ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-4-2403
https://elibrary.ru/EDMFLC

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Перспективы использования микробных препаратов для снижения окислительного стресса сельскохозяйственных растений

И. С. Милентьева[1,*], Н. В. Фотина[1], М. Ю. Жарко[2], Л. А. Проскурякова[1]

[1] *Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия*

[2] *Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, Россия*

Поступила в редакцию: 06.10.2022
Принята после рецензирования: 27.10.2022
Принята к публикации: 08.11.2022

**И. С. Милентьева: irazumnikova@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-3536-562X*
Н. В. Фотина: https://orcid.org/0000-0002-7655-0258
Л. А. Проскурякова: https://orcid.org/0000-0002-9583-9161

© И. С. Милентьева, Н. В. Фотина, М. Ю. Жарко, Л. А. Проскурякова, 2022

Аннотация.
В условиях антропогенной нагрузки растения подвергаются абиотическим и биотическим стрессам, вторичным эффектом которых является усиление окислительного стресса. Это приводит к серьезным изменениям в метаболизме клеток, а также к угнетению роста и развития растений. Экологически безопасным методом защиты растений от окислительного стресса является применение микроорганизмов. Цель работы – исследование антиоксидантной активности штаммов аборигенной микрофлоры угольных отвалов для дальнейшей борьбы с окислительным стрессом растений в сельском хозяйстве.
Объектами исследования являлись микроорганизмы, выделенные из почв техногенно нарушенных территорий. Выделение чистых культур бактерий осуществляли с помощью посева глубинным способом на мясопептонный агар. Исследовали культурально-морфологические и биохимические свойства клеточной стенки. Антиоксидантную активность и количество индол-3-уксусной кислоты определяли на спектрофотометре с помощью реактива ABTS и реагента Сальковского соответственно. Идентификацию выделенных микроорганизмов осуществляли на Vitek 2 Compact. Анализ биосовместимости штаммов проводили капельным способом, прирост биомассы – с помощью спектрофотометра.
В ходе исследования выделили 10 штаммов микроорганизмов с антиоксидантной активностью в пределах от 67,21 ± 3,08 до 91,05 ± 4,17 %. Количество индол-3-уксусной кислоты варьировалось от 8,91 ± 0,32 до 15,24 ± 0,69 мг/мл. При идентификации выбранных микроорганизмов выявлены штаммы бактерий *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas putida* и *Bacillus megaterium*. Наибольшую антиоксидантную активность, количество синтезируемой индол-3-уксусной кислоты и накопленной биомассы демонстрировал консорциум *P. putida* и *E. aerogenes* в соотношении 2:1 (94,53 ± 4,28 %; 15,23 ± 0,56 мг/мл; оптическая плотность 0,51 ± 0,02). При внесении 2 % глицина от объема питательной среды антиоксидантная активность увеличилась, по сравнению с контролем, на 2,34 %. Добавление 0,5 % L-триптофана повышало количество индол-3-уксусной кислоты на 3,12 мг/мл, а антиоксидантную активность на 2,88 %. Была доказана антиоксидантная активность выделенных штаммов аборигенной микрофлоры. Наиболее перспективен консорциум *P. putida* и *E. aerogenes* в соотношении 2:1. Для обоснования способности разрабатываемого биопрепарата снижать окислительный стресс у растений в дальнейшем планируется исследовать его влияние на рост и развитие растений.

Ключевые слова. Антиоксидантная активность, индол-3-уксусная кислота, микроорганизмы, микробный консорциум, нарушенные почвы

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Разработка подходов к фиторемедиации посттехногенных ландшафтов с использованием стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPB) и “омиксных” технологий», дополнительное соглашение № 075-03-2021-189/4 от 30.09.2021 (внутренний номер 075-ГЗ/Х4140/679/4).

