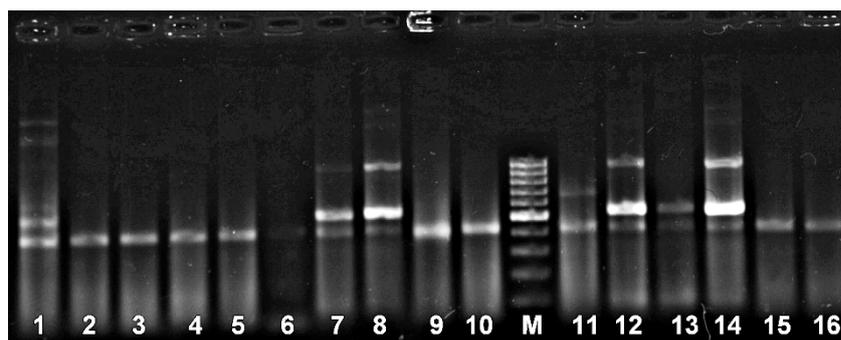


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-анализа солеустойчивых изолятов бактерий с парой праймеров *nifH*-1F и *nifH*-1R: 1 – *Ensifer meliloti* S3 (положительный контроль); 2 – G102; 3 – G103; 4 – G105; 5 – C-1; 6 – *E. coli* (отрицательный контроль); 7 – C-4; 8 – C-12; 9 – C-14; 10 – C-15; M – маркер молекулярной массы ДНК; 11 – CA-6; 12 – C-15; 13 – Co-2; 14 – Co-3; 15 – Co-6; 16 – Co-8

Fig. 2. Electrophoregram of PCR analysis of halotolerant bacterial isolates with a couple of primers *nifH*-1F and *nifH*-1R: 1 – *Ensifer meliloti* S3 (positive control); 2 – G102; 3 – G103; 4 – G105; 5 – C-1; 6 – *E. coli* (negative control); 7 – C-4; 8 – C-12; 9 – C-14; 10 – C-15; M – DNA molecular weight marker (100 bp); 11 – CA-6; 12 – C-15; 13 – Co-2; 14 – Co-3; 15 – Co-6; 16 – Co-8

В ходе ПЦР-анализа фрагмента *nifH*-гена исследуемых 28 олигонитрофильных бактерий с парой праймеров *nifH*-1F и *nifH*-1R у DST72, DST78, DST102, DST104, G102, G103, G105, C-1, C-4, C-12, C-14, C-15, CA-6, Co-2, Co-3, Co-6, Co-8, E10 и ФП2/1 изолятов была выявлена специфиче-

ская зона ампліфікацыі размерам ~ 430 п. о., што прадполагае генетычнаска дэтэрмінаваную здольнасць аналізаваных бактэрый фіксіраваць азот атмасферы, а таксама іх прыналежнасць к азотфіксатарам.

Далее з дапамогаю ацетиленовага метада вызначалі нітrogenазную актывнасць у чыстай культуры у 19 отобраных азотфіксуючых бактэрый, змяшчаючых *nifH*-ген. Сярэднія данныя по нітrogenазной (НГ) актывнасці прадставлены ў табл. 3.

Таблица 3. Нитрогеназная актывнасць солеустойчывых бактэрыяльных ізолятов

Table 3. Nitrogenase activity of halotolerant bacterial isolates

Изолят	НГ-актывнасць, нМ C_2H_4 /фл/3 сут	Изолят	НГ-актывнасць, нМ C_2H_4 /фл/3 сут
C-1	32,9 ± 0,24	G102	33,3 ± 0,39
C-4	33,8 ± 0,29	G103	28,0 ± 0,34
C-12	25,4 ± 0,20	G105	58,9 ± 0,20
C-14	38,2 ± 0,55	DST72	33,8 ± 0,57
C-15	33,1 ± 0,29	DST78	37,0 ± 0,61
Co-2	35,7 ± 0,55	DST102	65,0 ± 0,50
Co-3	37,4 ± 0,36	DST104	54,3 ± 0,50
Co-6	32,6 ± 0,55	ФП2/1	60,7 ± 0,14
Co-8	33,9 ± 0,50	E10	34,9 ± 0,50
CA-6	44,0 ± 0,43		

Устаноўлена, што ўсе 19 ізолятов фіксіравалі азот атмасферы, НГ актывнасць колебалася ў межах ад 25,2 да 65,6 нМ C_2H_4 /фл/3 сут. Максімальная НГ-актывнасць, выяўленая у выдзеленых ізолятов DST102, DST104, G105, ФП2/1, CA-6, складала 64,6; 53,9; 58,8; 65,6 і 44,0 нМ C_2H_4 /фл/3 сут адпаведна.

