

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.24
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-285-292>

Поступила в редакцию 14.03.2022
Received 14.03.2022

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

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ – ОСНОВЫ МИКРОБНОГО УДОБРЕНИЯ «БИОТИЛИЯ»

Аннотация. Изучена способность солеустойчивых ростстимулирующих фосфатсольубилизирующих *Priestia megaterium* Cp-1 и азотфиксирующих *Rhodococcus jostii* CA-6 штаммов расти на среде, содержащей углеводороды нефти (0,1 %) в качестве единственного источника углерода и энергии, а также ионы тяжелых металлов (0,1–5,0 ммоль/л), что обеспечивает этим штаммам жизнеспособность в условиях загрязнения почвы углеводородами, тяжелыми металлами и хлоридом натрия. Подобрана оптимальная питательная среда для роста и развития галотолерантных штаммов *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1, содержащая в качестве источника углерода побочный продукт свекло-сахарного производства мелассу в количестве 30 г/л (среда Мейнелла). Использование для засева питательной среды двухсуточного посевного материала *Rh. jostii* CA-6 и односуточного *P. megaterium* Cp-1 при скорости вращения шейкера (180 ± 10) об/мин является наиболее продуктивным. С целью получения титра штаммов-биоагентов не менее 1,0·10⁹ КОЕ/мл при глубинном культивировании наиболее технологичным является использование посевного материала в количестве 5 % от объема среды. Раздельно культивируемые штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6, составляющие основу микробного удобрения «Биотилия», при смешивании 1:1 сохраняют свою жизнеспособность на высоком и экологически значимом уровне ((1,67–2,2)·10⁹ КОЕ/мл) через 3 мес. хранения при температуре от +4 до +15 °С.

Ключевые слова: технологические параметры, глубинное культивирование, микробное удобрение, засоление, выживаемость

Для цитирования: Культивирование солеустойчивых бактерий – основы микробного удобрения «Биотилия» / Н. И. Наумович [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 3. – С. 285–292. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-285-292>

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

CULTIVATION OF HALOTOLERANT BACTERIA AS A BASIS OF THE MICROBIAL FERTILIZER “BIOTILIA”

Abstract. The ability of salt-resistant growth-promoting phosphate-solubilizing *Priestia megaterium* Cp-1 and nitrogen-fixing *Rhodococcus jostii* CA-6 strains to grow on the medium containing oil hydrocarbons (0.1 %) as the only carbon and energy source in the presence of heavy metal ions (0.1–5.0 mmol/l) providing the enhanced viability in soil contaminated with hydrocarbons, heavy metal and sodium chloride was investigated. The optimum nutrient medium was selected for the growth and development of halotolerant strains *Rh. jostii* CA-6 and *P. megaterium* Cp-1 comprising as a product of sugar refining – molasses as the carbon source in an amount of 30 g/l (Meynell medium). Application of 48h culture of *Rh. jostii* CA-6 and 24h culture of *P. megaterium* Cp-1 for inoculation of the nutrient medium grown at the agitation rate of the shaker (180 ± 10) rpm appears to be the most efficient fermentation method. To reach the titer of viable strains at least 1.0·10⁹ CFU/ml in submerged culture, the most appropriate procedure envisages the introduction of a seed material in an amount of 5 % of nutrient medium volume. Separately cultured strains *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6 – the basic components of the microbial fertilizer “Biotilia” are mixed in the 1:1 ratio and preserve their vital characteristics at an elevated eco-significant level ((1.67–2.2)·10⁹ CFU/ml) in 3 months of storage in the temperature range of +4– +15 °C.

Keywords: technological parameters, submerged cultivation, microbial fertilizer, salinization, survival rate

For citation: Naumovich N. I., Aleschenkova Z. M., Ananyeva I. N., Safronava H. V. Cultivation of halotolerant bacteria as a basis of the microbial fertilizer “Biotilia”. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyologichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 285–292 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-285-292>

Введение. Одними из основных источников антропогенных загрязнений, оказывающих негативное влияние на зеленые насаждения в городах и вызывающих засоление почвы, являются противогололедные реагенты, применяемые в зимний период [1]. В Республике Беларусь в качестве противогололедного реагента используют минеральный концентрат галит, состоящий

из натрия хлористого технического с примесями других химических веществ, который негативно влияет на почву и растения, произрастающие вдоль транспортных автомагистралей (по ТУ РБ 600122610.016-2002).