Для цитирования: Перспективы использования микробных препаратов для снижения окислительного стресса сельскохозяйственных растений / И. С. Милентьева [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2022. Т. 52. № 4. С. 750–761. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-4-2403

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-4-2403
https://elibrary.ru/EDMFLC

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Microbial Treatment and Oxidative Stress in Agricultural Plants

Irina S. Milentyeva[1,*], Natalya V. Fotina[1], Maria Yu. Zharko[2], Larisa A. Proskuryakova[1]

[1] *Kemerovo State University, Kemerovo, Russia*

[2] *All-Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russia*

Received: 06.10.2022
Revised: 27.10.2022
Accepted: 08.11.2022

**Irina S. Milentyeva: irazumnikova@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-3536-562X*
Natalya V. Fotina: https://orcid.org/0000-0002-7655-0258
Larisa A. Proskuryakova: https://orcid.org/0000-0002-9583-9161

© I.S. Milentyeva, N.V. Fotina, M.Yu. Zharko, L.A. Proskuryakova, 2022

Abstract.
Anthropogenic factors expose agricultural plants to abiotic and biotic stresses, one of which is oxidative stress. Oxidative stress changes cell metabolism, as well as inhibits plant growth and development. Microbial treatment is an environmentally safe method of oxidative stress prevention. The research objective was to study the antioxidant activity of microflora native to coal dumps in order to combat the oxidative stress in crops.
The study featured microorganisms isolated from technogenically disturbed soils. Pure bacterial cultures were isolated by deep inoculation on beef-extract agar. A set of experiments made it possible to define the cultural, morphological, and biochemical properties of cell walls. The antioxidant activity and the amount of indole-3-acetic acid were determined on a spectrophotometer using the ABTS reagent and the Salkowski reagent, respectively. The isolated microorganisms were identified on a Vitek 2 Compact device. The biocompatibility of strains was tested by dripping, while the increase in biomass was measured using a spectrophotometer.
The study revealed ten microbial strains with antioxidant activity ranging from 67.21 ± 3.08 to 91.05 ± 4.17%. The amount of indole-3-acetic acid varied from 8.91 ± 0.32 to 15.24 ± 0.69 mg/mL. The list of microorganisms included *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas putida*, and *Bacillus megaterium*. The consortium of *P. putida* and *E. aerogenes* demonstrated the best results in antioxidant activity, indole-3-acetic acid, and biomass. Its ratio was 2:1 (94.53 ± 4.28%; 15.23 ± 0.56 mg/mL), while the optical density was 0.51 ± 0.02. Extra 2% glycine increased the antioxidant activity by 2.34%, compared to the control. Extra 0.5% L-tryptophan increased the amount of indole-3-acetic acid by 3.12 mg/mL and the antioxidant activity by 2.88%.
The research proved the antioxidant activity of strains isolated from microflora native to coal dumps. The consortium of *P. putida* and *E. aerogenes* (2:1) demonstrated the best results. Further research will define its ability to reduce oxidative stress in plants.

Keywords. Antioxidant activity, indole-3-acetic acid, microorganisms, microbial consortium, disturbed soils

Funding. The research was part of the state task of “Developing approaches to phytoremediation of post-technological landscapes using plant growth-stimulating rhizobacteria and omics technologies”, agreement No. 075-03-2021-189/4 dated 30.09.2021 (internal number 075-GZ/X4140/679/4).

For citation: Milentyeva IS, Fotina NV, Zharko MYu, Proskuryakova LA. Microbial Treatment and Oxidative Stress in Agricultural Plants. Food Processing: Techniques and Technology. 2022;52(4):750–761. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-4-2403

Введение

Согласно данным Департамента ООН по экономическим и социальным вопросам к 2050 г. население планеты увеличится до 9,7 млрд человек [1]. Снабжение продовольствием может стать серьезной проблемой в ближайшие годы. Это связано не только с ростом населения, но и с уменьшением площади сельскохозяйственных угодий и деградацией имеющихся земель в результате индустриализации [2, 3]. Для удовлетворения постоянно растущего спроса

на продукты питания необходимо обеспечить устойчивость и продуктивность сельского хозяйства [4, 5].

Абиотические и биотические стрессы снижают рост, урожайность и качество сельскохозяйственных культур, что ежегодно приводит к экономическим потерям [6, 7]. Абиотический стресс у растений вызывают различные факторы: засуха, засоление, экстремальные температуры и загрязняющие вещества (например, тяжелые металлы или пестициды) [8]. Многие из данных факторов способствуют проявлению окислительного стресса. Такое состояние у растений характеризуется повышенным содержанием в клетках активных форм кислорода [9].