Із 43 бактэрыяльных ізолятов 5 былі найбольш актывнымі фосфатсолубілізатарамі (Ср-1, DST75, DST101, ФП2/1, ФП2/2) і фарміравалі зоны «галу» дыяметрам 7–9 мм. Для ізолятов Ср-1, DST75 і ФП2/1, абразуючых максімальныя зоны растварэння Са-Р на агарызаванай сярэ, устаноўлены эфектывнасць і індэкс солубілізацыі фосфатов кальцыя. Найбольш эфектывна солубілізавалі фосфаты ізоляты ФП2/1 (74 %) і Ср-1 (70 %), а найменшай эфектывнасцю абладалі ізоляты DST 75, DST 101 і ФП2/2 – 54, 56 і 59 % адпаведна. У ізолятов ФП2/1, Ср-1 адзначаўся таксама высокі індэкс фосфатсолубілізацыі – 3,9 і 3,3 адпаведна.

У ходзе далейшай работы ісследовалі ўплыве солеустойчывых азотфіксуючых (DST102, DST104, G105, ФП2/1, CA-6) і фосфатсолубілізуючых (ФП2/1, Ср-1) бактэрыяльных ізолятов на энергію прарастання і всхожасць сям'ян редиса розова-чырснога (*Raphanus sativus* var. *radicula*), котры ўяўляецца найбольш чувствітэльнай тэст-культурай пры вызначэнні фітотоксічнасці мікраарганізмав і пачвы (табл. 4).

Таблица 4. Влывне солеустойчывых ізолятов на всхожасць сям'ян, рост і развіццё праростков редиса розова-чырснога

Table 4. Effect of halotolerant isolates on seed germination, growth and development of small radish seedlings

Солеустойчывы ізолят	Энергія прарастання, %	Всхожасць, %	Длина праростков	
			мм	% к контролю
Контроль	30	31	65	100
Ср-1	35	41	100	156
CA-6	35	43	92	143
DST 102	27	39	88	136
DST104	29	41	91	140
ФП2/1	35	41	91	142
G105	21	33	92	143

Установлено, что показатель энергии прорастания семян редиса варьируется от 21 до 35 % (максимальные значения у изолятов Ср-1, СА-6, ФП2/1). Инокуляция семян редиса розово-красного культуральной жидкостью солеустойчивых изолятов положительно влияла и на всхожесть семян. Наиболее активными стимуляторами были изоляты Ср-1, СА-6, ФП2/1, DST104. Всхожесть семян редиса при обработке этими бактериальными изолятами превышала контроль в среднем на 10–12 %. В ходе лабораторных исследований установлено, что наибольшей длины проростки достигали при инокуляции культуральной жидкостью солеустойчивых изолятов Ср-1, СА-6, G105, ФП2/1. Длина проростков увеличилась в среднем на 47 % по сравнению с контролем без инокуляции.

Инокуляция семян редиса культуральной жидкостью исследуемых изолятов способствовала увеличению накопления проростками биомассы, что положительно влияло на последующее развитие растений (рис. 3).

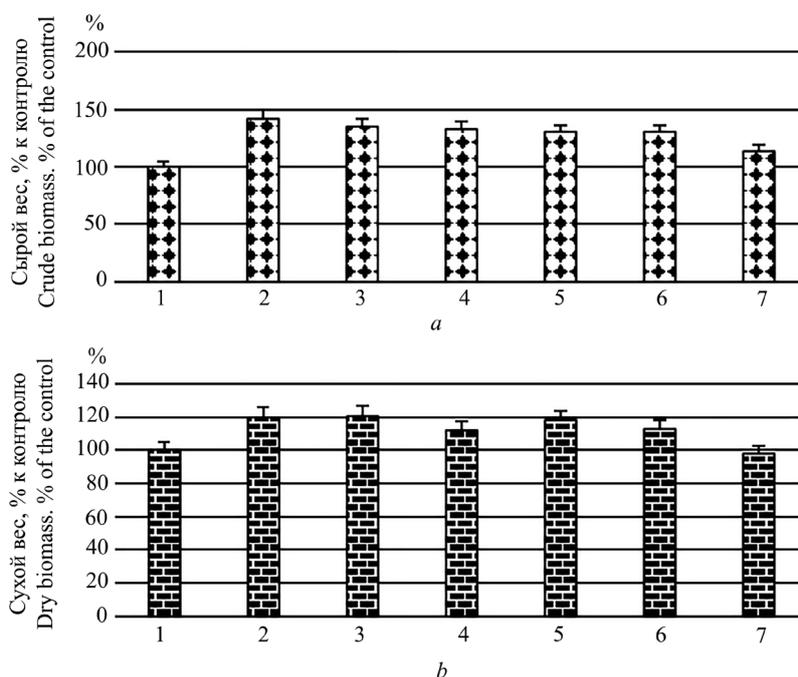


Рис. 3. Влияние наиболее эффективных солеустойчивых изолятов на накопление сырой (а) и сухой (б) биомассы проростками редиса розово-красного: 1 – контроль; 2 – Ср-1; 3 – СА-6; 4 – DST102; 5 – DST104; 6 – ФП2/1; 7 – G105