В минимизации негативного воздействия соли на почвы и растительные организмы перспективным и эффективным направлением является биоремедиация – использование микробных препаратов, созданных на основе микроорганизмов, выделенных из засоленных природных экосистем. Среди них значимое место принадлежит штаммам галотолерантных бактерий, обладающих комплексом хозяйственно ценных свойств (азотфиксацией, фосфатсолубилизацией и рост-стимуляцией, обусловленной синтезом ауксина и осмопротекторов – пролина и бетаина) и способных расти в присутствии углеводов и ионов тяжелых металлов. Микробные препараты, полученные на основе природных непатогенных и нетоксичных штаммов микроорганизмов, обладают комплексом полезных свойств, эффективно размножаются в засоленной почве, экологически безопасны, не создают угрозы биогенного загрязнения и имеют пролонгированное действие [2].

Главным преимуществом метода биоремедиации почв с использованием микроорганизмов является длительность действия последних и гармонизация экосистем. В настоящее время с целью биоремедиации засоленных почв с использованием микроорганизмов активно разрабатываются микробные препараты, направленные на уменьшение негативного влияния засоления. Положительные результаты применения микробных препаратов для минимизации негативного влияния засоления на растения, по-видимому, определяются высоким природным адаптационным потенциалом растительно-микробных ассоциаций и их эволюционно закрепленным взаимовыгодным сосуществованием [3].

В связи с изложенным выше особый интерес представляет консорциум штаммов, состоящий из солеустойчивых азотфиксирующих *Rh. jostii* СА-6 и фосфатсолубилизирующих *P. megaterium* Ср-1 бактерий, растущих на среде, содержащей хлорид натрия в концентрациях 2052 и 2565 мМ соответственно, способствующих восстановлению в почве азотно-фосфорного баланса биологическим способом, что обеспечивает не только сохранность зеленых насаждений, но и улучшает их жизненное состояние и стимулирует рост [4].

Цель работы – подбор питательной среды и оптимизация условий культивирования солеустойчивых бактерий *P. megaterium* Ср-1 и *Rh. jostii* СА-6 с целью получения микробного удобрения.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлись выделенные из образцов почвы, отобранной на территории ОАО «Беларуськалий», бактериальные штаммы *P. megaterium* Ср-1 и *Rh. jostii* СА-6, способные расти на среде, содержащей 2565 мМ (15 %) и 2052 мМ (12 %) NaCl и обладающие взаимодополняющими ценными свойствами.

Способность штаммов *P. megaterium* Ср-1 и *Rh. jostii* СА-6 расти в присутствии углеводов изучали на среде Е8 [5], содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии нефть, дизельное топливо, индустриальное масло, керосин, гексадекан, гексан и ксилол в концентрации 0,1 % [5].

Устойчивость исследуемых бактерий к ионам тяжелых металлов определяли на основании способности расти на агаризованной LB-среде [6], содержащей ионы тяжелых металлов (Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}) в концентрации 0,1–5,0 ммоль/л [7].

Оптимизацию состава питательной среды для глубинного культивирования солеустойчивых азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих бактерий проводили в лабораторных и производственных условиях. Рост отобранных штаммов исследовали на жидких питательных средах: LB, Мейнелла и модифицированной среде Мейнелла [8, 9]. Раздельное глубинное культивирование штаммов в лабораторных условиях проводили в течение 72 ч на лабораторной качалке с частотой вращения (200 ± 20) об/мин в колбах Эрленмейра объемом 250 мл со 100 мл изучаемой питательной среды. Количество инокулята – 10 об. %.

Отработку режимов массообмена проводили на шейкере-инкубаторе WY-211 в колбах номинальным объемом 2 л и коэффициентом заполнения питательной средой 0,5. Раздельное глубинное культивирование штаммов осуществляли на среде Мейнелла с внесением в среду инокулята в объеме 10 % от объема среды при температуре (28 ± 1) °С. Скорость вращения качалки – (140 ± 10) и (180 ± 10) об/мин, время культивирования – 72 ч.