Окислительный стресс оказывает негативное влияние на развитие растений. Если содержание активных форм кислорода превышает уровень, который клетка может нейтрализовать, то нарушается окислительно-восстановительный гомеостаз. Это приводит к неконтролируемому окислению липидов, нуклеиновых кислот и белков, вызывая серьезные метаболические изменения в клетках [10, 11]. Активные формы кислорода влияют на метаболизм и рост растений такими способами, как замена кофактора фермента, ингибирование антиоксидантных ферментов и нарушение клеточного окислительно-восстановительного баланса [12]. В клетках растений существует система поглощения свободных радикалов для защиты от окислительного повреждения.

Большинство активных форм кислорода способно повреждать клетки. Однако некоторые из них могут быть полезны на определенных стадиях клеточного развития: деление и запрограммированная гибель клеток [12]. Также активные формы кислорода могут служить сигнатурными молекулами, необходимыми для контроля экспрессии генов. В связи с этим для нормального роста и развития растительные клетки должны использовать механизмы для контроля и балансировки продукции активных форм кислорода. Механизмы должны быть обусловлены не только антиоксидантными ферментами (супероксиддисмутаза, пероксидаза и глутатионредуктаза), но и неферментативными антиоксидантами (например, глутатионом и проантоцианидином) [13, 14].

Усилению окислительного стресса способствует засоление. Высокое содержание солей в почве может вызывать перекисное окисление мембранных липидов за счет активации фермента липоксигеназы, который является важным фактором ингибирования роста растений [15].

Также окислительный стресс вызывает высокая концентрация тяжелых металлов в почве. Различные формы мышьяка способны напрямую генерировать активные формы кислорода, особенно при окислительно-восстановительных трансформациях. Кроме того, мышьяк способен снижать активность ключевых антиоксидантных ферментов, связываясь с ними через тиоловые группы [16]. В литературных источниках описана способность кадмия к индукционному образованию активных кислородных радикалов, к которым относят супероксид, гидроксильные радикалы и перекись водорода [17, 18].

Для защиты растений от окислительного стресса применяют обработку различными химическими веществами. R. Khademi Astaneh с соавторами использовал нитропусид натрия в качестве источника экзогенного азота у чеснока *Allium sativum* L. Исследование показало, что нитропусид способен защищать клетки от окислительного повреждения за счет активизации антиоксидантных ферментов [15]. M. Rizwan и соавторы исследовали влияние наночастиц цинка и железа на рост пшеницы в условиях окислительного стресса, вызванного кадмием. Согласно полученным данным наночастицы (как кадмия, так и железа) способствовали снижению окислительного стресса [19]. В работе C. Kaya и др. в качестве источника экзогенного азота использовался мелатонин – гормон с антиоксидантной активностью. Исследования показали, что мелатонин снижает содержание перекиси водорода и малонового диальдегида в растениях, подвергшихся воздействию кадмия, не менее чем на 30 %. Однако полностью устранить окислительный стресс не удалось [20].

Несмотря на успешное применение химических веществ в сельскохозяйственной деятельности, использование описанных методов связано с экологическими рисками. Распространение наночастиц в окружающей среде может представлять потенциальную опасность для здоровья населения. Данных о безопасности использования таких материалов мало, поэтому необходимо проведение дополнительных исследований в данной области [21]. Не только наночастицы, но и другие химические вещества представляют собой экологическую угрозу. Существуют данные о том, что использование химических веществ в сельском хозяйстве способно вызывать вторичное загрязнение почв, что способствует развитию стресса у растений [22–24].

Более экологичным методом снижения окислительного стресса у растений является применение микроорганизмов. В литературе описаны случаи успешного применения микроорганизмов для снижения окислительного стресса. Например, некоторые штаммы *Rhizobia* стимулируют неферментативные антиоксиданты в ткани *Paullinia pinnata*. Исследования показали, что инокуляция ризобактериями повышала уровень глутатиона, проантоцианидина,

флаваноидов и аскорбиновой кислоты. Окислительный стресс в исследовании вызван дефицитом азота и избыточным содержанием никеля в почве [9]. В работе J. Chen и соавторов описан положительный опыт применения арбускулярной микоризы, которая регулировала антиоксидантную активность в листьях и корнях *Robinia pseudoacacia*, выращенных в условиях окислительного стресса, обусловленного засолением [25].