Fig. 3. Effect of most effective halotolerant isolates on accumulation of crude (a) and dry (b) biomass by seedlings of small radish: 1 – control; 2 – Cp-1; 3 – CA-6; 4 – DST102; 5 – DST104; 6 – ФП2/1; 7 – G105

В вариантах с инокуляцией семян наиболее эффективными были изоляты Ср-1 и СА-6, которые стимулировали увеличение сырой биомассы на 42 и 35 %, а сухой – на 20 и 21 % соответственно по сравнению с контролем. Установлено, что солеустойчивые изоляты DST102, DST104, G105, ФП2/1 также оказывали положительный эффект на накопление биомассы проростками редиса. Значения сырой биомассы превышали контроль в среднем на 27 %, сухой – на 14 %.

Таблица 5. Содержание ИУК в культуральной жидкости солеустойчивых изолятов

Table 5. The contents of IAA in the cultural liquid of salt-resistant isolates

Изолят	К-во ИУК, мкг/мл
Контроль (без инокуляции)	–
Ср-1	89,7 ± 0,58
СА-6	37,8 ± 0,09
ФП2/1	64,7 ± 0,03
DST102	18,3 ± 0,41
DST104	13,8 ± 0,09
G105	6,8 ± 0,26

Изучена способность отобранных солеустойчивых ростостимулирующих микроорганизмов синтезировать ауксины, в частности ИУК (табл. 5).

Установлено, что содержание ИУК в культуральной жидкости бактерий варьировалось в пределах 6,8–89,7 мкг ИУК/мл культуральной жидкости. Максимальная концентрация ИУК выявлена у изолятов Ср-1, СА-6

– на 14 %.

и ФП2/1 – 89,7; 37,8 и 64,7 мкг ИУК/мл соответственно. На основании неспецифического фитостимулирующего действия на семена редиса розово-красного отобраны наиболее эффективные изоляты DST102, ФП2/1, СА-6 и Ср-1, среди которых был проведен скрининг на способность переносить условия абиотического стресса, такие как засоление и засуха.

В настоящее время исследование большинства моделей засухи основывается на использовании в качестве непроникающего осмотического агента ПЭГ-6000, который ведет к снижению водного потенциала среды, а следовательно, к блокированию поглощения воды клеткой. В лабораторных условиях была создана модель засухи в жидкой среде LB с определенным значением водного потенциала: –0,20; –0,42; –1,31 МПа (табл. 6).

Таблица 6. Глубинное культивирование изолятов с различным водным потенциалом в условиях дефицита влаги

Table 6. Submersed cultivation of isolates exposed to water deficiency conditions differing in osmotic potential

Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл		
	–0,20 МПа	–0,42 МПа	–1,31 МПа
Ср-1			
0	$(8,67 \pm 0,643) \cdot 10^8$	$(8,60 \pm 0,400) \cdot 10^8$	$(8,20 \pm 0,529) \cdot 10^8$
24	$(7,67 \pm 0,416) \cdot 10^8$	$(7,27 \pm 0,503) \cdot 10^8$	$(7,07 \pm 0,808) \cdot 10^7$
48	$(7,40 \pm 0,611) \cdot 10^8$	$(7,07 \pm 0,400) \cdot 10^8$	$(2,27 \pm 0,306) \cdot 10^7$
ФП2/1			
0	$(9,00 \pm 0,400) \cdot 10^8$	$(9,07 \pm 0,702) \cdot 10^8$	$(9,00 \pm 0,200) \cdot 10^8$
24	$(1,73 \pm 0,114) \cdot 10^8$	$(1,41 \pm 0,042) \cdot 10^8$	$(9,13 \pm 0,306) \cdot 10^7$
48	$(1,45 \pm 0,053) \cdot 10^8$	$(1,18 \pm 0,020) \cdot 10^8$	$(5,20 \pm 0,600) \cdot 10^7$
DST102			
0	$(6,07 \pm 0,130) \cdot 10^8$	$(6,07 \pm 0,115) \cdot 10^8$	$(6,00 \pm 0,200) \cdot 10^8$
24	$(1,83 \pm 0,031) \cdot 10^7$	$(1,50 \pm 0,072) \cdot 10^7$	$(9,73 \pm 0,306) \cdot 10^7$
48	$(1,25 \pm 0,050) \cdot 10^7$	$(1,09 \pm 0,083) \cdot 10^6$	$(8,07 \pm 0,306) \cdot 10^6$
СА-6			
0	$(6,87 \pm 0,416) \cdot 10^8$	$(6,67 \pm 0,833) \cdot 10^8$	$(6,80 \pm 0,721) \cdot 10^8$
24	$(5,80 \pm 0,200) \cdot 10^8$	$(2,95 \pm 0,076) \cdot 10^8$	$(9,20 \pm 0,200) \cdot 10^7$
48	$(4,93 \pm 0,231) \cdot 10^8$	$(2,79 \pm 0,090) \cdot 10^8$	$(6,60 \pm 0,600) \cdot 10^7$