Отработку технологических параметров получения микробного удобрения «Биотилия», состоящего из консорциума штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6, проводили в Научно-производственном центре биотехнологий Института микробиологии НАН Беларуси. Раздельное глубинное культивирование штаммов Cp-1 и CA-6 осуществляли на ферментере Biotron SP-60 с коэффициентом заполнения 0,5. Штаммы выращивали на среде Мейнелла при следующих условиях: количество посевного материала – 5 и 10 об. %, скорость вращения мешалки – (70 ± 20) об/мин, аэрация – 0,8–1,0 л воздуха/л среды/мин, температура – (30 ± 1) °С, время раздельного глубинного культивирования – 48 ч.

Титр жизнеспособных клеток определяли методом Коха с последующим высевом разведений суспензии на поверхность мясо-пептонного агара [10]. Количественный учет выросших колоний проводили через 72 ч инкубирования в термостате при температуре (28 ± 2) °С.

Результаты и их обсуждение. В качестве основы микробного удобрения, предназначенного для минимизации негативного влияния противогололедных реагентов на городские насаждения и улучшения роста растений в условиях засоления, использованы эффективные солеустойчивые штаммы *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1, обладающие взаимодополняющими ценными свойствами. Фосфатсолюбилизирующий *P. megaterium* Cp-1 и азотфиксирующий *Rh. jostii* CA-6 штаммы обладают ростстимулирующим действием, обусловленным синтезом индолил-3-уксусной кислоты, и синтезируют осмолиты – пролин и бетаин, что обеспечивает им устойчивость в условиях засоления почвы.

Штаммы *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 способны расти на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии нефть и продукты ее переработки в концентрации 0,1 %. Установлено, что штамм *Rh. jostii* CA-6 характеризуется хорошим ростом на среде с нефтью, индустриальным маслом, дизельным топливом, керосином и гексадеканом. Штамм *P. megaterium* Cp-1 растет на среде с нефтью, дизельным топливом и керосином и слабо растет на среде с гексадеканом и керосином. Установлено, что исследуемые штаммы обладают устойчивостью к ионам тяжелых металлов. Выявлено, что штаммы *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 растут на среде, содержащей ионы тяжелых металлов Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} (в концентрации 5 ммоль/л), Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} (в концентрации 3 ммоль/л) и Cd^{2+} (в концентрации 0,01 ммоль/л). Штаммы *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 способны расти на среде, содержащей Pb^{2+} в концентрации 0,5 и 5 ммоль/л соответственно. Эти свойства обеспечивают им устойчивость к загрязнению городской среды углеводородами и тяжелыми металлами.

С целью подбора питательной среды для глубинного культивирования исследовали рост бактериальных штаммов *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 на различных по составу средах: LB, Мейнелла и модифицированной среде Мейнелла. Для сравнения динамики роста штаммов каждые 24 ч отбирали пробы и определяли титр жизнеспособных клеток. Показатели роста бактериальных штаммов на сравниваемых питательных средах приведены в табл. 1.

Таблица 1. Динамика численности жизнеспособных клеток штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 при раздельном глубинном культивировании на жидких питательных средах

Table 1. Dynamics of the viable cell titer of *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6 during separate submerged cultivation in liquid nutrient media

Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	
	<i>Rh. jostii</i> CA-6	<i>P. megaterium</i> Cp-1
LB-среда		
0	$(2,61 \pm 0,037) \cdot 10^7$	$(4,63 \pm 0,141) \cdot 10^7$
24	$(1,22 \pm 0,031) \cdot 10^8$	$(4,40 \pm 0,306) \cdot 10^8$
48	$(1,61 \pm 0,098) \cdot 10^9$	$(1,07 \pm 0,033) \cdot 10^9$
72	$(4,20 \pm 0,082) \cdot 10^8$	$(3,92 \pm 0,122) \cdot 10^8$
Среда Мейнелла (3,0 мас. % мелассы)		
0	$(2,13 \pm 0,070) \cdot 10^7$	$(4,44 \pm 0,000) \cdot 10^7$
24	$(1,14 \pm 0,046) \cdot 10^8$	$(4,45 \pm 0,184) \cdot 10^8$