Перспективность использования микроорганизмов в сельском хозяйстве обусловлена их способностью к синтезу фитогормонов [11]. Данные вещества не только регулируют рост и развитие растений, но и активизируют их антиоксидантную систему защиты [26, 27]. Например, индол-3-уксусная кислота способна изменять экспрессию чувствительных к стрессу генов, что приводит к увеличению антиоксидантного потенциала за счет синтеза каталазы, супероксиддисмутазы и пероксидазы [28]. Индол-3-уксусная кислота – перспективный агент для снижения окислительного стресса. Однако ее невозможно включить в удобрения из-за низкой стабильности и быстрого разложения [29]. Поэтому актуальна разработка препаратов на основе микроорганизмов-продуцентов индол-3-уксусной кислоты, которые будут синтезировать данное вещество непосредственно на обрабатываемой территории.

Целью работы являлось изучение антиоксидантных свойств штаммов микроорганизмов, выделенных с территории антропогенного загрязнения для создания биопрепарата, уменьшающего окислительный стресс сельскохозяйственных растений.

Рисунок 1. Снимок со спутника на GOOGL MAPS Таежного поля ОАО «Угольная компания «Кузбассразрезуголь «Талдинский угольный разрез»

Figure 1. Satellite image of the Taiga field developed by Kuzbassrazrezugol Coal Company, Talda Coal Mine

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлись микроорганизмы, выделенные из образцов почв, отобранных на территории Таежного поля ОАО «УК «Кузбассразрезуголь «Талдинский угольный разрез» (рис. 1).

Отбор образцов техногенных почв осуществляли в осенний период в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-2017. Выделение микроорганизмов производили на мясопептонном бульоне. Культивирование проводили в течение 48 ч при 30 °С. Для выделения чистых культур осуществляли посев культуральной жидкости глубинным способом на мясопептонный агар. Питательную среду стерилизовали при температуре 130 °С и давлении 2 атм в течение 1,5 ч. Посевы культивировали в термостате ПЭ-5300ВИ («ЮНИТЭК», Россия) в течение 18 ч при 30 °С. Затем единичные колонии пересевали на среду аналогичного состава методом истощающего штриха.

Для изучения культуральных признаков производили посев суспензии выделенных микроорганизмов с низкой концентрацией на мясопептонный агар глубинным способом, а затем культивировали 18 ч при 30 °С.

Биохимические свойства клеточной стенки микроорганизмов определяли методом Грамма. Морфологические признаки исследовали микроскопированием.

Антиоксидантную активность определяли по методике A. Parsa и S. A. Salout [30]. В качестве питательной среды использовали мясопептонный бульон. Культивирование проводили в течение 48 ч при 30 °С. Полученную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 10 000 об/мин. Супернатант смешивали с реактивом ABTS в соотношении 1:15. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 754 нм. Раствором сравнения служил реактив ABTS («СигмаТек», Россия) со стерильной средой. Антиоксидантную активность рассчитывали по формуле (1):

$$\text{АОА} = \frac{A_{\text{ABTS}} - A_{\text{исл}}}{A_{\text{ABTS}}} \times 100 \qquad (1)$$

где АОА – антиоксидантная активность, %; A_{ABTS} – оптическая плотность реактива ABTS; $A_{\text{исл}}$ – оптическая плотность исследуемого раствора.

Количество индол-3-уксусной кислоты, синтезируемой микроорганизмами, определяли по методике L. G. Sarmiento-Lopez и др. [31]. В 1,5 мл среды мясопептонного бульона с 0,1 % L-триптофаном вносили 5 % бактериального консорциума. Термостатировали в течение 48 ч, а затем центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 5 мин. 1 мл супернатанта смешивали с 1 мл реагента Сальковского (0,1 г $FeCl_3$, растворенный в 100 мл 50 % H_2SO_4) и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин до окрашивания раствора в розовый цвет. Оптическую плотность полученного раствора

измеряли на спектрофотометре при 535 нм. Количество индол-3-уксусной кислоты определяли по калибровочному графику ее стандартного раствора в пределах от 1 до 40 мг/мл.

Идентификацию микроорганизмов проводили с использованием автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact с использованием карт ID-GN (грамотрицательные микроорганизмы) и ID-GP (грамположительные микроорганизмы). Культуры выращивали на колумбийском агаре с кровью в течение 48 ч при 30 °С, и затем готовили суспензию штаммов с плотностью по МакФарланду в пределах 2,70–3,30 [32].