Установлено, что засуха, вызванная ПЭГ-6000, влияет на рост всех изолятов. Однако между вариантами при глубинном культивировании изолятов Ср-1, ФП2/1, СА-6 с осмотическим потенциалом –0,20 и –0,42 МПа существенной разницы по титрам жизнеспособных клеток по сравнению с первоначальным титром в 0 ч не отмечено. Число колониеобразующих единиц изолятов Ср-1, ФП2/1, СА-6 на вторые сутки культивирования в жидкой среде LB с концентрацией ПЭГ-6000 3 % составило $7,40 \cdot 10^8$, $1,45 \cdot 10^8$ и $4,93 \cdot 10^8$ КОЕ/мл соответственно, а при концентрации 5 % – $7,07 \cdot 10^8$, $1,18 \cdot 10^8$ и $2,79 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. При культивировании изолятов DST102 в условиях осмотического потенциала –0,20 МПа титр клеток уменьшился в 48,7 раза, а при стрессе (–0,42 МПа) – в 55,5 раза по сравнению с первоначальным титром в 0 ч. Численность жизнеспособных клеток у изолятов DST102 через 48 ч культивирования в опыте с осмотическим потенциалом –0,20 МПа составила $1,25 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, а в опыте с потенциалом –0,42 МПа – $1,09 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Водный потенциал –1,31 МПа негативно влиял на все изоляты. Количество жизнеспособных клеток у всех изолятов уменьшилось до 10^6 – 10^7 КОЕ/мл. Учитывая изложенное выше, для дальнейшего изучения были отобраны изоляты ФП2/1, СА-6 и Ср-1, которые лучше росли в условиях засухи, вызванной ПЭГ-6000.

В лабораторных условиях проведен опыт на способность изолятов Ср-1, СА-6 и ФП2/1 переносить условия осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия в концентрациях 1197, 1710 и 2052 мМ (рис. 4).

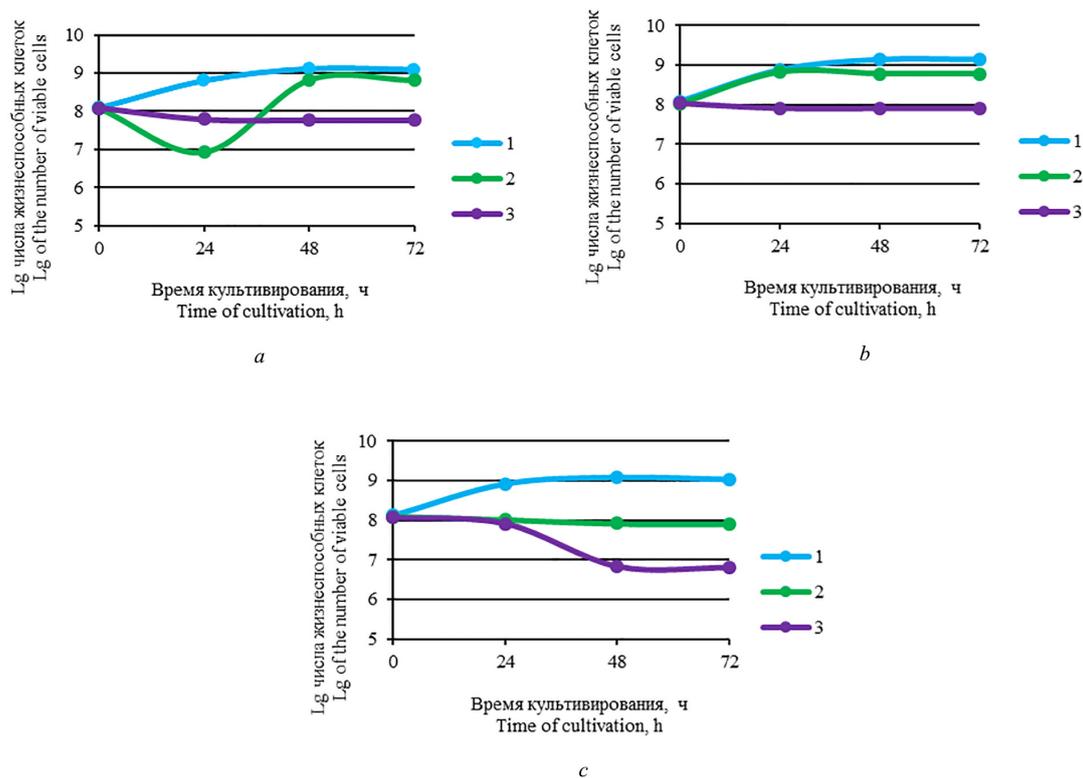


Рис. 4. Глубинное культивирование изолятов Ср-1 (а), СА-6 (b), ФП2/1 (с) в условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия в разной концентрации: 1 – среда LB + 1197 мМ NaCl; 2 – среда LB + 1710 мМ NaCl; 3 – среда LB + 2052 мМ NaCl