Окончание табл. 1

Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	
	<i>Rh. jostii</i> СА-6	<i>P. megaterium</i> Ср-1
48	$(1,79 \pm 0,109) \cdot 10^9$	$(1,88 \pm 0,168) \cdot 10^9$
72	$(4,33 \pm 0,249) \cdot 10^8$	$(5,73 \pm 0,170) \cdot 10^8$
Модифицированная среда Мейнелла (2,0 мас. % мелассы)		
0	$(3,13 \pm 0,097) \cdot 10^7$	$(4,58 \pm 0,062) \cdot 10^7$
24	$(2,10 \pm 0,081) \cdot 10^8$	$(5,27 \pm 0,353) \cdot 10^8$
48	$(2,20 \pm 0,092) \cdot 10^9$	$(2,62 \pm 0,101) \cdot 10^9$
72	$(4,73 \pm 0,262) \cdot 10^8$	$(6,60 \pm 0,294) \cdot 10^8$

Результаты исследования свидетельствуют о пригодности различных питательных сред для получения культуральных жидкостей с титром жизнеспособных клеток не менее $1,0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Для получения указанного титра достаточно культивировать штаммы до 48 ч, так как при дальнейшем культивировании титр клеток снижается. Более высокие титры жизнеспособных клеток получены на среде Мейнелла и модифицированной среде Мейнелла. Количество жизнеспособных клеток *Rh. jostii* СА-6 на этих средах составляло $1,79 \cdot 10^9$ и $2,20 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, а для *P. megaterium* Ср-1 – $1,88 \cdot 10^9$ и $2,62 \cdot 10^9$ КОЕ/мл соответственно. Данные среды являются наиболее технологичными и недорогими, так как в их состав входит меласса – побочный продукт свеклосахарного производства.

С целью изучения возможности интенсификации процесса раздельного глубинного культивирования *Rh. jostii* СА-6 и *P. megaterium* Ср-1 изменили технологию подготовки посевного материала: в испытанные на предыдущем этапе питательные среды Мейнелла и модифицированную среду Мейнелла вносили двухсуточный посевной материал *Rh. jostii* СА-6 и суточный *P. megaterium* Ср-1, а также прогретый до 60 °С в течение 20 мин посевной материал *P. megaterium* Ср-1. Более высокие титры жизнеспособных клеток биоагентов получены на среде Мейнелла при внесении односуточного посевного материала *P. megaterium* Ср-1 и двухсуточного *Rh. jostii* СА-6. Титр клеток *Rh. jostii* СА-6 при глубинном культивировании на среде Мейнелла достигал максимума ($2,00 \cdot 10^9$ КОЕ/мл) через 48 ч. На модифицированной среде Мейнелла через 96 ч роста титр достигал только $9,70 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. При культивировании штамма *P. megaterium* Ср-1 на среде Мейнелла максимальная плотность бактериальной популяции выявлена через 48 ч глубинного выращивания ($3,50 \cdot 10^9$ КОЕ/мл). Максимальное число спор *P. megaterium* Ср-1 отмечалось также через 48 ч роста: на среде Мейнелла – $8,75 \cdot 10^8$ спор/мл, на модифицированной среде Мейнелла – $9,17 \cdot 10^8$ спор/мл. При использовании для засева питательной среды Мейнелла прогретого посевного материала *P. megaterium* Ср-1 максимальный титр жизнеспособных клеток биоагента выявлен через 48 ч роста – $1,71 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

При раздельном глубинном культивировании исследуемых штаммов выявлено изменение pH среды (рис. 1).

При росте бактерий *Rh. jostii* СА-6 обе питательные среды подщелачиваются, однако на модифицированной среде Мейнелла подщелачивание идет интенсивнее. При культивировании *P. megaterium* Ср-1 на среде Мейнелла в течение 96 ч наблюдается подкисление среды, а на модифицированной среде Мейнелла – подщелачивание. Максимальный титр жизнеспособных клеток штаммов бактерий *Rh. jostii* СА-6 и *P. megaterium* Ср-1 установлен через 48 ч культивирования при pH 7,25 и 7,05 соответственно.

Исследование влияния режимов массообмена на рост штаммов *Rh. jostii* СА-6 и *P. megaterium* Ср-1 при глубинном культивировании осуществляли при температуре (28 ± 2) °С на среде Мейнелла с внесенным в объеме 10 % инокулятом, используя шейкер-инкубатор WY-211 (табл. 2).