Биосовместимость штаммов осуществляли по методу, описанному Г. С. Волковой и др. [33]. Чистые культуры выделенных микроорганизмов высаживали на среду мясопептонного бульона и культивировали 24 ч при 30 °С. Затем часть суспензии центрифугировали при 10 000 об/мин 15 мин. В чашки Петри с застывшей средой мясопептонного агара вносили 1 каплю супернатанта и дожидались полного ее впитывания. Потом каплю исследуемого штамма наносили с небольшим отступом от края первой капли таким образом, чтобы она зашла на каплю с супернатантом. Посев культивировали в течение 24 ч при 30 °С. Если в месте пересечения наблюдали рост культур, то делали вывод о том, что метаболиты первой культуры не подавляют рост исследуемого штамма. Контролем служила область на среде, где исследуемая культура не соприкасалась с супернатантом [33].

Определение антиоксидантной активности и количества синтезируемой индол-3-уксусной кислоты консорциумом определяли по вышеописанным методам.

Для определения прироста биомассы использовали методику Р. Г. Геворгиза и др. [34]. Чистые культуры высаживали на мясопептонный бульон и культивировали в течение 48 ч при 30 °С. Все чистые культуры добавляли в определенных пропорциях. После культивирования определяли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 554 нм.

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП «Инструментальные методы анализа в области прикладной биотехнологии» на базе КемГУ.

Результаты и их обсуждение

Из образцов почв выделили 10 чистых культур микроорганизмов. Культуральные и морфологические признаки представлены в таблице 1.

Рост исследуемых микроорганизмов на чашках Петри представлен на рисунке 2.

По результатам морфологического исследования выявлено, что наибольшее количество выделенных микроорганизмов являются грамотрицательными (60 %). Бациллы составили 60 %, кокки – 30 %, диплококки – 10 %, спорообразующие бактерии – 70 %. Подвижных и неподвижных микроорганизмов равное количество.

Отбор выделенных штаммов в состав консорциума осуществляли в соответствии с антиоксидантной активностью. Результаты исследования антиоксидантной активности выделенных штаммов представлены таблице 2.

Для дальнейших исследований отобраны образцы № 2–6 и 8–10. Антиоксидантная активность данных штаммов превышала 70 %. Помимо антиоксидантной активности в защите растений от окислительного стресса участвуют фитогормоны. Например, индол-3-уксусная кислота – гормон класса ауксинов, обладающих высокими антиоксидантными свойствами [26]. Исследование способности аборигенных микроорганизмов к синтезу индол-3-уксусной кислоты представлено в таблице 3.

Согласно полученным данным наибольшее количество индол-3-уксусной кислоты синтезировали штаммы № 2, 3, 6 и 8. Данные микроорганизмы отобраны для идентификации. Физиолого-биохимические особенности микроорганизмов представлены в таблице 4.

Полученные результаты подтверждаются литературными данными. Z. Wu и соавторы в своем исследовании выяснили, что бактерия *Klebsiella oxytoca* обладает высокими антиоксидантными свойствами [35]. A. S. Pavlova с соавторами доказала, что данный микроорганизм синтезирует индол-3-уксусную кислоту и способен увеличивать рост растений [36]. Штамм *Enterobacter* в исследовании Z. Saeed и др. способствовал защите растения от окислительного стресса за счет увеличения количества антиоксидантных ферментов [37]. В исследовании B.-X. Zhang с соавторами вышеупомянутый микроорганизм, выделенный из эндофитов кукурузы в Китае, синтезировал индол-3-уксусную кислоту, концентрация которой в питательной среде составила 0,2 мг/мл [38]. S. Alipour Kafi и соавторы выделили штамм *Pseudomonas putida* из ризосферной почвы. Их исследование показало, что добавление данного микроорганизма в почву увеличивает выход антиоксидантных ферментов, а также способствует лучшему нарастанию биомассы растений [39]. J. H. J. Leveau и S. E. Lindow выяснили, что из 4,5 мМ L-триптофона *P. putida* синтезируется 0,05 мМ индол-3-уксусной кислоты [40]. *Bacillus megaterium* в работе F. Pei и др. выделен из почв с виноградников Китая. Данный микроорганизм синтезирует экзополисахариды, обладающие высокими антиоксидантными свойствами [41]. В исследовании B. Ali и др. *B. megaterium*, выделенный из ризосферы растений, синтезировал 0,003 мг/мл индол-3-уксусной кислоты в среде L-бульона с добавлением 1 мг/мл L-триптофана [42]. Более