Fig. 4. Submerged culture of isolates Cp-1 (a), CA-6 (b), ФП2/1 (c) subjected to osmotic stress induced by various levels of sodium chloride: 1 – LB medium + 1197 mM NaCl; 2 – LB medium + 1710 mM NaCl; 3 – LB medium + 2052 mM NaCl

Установлено, что осмотический стресс, вызванный хлоридом натрия в концентрации 1197 мМ, не оказывает негативного эффекта на микроорганизмы Ср-1, СА-6, ФП2/1: максимальный титр жизнеспособных клеток достигается через 48 ч и составляет $1,27 \cdot 10^9$, $1,40 \cdot 10^9$ и $1,20 \cdot 10^9$ КОЕ/мл соответственно. При концентрации NaCl в среде 1710 мМ у всех изолятов Ср-1, СА-6, ФП2/1 наблюдается снижение числа колониеобразующих единиц, особенно в первые 24 ч, что свидетельствует о негативном влиянии высокого содержания соли в среде и реакции клеток на стресс. Однако у изолята Ср-1 количество клеток за первые сутки культивирования снижалось до 10^6 КОЕ/мл, а на вторые сутки вновь увеличивалось до 10^8 КОЕ/мл, что свидетельствует о способности изолята переносить неблагоприятные условия среды. Хлорид натрия в концентрации 1710 мМ оказывал негативное влияние и на численность клеток изолятов СА-6 и ФП2/1. Титр жизнеспособных клеток у изолята СА-6 через 24 ч культивирования снижался до $6,60 \cdot 10^8$ КОЕ/мл и сохранялся в течение всего времени культивирования, а у изолята ФП2/1 наблюдалось снижение численности клеток до 10^7 КОЕ/мл на вторые сутки культивирования. Осмотический стресс, вызванный содержанием соли в среде в количестве 2052 мМ, негативно влиял на изоляты Ср-1, СА-6, ФП2/1: число колониеобразующих единиц через 48–72 ч падало до 10^6 КОЕ/мл, что свидетельствует о токсичности высоких доз хлорида натрия.

В соответствии с целью нашего исследования наиболее перспективными для дальнейших исследований являются изоляты СА-6, Ср-1, которые обладают азотфиксирующей, фосфатсольюбилизирующей и ростстимулирующей активностью и способны переносить абиотический стресс, вызванный повышенным содержанием хлорида натрия и дефицитом влаги в среде.

Для таксономической характеристики и видовой идентификации изолятов Ср-1 и СА-6 было осуществлено секвенирование гена 16S рРНК по Сэнгеру. При секвенировании переменных участков гена, кодирующих 16S рРНК, были получены нуклеотидные последовательности, кото-

рыя сраўнівалі з паслядоўнасцямі штаммоў блізкародзественных відаў, прадставленых в базе даных GenBank. Ааналіз паслядоўнасці нуклеотыдаў варыябельных участкаў генаў, кодуючых 16S рРНК, паказал, што тэстуемы ізалят Ср-1 на 98 % гомалогічэн штамму *Bacillus sp.* і на 97 % – штаммам *Bacillus megaterium* і *Bacillus aryabhatai*, а аналізаваная нуклеотыдная паслядоўнасць фрагмента гена 16S рРНК ізалята СА-6 на 95 % ідэнтычна такой у бактэрыяў штаммоў *Rhodococcus sp.*, *Rhodococcus jostii* і *Rhodococcus opacus*.

Філагенетычны аналіз нуклеотыдных паслядоўнасцей гена 16S рРНК ізалята Ср-1 паказал, што ісследуемая паслядоўнасць на 89 і 85 % сходна з такіх гомалогічных генаў бактэрыяў відаў *Bacillus aryabhatai* ER 12 і *Bacillus sp.* VK-7 адпаведна (рыс. 5).