Максимальные титры жизнеспособных клеток бактерий и спор получены через 48 ч раздельного культивирования при скорости вращения шейкера (180 ± 10) об/мин. Их значения для *Rh. jostii* СА-6 составляли $2,3 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, для *P. megaterium* Ср-1 – $3,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл и $9,93 \cdot 10^8$ спор/мл.

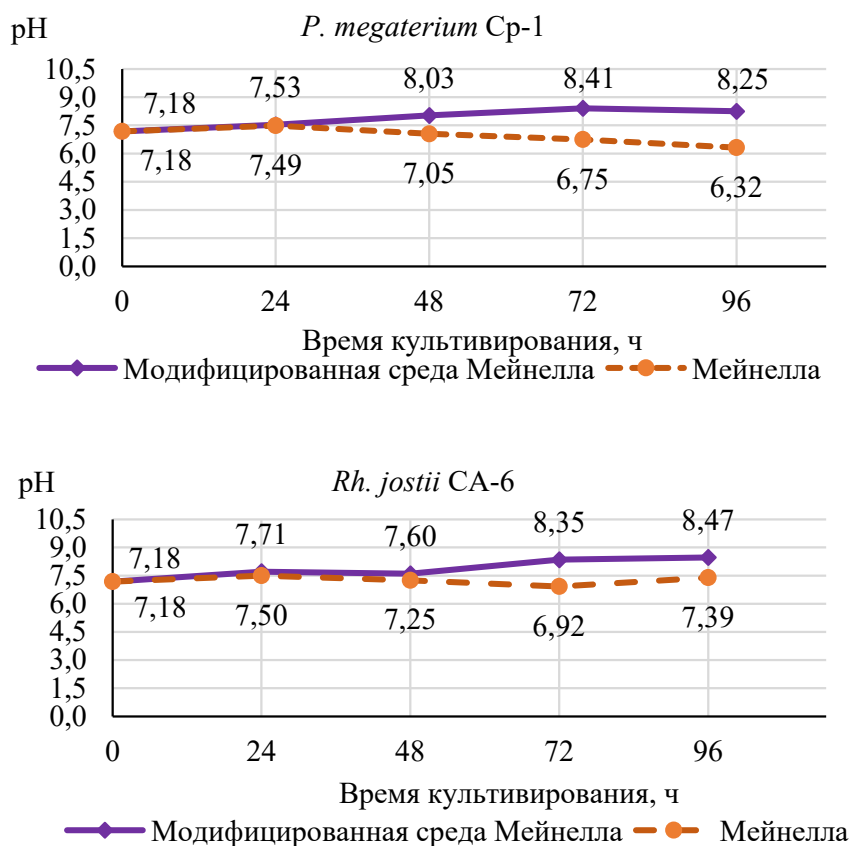


Рис. 1. Динамика изменения pH при культивировании микроорганизмов на жидких средах разного состава
 Fig. 1. Dynamics of pH change during microbial culture in liquid media of different composition

Таблица 2. Динамика численности жизнеспособных клеток штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 при разных режимах массообмена в условиях глубинного культивирования

Table 2. Dynamics of a number of viable cells of the strains *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6 under different mass transfer modes in submerged culture

Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	
	<i>Rh. jostii</i> CA-6	<i>P. megaterium</i> Cp-1
140 об/мин		
0	$(3,72 \pm 0,321) \cdot 10^7$	$(2,00 \pm 0,192) \cdot 10^7$
24	$(5,13 \pm 0,075) \cdot 10^8$	$(1,31 \pm 0,092) \cdot 10^8$
48	$(1,07 \pm 0,065) \cdot 10^9$	$(2,88 \pm 0,024) \cdot 10^9$
72	$(5,47 \pm 0,475) \cdot 10^8$	$(1,15 \pm 0,024) \cdot 10^8$
180 об/мин		
0	$(3,72 \pm 0,321) \cdot 10^7$	$(2,00 \pm 0,192) \cdot 10^7$
24	$(6,33 \pm 0,358) \cdot 10^8$	$(1,50 \pm 0,023) \cdot 10^8$
48	$(2,30 \pm 0,673) \cdot 10^9$	$(3,10 \pm 0,140) \cdot 10^9$
72	$(5,87 \pm 0,067) \cdot 10^8$	$(5,85 \pm 0,140) \cdot 10^8$

Таким образом, оптимальной средой для роста и развития *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 является среда Мейнелла, содержащая в качестве источника углерода побочный продукт сахарного производства мелассу в количестве 30 г/л. Для засева питательной среды продуктивным оказалось использование двухсуточного посевного материала *Rh. jostii* CA-6 и односуточного *P. megaterium* Cp-1 при скорости вращения шейкера (180 ± 10) об/мин.