Таблица 1. Культуральные и морфологические признаки микроорганизмов

Table 1. Cultural and morphological characteristics of microorganisms

№ аборигенного микроорганизма	Признаки	
	Культуральные	Морфологические
1	Белые, матовые, приподнятые, округлые с ровными краями колонии с диаметром 3 мм	Короткие бациллы размером в среднем 0,5×0,3 мкм, грамотрицательные, спорообразующие, подвижные
2	Колонии светло-бежевого цвета, глянцевые, выпуклые, округлой формы с ровными краями, в среднем диаметр составляет 2,5 мм	Бациллы размером в среднем 1,4×0,7 мкм, грамотрицательные, спорообразующие, неподвижные
3	Колонии белесого цвета, масляные, приподнятые, округлые с ровными краями, диаметр в среднем составляет 1 мм	Короткие бациллы с закругленными краями размером в среднем 2,0×0,7 мкм, грамотрицательные, спорообразующие, подвижные
4	Белесые, матовые, выпуклые, округлые с ровными краями колонии с диаметром 1 мм	Кокки диаметром в среднем 0,6 мкм, грамположительные, спорообразующие, неподвижные
5	Колонии белесого цвета, масляные, округлой формы с ровными краями, приподнятые, диаметр составляет в среднем 3 мм	Кокки диаметром в среднем 0,6 мкм, грамотрицательные, неспорообразующие, неподвижные
6	Колонии белого цвета, глянцевые, выпуклые, округлой формы с неровными краями, в среднем диаметр составляет 1,5 мм	Бациллы размером в среднем 3,0×0,8 мкм, грамотрицательные, неспорообразующие, подвижные
7	Желтые, масляные колонии округлой формы с ровными краями, приподнятые, диаметр равен 2 мм	Диплококки диаметром в среднем 0,5 мкм, грамотрицательные, спорообразующие, неподвижные
8	Колонии прозрачные, матовые, выпуклые, округлой формы с неровными краями, диаметр равен 2 мм	Бациллы с закругленными концами размером в среднем 3,5×0,5 мкм, грамположительные, спорообразующие, подвижные
9	Колонии белого цвета, матовые, округлой формы с ровными краями, приподнятые, диаметр составляет в среднем 3 мм	Кокки диаметром в среднем 0,6 мкм, грамположительные, неспорообразующие, неподвижные
10	Желтые, глянцевые колонии округлой формы с ровными краями, выпуклые, диаметр равен 1,5 мм	Бациллы размером в среднем 1,0×0,4 мкм, грамположительные, спорообразующие, подвижные