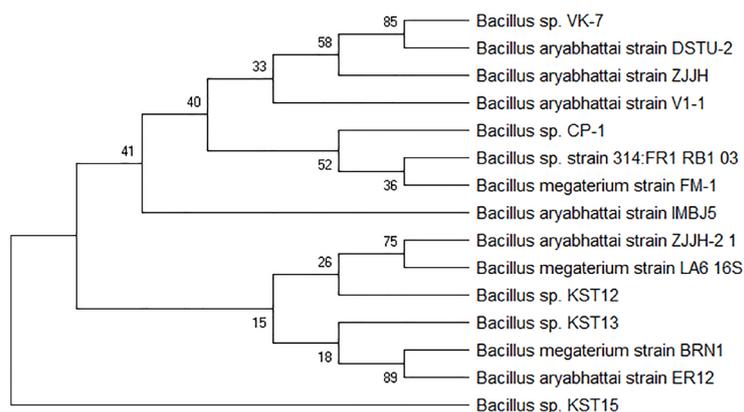


Рис. 5. Філагенетычнае дрэва, пабудаванае метадам «прысоеднання суседзяў» па выніках сраўняльнага аналізу нуклеотыдных паслядоўнасцей фрагментаў гена 16S рРНК штамма *Bacillus sp.* Cp-1 і штаммоў блізкародзественных відаў

Fig. 5. Phylogenetic tree constructed by “neighbor adjointment” technique and based on comparative analysis of nucleotide sequences of 16S rRNA gene fragments from strain *Bacillus sp.* Cp-1 and strains of closely related species

Філагенетычнае сраўненне атрыманай нуклеотыднай паслядоўнасці фрагмента гена 16S рРНК ізалята СА-6 пазволяла ўстанавіць, што фрагмент гена 16S рРНК на 93 і 97 % гомалогічэн генам 16S рРНК штаммоў *Rhodococcus jostii* IFO 16295 і *Rhodococcus opacus* DSM43205 адпаведна (рыс. 6).

Для вызначэння відавочнай прыналежнасці ізалятаў Ср-1 і СА-6 праведзена таксама ідэнтыфікацыя на аснове вывучэння спектраў белковых профіляў пры дапамозе MALDI-TOF мас-спектраванні. В выніку праведзенага аналізу ўстаноўлена, што ізалят Ср-1 на 99,9 % ідэн-

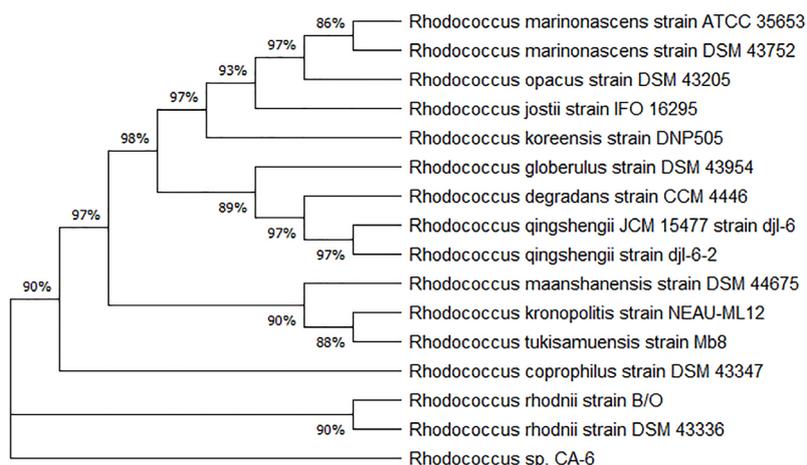


Рис. 6. Філагенетычнае дрэва, пабудаванае метадам «прысоеднання суседзяў» па выніках сраўняльнага аналізу нуклеотыдных паслядоўнасцей фрагментаў гена 16S рРНК штамма *Rhodococcus sp.* CA-6 і штаммоў блізкародзественных відаў

Fig. 6. Phylogenetic tree constructed by “neighbor adjointment” technique and based on comparative analysis of nucleotide sequences of 16S rRNA gene fragments from strain *Rhodococcus sp.* CA-6 and strains of closely related species

тичен штамму *Bacillus megaterium*, а изолят СА-6 – на 99,9 % штамму *Rhodococcus jostii*. Данные по идентификации при секвенировании фрагмента гена 16S рРНК и MALDI-TOF масс-спектрометрии показывают, что исследуемые изоляты Ср-1 и СА-6 принадлежат к бактериям со следующим таксономическим положением: изолят Ср-1 – домен *Bacteria*, тип *Firmicutes*, класс *Bacilli*, порядок *Bacillales*, семейство *Bacillaceae*, род *Bacillus*, вид *Bacillus megaterium*. В связи с изменениями в таксономии бактерий рода *Bacillus* видовое название *Bacillus megaterium* изменено на *Priestia megaterium*; изолят СА-6 – домен *Bacteria*, тип *Actinobacteria*, класс *Actinobacteria*, порядок *Corynebacteriales*, семейство *Nocardiaceae*, род *Rhodococcus*, вид *Rhodococcus jostii*. Штаммы *Priestia megaterium* Ср-1 и *Rhodococcus jostii* СА-6 депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под регистрационными номерами БИМ В-1314Д и БИМ В-1353Д соответственно.