С целью масштабирования процесса культивирования исследовали рост штаммов *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 в производственных условиях на среде Мейнелла при использовании 5 и 10 % посевного материала (скорость вращения мешалки – (70 ± 20) об/мин, аэрация – 1,0 л воздуха/л среды/мин, температура – (28 ± 2) °С. Результаты раздельного глубинного культивирования исследуемых штаммов представлены в табл. 3.

Таблица 3. Динамика развития популяции жизнеспособных клеток штаммов *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 при раздельном глубинном культивировании в ферментере Biotron SP-60

Table 3. Dynamics of development of the viable cell population of *Rh. jostii* CA-6 and *P. megaterium* Cp-1 during separate submerged cultivation in a Biotron SP-60 fermenter

Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	
	Кол-во инокулята 5 об. %	Кол-во инокулята 10 об. %
<i>P. megaterium</i> Cp-1		
0	$(1,93 \pm 0,167) \cdot 10^7$	$(4,85 \pm 0,093) \cdot 10^7$
24	$(4,60 \pm 0,020) \cdot 10^8$	$(6,53 \pm 0,263) \cdot 10^8$
48	$(6,37 \pm 0,087) \cdot 10^8$	$(2,21 \pm 0,047) \cdot 10^9$
<i>Rh. jostii</i> CA-6		
0	$(9,42 \pm 0,012) \cdot 10^6$	$(3,57 \pm 0,0708) \cdot 10^7$
24	$(4,96 \pm 0,058) \cdot 10^7$	$(4,99 \pm 0,179) \cdot 10^8$
48	$(1,03 \pm 0,004) \cdot 10^9$	$(3,18 \pm 0,042) \cdot 10^9$

При раздельном глубинном культивировании исследуемых штаммов было выявлено, что через 48 ч раздельного глубинного роста титр жизнеспособных клеток *P. megaterium* Cp-1 на среде Мейнелла при внесении 10 % посевного материала составил $2,21 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, а для штамма *Rh. jostii* CA-6 – $3,18 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Максимальный титр жизнеспособных клеток Cp-1 ($(2,23 \pm 0,012) \cdot 10^9$ КОЕ/мл) получен через 36 ч раздельного глубинного культивирования бактерий при внесении 5 % посевного материала. При глубинном культивировании штамма *Rh. jostii* CA-6 в условиях внесения 5 % посевного материала титр жизнеспособных клеток через 48 ч составлял $(1,03 \pm 0,004) \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

Таким образом, для получения микробного удобрения с титром не менее $1,0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл в производственных условиях наиболее технологичным будет использование посевного материала в количестве 5 % от объема среды культивирования.

В процессе глубинного культивирования фосфатсольюбилизирующего штамма *P. megaterium* Cp-1 с 4-го по 16-й час выращивания идет подкисление среды, что свидетельствует об образовании кислых метаболитов, а затем отмечается увеличение показателя pH (его значение приближается к исходному). При глубинном культивировании азотфиксирующего штамма *Rh. jostii* CA-6 значения pH среды более стабильны (рис. 2).

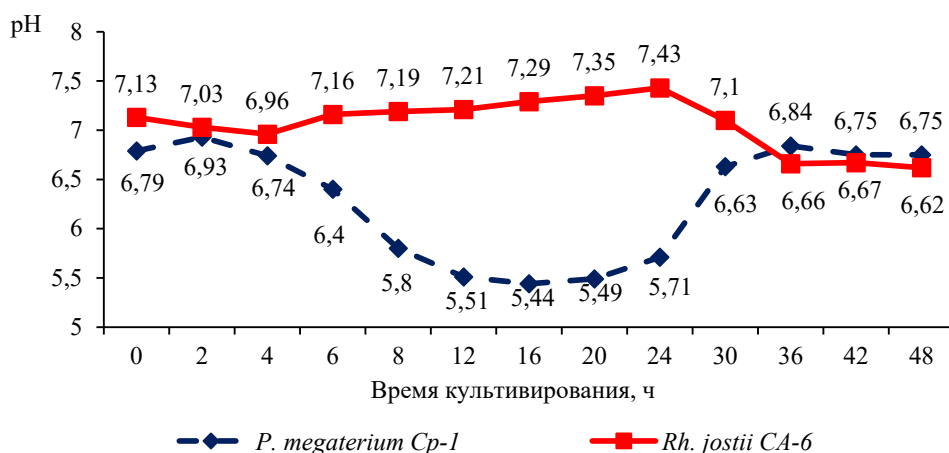


Рис. 2. Значения pH среды при раздельном глубинном культивировании штаммов *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1

Fig. 2. The pH values of the medium during separate submerged cultivation of *Rh. jostii* CA-6 and *P. megaterium* Cp-1

С целью получения микробного удобрения культуральные жидкости отдельно выращенных солеустойчивых ростстимулирующих азотфиксирующего *Rh. jostii* СА-6 и фосфатсолубилизирующего *P. megaterium* Ср-1 штаммов смешивают в соотношении 1:1. Изучение сохранности жизнеспособных клеток в микробном удобрении при температуре от +4 до +15 °С в течение 3 мес. показало, что исходный титр жизнеспособных бактериальных клеток, составляющий $5,37 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, через 3 мес. хранения при температуре от +4 до +15 °С снижается до $2,2 \cdot 10^9$ и $1,67 \cdot 10^9$ КОЕ/мл соответственно, что соответствует техническим условиям.

Данные, полученные в ходе отработки параметров культивирования штаммов *Rh. jostii* СА-6 и *P. megaterium* Ср-1 в производственных условиях, использованы для разработки технологии получения микробного удобрения «Биотилия», предназначенного для минимизации негативного влияния противогололедных реагентов на городские насаждения и улучшения роста растений в условиях засоления [11].

Заключение. Солеустойчивые фосфатсолубилизирующий *P. megaterium* Ср-1 и азотфиксирующий *Rh. jostii* СА-6 штаммы обладают ростстимулирующим действием, обусловленным синтезом индолил-3-уксусной кислоты, а также синтезируют осмолиты – пролин и бетаин, что обеспечивает им устойчивость в условиях засоления почвы хлоридом натрия. Наличие деструктивных свойств, обусловленных способностью расти на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии нефть и продукты ее переработки в концентрации 0,1 %, и устойчивости к ионам тяжелых металлов в концентрации 0,1–5,0 ммоль/л обеспечивает этим штаммам жизнеспособность в условиях загрязнения почвы углеводородами и тяжелыми металлами.

Оптимальной средой для роста и развития штаммов *Rh. jostii* СА-6 и *P. megaterium* Ср-1 является среда Мейнелла, содержащая в качестве источника углерода побочный продукт свеклосахарного производства мелассу в количестве 30 г/л. Использование для засева питательной среды двухсуточного посевного материала *Rh. jostii* СА-6 и односуточного *P. megaterium* Ср-1 при скорости вращения шейкера (180 ± 10) об/мин является наиболее продуктивным. С целью получения титра штаммов-биоагентов не менее $1,0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл при глубинном культивировании наиболее технологичным является использование посевного материала в количестве 5 % от объема среды.

Раздельно культивируемые штаммы *Rh. jostii* СА-6 и *P. megaterium* Ср-1, составляющие основу микробного удобрения «Биотилия», при смешивании 1:1 сохраняют свою жизнеспособность на высоком и экологически значимом уровне ($1,67$ – $2,2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл) через 3 мес. хранения при температуре от +4 до +15 °С.