Таким образом, бактериальные штаммы *Rhodococcus jostii* СА-6 и *Priestia megaterium* Ср-1 могут быть использованы в качестве азотфиксирующего и фосфатсольбилизирующего компонентов при создании микробного препарата для минимизации негативного влияния абиотических факторов, таких как засоление и дефицит влаги.

Заключение. Впервые выделены и идентифицированы азотфиксирующий штамм *Rhodococcus jostii* СА-6 и фосфатсольбилизирующий штамм *Priestia megaterium* Ср-1, способные переносить абиотический стресс, вызванный хлоридом натрия в концентрациях 1710 и 2565 мМ соответственно и дефицитом влаги при водном потенциале $-0,20$ и $-0,42$ МПа. Солеустойчивый штамм *Priestia megaterium* Ср-1 способен сольбилизовать фосфаты с образованием зон «галло» 9 мм, а штамм *Rhodococcus jostii* СА-6 обладает нитрогеназной активностью 44,0 нМ C_2H_4 /фл/3 сут. Штаммы *Priestia megaterium* Ср-1 и *Rhodococcus jostii* СА-6 являются ростстимулирующими микроорганизмами, что обусловлено их способностью синтезировать ИУК в концентрациях 89,7 и 37,8 мкг ИУК/мл культуральной жидкости соответственно. Солеустойчивые штаммы *Priestia megaterium* Ср-1 и *Rhodococcus jostii* СА-6 депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номерами БИМ В-1314Д и БИМ В-1353Д соответственно.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б17АРМ-044).

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории «Центр аналитических и гено-инженерных исследований» Института микробиологии НАН Беларуси за помощь в проведении идентификации бактериальных изолятов.

Acknowledgements. This study was financially supported by Belarusian Republican Foundation for Basic Investigations (project No. B17ARM-044).

The authors express sincere gratitude to the researchers of the “Center of analytical and genetic engineering research”, Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, for assistance provided in the course of identification of bacterial isolates.

Список использованных источников

1. Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils / D. Egamberdieva [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – Art. 2791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02791>
2. Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under aerobic conditions / N. Hedi [et al.] // *Int. J. Microbiol.* – 2009. – Vol. 2009. – Art. ID 731786. <https://doi.org/10.1155/2009/731786>
3. Salt-tolerant and plant-growth-promoting bacteria isolated from high-yield paddy soil / S. Zhang [et al.] // *Canad. J. Microbiol.* – 2018. – Vol. 64, N 12. – P. 968–978. <https://doi.org/10.9755/cjfa.v25i2.7590>
4. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук ; пер. с англ. А. А. Баева [и др.] ; под ред. К. Г. Скрыбина. – М. : Мир, 1984. – 479 с.
5. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги ; пер. с венг. И. Ф. Куренко ; под ред. Г. С. Муромцева. – М. : Колас, 1983. – 296 с.
6. Методы почвенной микробиологии и биохимии : учеб. пособие / Д. Г. Звягинцев [и др.] ; под ред. Д. Г. Звягинцева. – М. : Изд-во МГУ, 1980. – 224 с.
7. Методы общей бактериологии : в 3 т. / под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М. : Мир, 1983. – Т. 3. – 264 с.
8. Yadav, A. Phosphate solubilizing activity of *Pseudomonas fluorescens* PSM1 isolated from wheat rhizosphere / A. Yadav, K. Yadav, A. Vashistha // *J. Appl. Nat. Sci.* – 2016. – Vol. 8, N 1. – P. 93–96. <https://doi.org/10.31018/jans.v8i1.754>
9. Biochemical and molecular characterization of potential phosphate-solubilizing bacteria in acid sulfate soils and their beneficial effects on rice growth / Q. A. Panhwar [et al.] // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9, N 10. – P. e97241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097241>
10. Умаров, М. М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях / М. М. Умаров // *Почвоведение.* – 1976. – № 11. – С. 119–123.
11. Sarwar, M. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria / M. Sarwar, R. J. Kremer // *Plant Soil.* – 1995. – Vol. 172. – P. 261–269. <https://doi.org/10.1007/BF00011328>

12. Возняковская, Ю. М. Микрофлора растений и урожай / Ю. М. Возняковская. – Л. : Колос, 1969. – 240 с.
13. Guo, R. Effects of water stress on germination and growth of linseed seedlings (*Linum usitatissimum* L.), photosynthetic efficiency and accumulation of metabolites / R. Guo, W. P. Hao, D. Z. Gong // J. Agricult. Sci. – 2012. – Vol. 4, N 10. – P. 253–265. <https://doi.org/10.5539/jas.v4n10p253>
14. Molecular characterization of stress tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for growth enhancement of rice / S. H. Habib [et al.] // Int. J. Agricult. Biol. – 2015. – Vol. 18, N 1. – P. 184–191. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0094>
15. Genetic diversity and phylogeny of alfalfa nodulating rhizobia assessed by *nifH* and *nodA* genes / A. A. S. Toolarood [et al.] // Int. Res. J. Appl. Basic Sci. – 2012. – Vol. 3, N 7. – P. 1470–1476.
16. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study / W. G. Weisburg [et al.] // J. Bacteriol. – 1991. – Vol. 173, N 2. – P. 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

References

1. Egamberdieva D., Wirth S., Bellingrath-Kimura S. D., Mishra J., Arora N. K. Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in Microbiology*, 2019, vol. 10, art. 2791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02791>
2. Hedi A., Sadfi N., Fardeau M-L., Rebib H., Cayol J-L., Ollivier B., Boudabous A. Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under aerobic conditions. *International Journal of Microbiology*, 2009, vol. 2009, art. ID 731786. <https://doi.org/10.1155/2009/731786>
3. Zhang S., Fan C., Wang Y., Xia Y., Xiao W., Cui X. Salt-tolerant and plant-growth-promoting bacteria isolated from high-yield paddy soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 2018, vol. 64, no. 12, pp. 968–978. <https://doi.org/10.9755/cjfm.v25i2.7590>
4. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Moscow, Mir Publ., 1984. 479 p. (in Russian).
5. Segi I. *Methods of soil microbiology*. Moscow, Kolas Publ., 1983. 296 p. (in Russian).
6. Zvyagintsev D. G., Aseeva I. V., Bab'eva I. P., Mirchink T. G. *Methods of soil microbiology and biochemistry*. Moscow, Moscow State University Publishing House, 1980. 224 p. (in Russian).
7. Gerhardt P. (ed.). *Manual of methods for general bacteriology*. Vol. 3. Moscow, Mir Publ., 1983. 264 p. (in Russian).
8. Yadav A., Yadav K., Vashistha A. Phosphate solubilizing activity of *Pseudomonas fluorescens* PSM1 isolated from wheat rhizosphere. *Journal of Applied and Natural Science*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 93–96. <https://doi.org/10.31018/jans.v8i1.754>
9. Panhwar Q. A., Naher U. A., Jusop Sh., Othman R., Latif Md. A., Ismail M. R. Biochemical and molecular characterization of potential phosphate-solubilizing bacteria in acid sulfate soils and their beneficial effects on rice growth. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 10, p. e97241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097241>
10. Umarov M. M. Acetylene method of studying nitrogen fixation in soil microbiology investigations. *Pochvovedenie [Soil Science]*, 1976, no. 11, pp. 119–123 (in Russian).
11. Sarwar M., Kremer R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant Soil*, 1995, vol. 172, pp. 261–269. <https://doi.org/10.1007/BF00011328>
12. Voznyakovskaya Yu. M. *Plant microflora and harvests*. Leningrad, Kolos Publ., 1969. 240 p. (in Russian).
13. Guo R., Hao W. P., Gong D. Z. Effects of water stress on germination and growth of linseed seedlings (*Linum usitatissimum* L.), photosynthetic efficiency and accumulation of metabolites. *Journal of Agricultural Science*, 2012, vol. 4, no. 10, pp. 253–265. <https://doi.org/10.5539/jas.v4n10p253>
14. Habib S. H., Kausar H., Saud H. M., Ismail M. R., Othman R. Molecular characterization of stress tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for growth enhancement of rice. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2015, vol. 18, no. 1, pp. 184–191. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0094>
15. Toolarood A. A. S., Alikhani H. A., Salehi Gh., Asadi-Rahmani H., Khavazi K., Poorbabaee A. A., Lindström K. Genetic diversity and phylogeny of alfalfa nodulating rhizobia assessed by *nifH* and *nodA* genes. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 2012, vol. 3, no. 7, pp. 1470–1476.
16. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, vol. 173, no. 2, pp. 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

Информация об авторах

Наумович Надежда Ивановна – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: naumovichnadezda@yandex.ru

Алесченкова Зинаида Михайловна – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: z_aleschenkova@tut.by

Ананьева Ирина Николаевна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ananeva@mbio.bas-net.by

Сафронова Галина Владимировна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: hsafronava@mail.ru

Information about the authors

Nadezhda I. Naumovich – Junior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: naumovichnadezda@yandex.ru

Zinaida M. Aleschenkova – D. Sc. (Biol.), Chief Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: z_aleschenkova@tut.by

Irina N. Ananyeva – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ananeva@mbio.bas-net.by

Halina V. Safronava – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: hsafronava@mail.ru