Список использованных источников

1. Дорохова, М. Ф. Экологическое состояние городских почв в условиях антропогенного засоления и загрязнения (на примере Северо-Западного округа Москвы) / М. Ф. Дорохова, Н. Е. Кошелева, Е. В. Терская // Теор. и приклад. экология. – 2015. – № 4. – С. 16–34.
2. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants : a review / D. M. Ha-Tran [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22, N 6. – Art. 3154. <https://doi.org/10.3390/ijms22063154>
3. The potential application of endophytes in management of stress from drought and salinity in crop plants / H. Verma [et al.] // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9, N 8. – Art. 1729. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081729>
4. 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.
5. Омирбекова, А. А. Изучение углеводородокисляющих микроорганизмов ризосферы и ризопланы растений : дис. ... д-ра биол. наук : 6D060700 / А. А. Омирбекова ; Казах. нац. ун-т имени аль-Фараби. – Алматы, 2015. – 128 с.
6. 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. Скрябина. – М. : Мир, 1984. – 479 с.
7. Bioremediation potentials of heavy metal tolerant bacteria isolated from petroleum refinery effluent / E. E. Oaikhena [et al.] // Am. J. Environ. Protect. – 2016. – Vol. 5, N 2. – P. 29–34. <https://doi.org/10.11648/j.ajep.20160502.12>
8. Мейнелл, Дж. Экспериментальная микробиология / Дж. Мейнелл, Э. Мейнелл. – М. : Мир, 1967. – С. 320.
9. Нагорный, Р. К. Технология получения и применения микробного препарата «Тэамин» для очистки абсорбционных растворов от третичных аминов : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06 / Р. К. Нагорный ; НАН Беларуси, ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси». – Минск, 2018. – 25 с.
10. Лысак, В. В. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям и контроль самостоятельной работы студентов / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова. – Минск : БГУ, 2002. – 100 с.
11. Влияние микробного удобрения «Биотилия» на микробиом городских почв и жизненное состояние каштана конского в условиях засоления / Г. В. Сафронова [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / Нац. акад. навук Беларусі [и др.]. – Минск, 2021. – Т. 13. – С. 359–379.

References

1. Dorokhova M. F., Kosheleva N. E., Terskaya E. V. Ecological state of urban soils subject to anthropogenic salinization and pollution (the North-Western District of Moscow as a study case). *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya* [Theoretical and applied ecology], 2015, no. 4, pp. 16–34 (in Russian).
2. Ha-Tran D. M., Nguyen T., Hung S. H., Huang E., Huang C. C. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 22, no. 6, art. 3154. <https://doi.org/10.3390/ijms22063154>
3. Verma H., Kumar D., Kumar V., Kumari M., Singh S. K., Sharma V. K., Droby S., Santoyo G., White J. F., Kumar A. The potential application of endophytes in management of stress from drought and salinity in crop plants. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, 8, art. 1729. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081729>
4. Naumovich N. I., Aleshchenkova Z. M., Anan'eva I. N., Safronova G. 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).
5. Omirbekova A. A. *Study of hydrocarbon-oxidizing microorganisms of the rhizosphere and rhizoplane of plants*. Ph. D. diss. Almaty, 2015. 128 p. (in Russian).
6. Maniatis T., Fritsch E. E., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Moscow, Mir Publ., 1984. 479 p. (in Russian).
7. Oaikhena E. E., Makaije D. B., Denwe S. D., Namadi M. M., Haroun A. A. Bioremediation potentials of heavy metal tolerant bacteria isolated from petroleum refinery effluent. *American Journal of Environmental Protection*, 2016, vol. 5, no. 2, pp. 29–34. <https://doi.org/10.3390/ijms22063154>
8. Meynell G. G., Meynel E. *Experimental microbiology*. Moscow, Mir Publ., 1967. 320 p. (in Russian).
9. Nagorny R. K. *Technologies of production and application of microbial preparation "Teamine" for disposal of tertiary amines in absorption solutions*. Ph. D. diss. Minsk, 2018. 25 p. (in Russian).
10. Lysak V. V., Zheldakova R. A. *Microbiology: manual for laboratory classes and control of students' independent work*. Minsk, Belarusian State University, 2002. 100 p. (in Russian).
11. Safronova G. V., Anan'eva I. N., Aleshchenkova Z. M., Naumovich N. I., Yakovlev A. P., Nikolaichuk A. M., Vashkevich, M. N. Effect of microbial fertilizer "Biotilia" on urban soil microbiome and the vitality of horse chestnut exposed to salinization. *Mikrobynye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sbornik nauchnykh trudov. Tom 13* [Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects: collection of scientific works. Vol. 13]. Minsk, 2021, pp. 359–379 (in Russian).

Информация об авторах

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

Алещенко 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: ananjeva@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 – 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: ananjeva@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