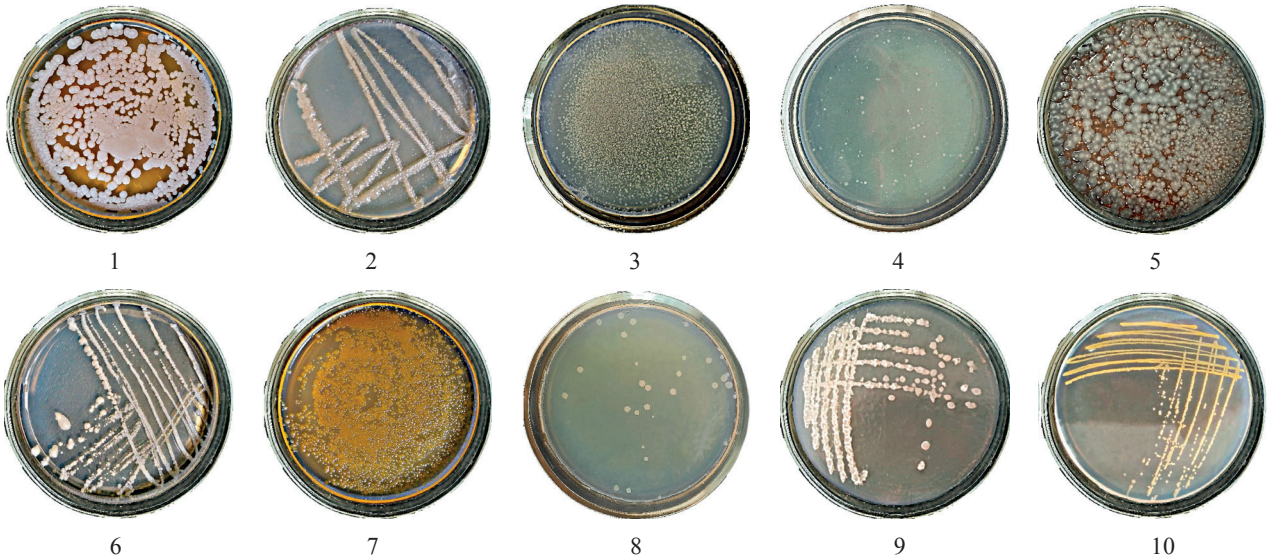

Рисунок 2. Рост исследуемых микроорганизмов в чашке Петри на среде МПА, где 1–10 – номера исследуемых штаммов

Figure 2. Microorganisms in a beef-extract agar medium: 1–10 are the strain numbers

Таблица 2. Антиоксидантная активность выделенных аборигенных микроорганизмов

Table 2. Antioxidant activity of isolated native microorganisms

№ аборигенного микроорганизма	Антиоксидантная активность, %
1	67,21 ± 3,08
2	87,23 ± 4,21
3	89,15 ± 4,10
4	71,56 ± 3,39
5	76,20 ± 3,20
6	91,05 ± 4,17
7	68,29 ± 3,12
8	83,37 ± 3,98
9	71,84 ± 3,46
10	86,36 ± 4,05

Таблица 3. Синтез индол-3-уксусной кислоты выделенными микроорганизмами

Table 3. Synthesis of indole-3-acetic acid by isolated microorganisms

№ аборигенного микроорганизма	Количество синтезируемой индол-3-уксусной кислоты, мг/мл питательной среды
2	15,24 ± 0,69
3	13,08 ± 0,53
4	9,37 ± 0,34
5	9,82 ± 0,38
6	12,61 ± 0,41
8	11,58 ± 0,44
9	9,23 ± 0,41
10	8,91 ± 0,32

Таблица 4. Физиолого-биохимические признаки микроорганизмов

Table 4. Physiological and biochemical profile of microorganisms

Субстрат	*K. oxytoca*	*E. aerogenes*	*P. putida*	*B. megaterium*	Субстрат	*K. oxytoca*	*E. aerogenes*	*P. putida*	*B. megaterium*
Ala-Phe-Pro-arylamidase	–	–	–	+	L-malate assimilation	+	–	+	+
H_2S	–	–	–	–	D-glucose	+	+	+	+
Beta-glucosidase	+	+	–	+	D-mannose	+	+	–	–
L-proline arylamidase	–	–	+	–	Tyrosine arylamidase	–	–	+	+
Saccharose/sucrose	–	+	–	–	Citrate (sodium)	+	+	+	–
L-Lactate alkalinisation	+	+	+	–	Beta-N-acetyl-galactosaminidase	–	+	–	+
Glycine arylamidase	+	–	–	–	L-histidine assimilation	+	–	+	+
O/129 resistance comp. vibrio)	+	+	+	+	Ellman	–	–	–	+
Adonitol	+	+	–	+	D-Cellobiose	+	+	–	–
Beta-N-acetyl-glucosaminidase	–	+	–	–	Gamma-glutamyl-transferase	+	–	+	+
D-maltose	+	+	–	–	Beta-xylosidase	+	+	–	–
Lipase	–	–	–	+	Urease	+	–	–	–
D-tagatose	+	+	–	+	Malonate	+	+	–	–
Alpha-glucosidase	–	–	–	+	D-trehalose	+	+	–	+
Ornithine decarboxylase	–	+	–	–	Coumarate	–	–	+	–
Glu-Gly-Arg-arylamidase	–	–	–	+	L-lactate assimilation	+	–	+	+
L-pyrrolydonyl arylamidase	+	–	–	+	Beta-galactosidase	+	+	–	+
Glutamyl arylamidase pNA	–	–	–	–	Fermentation/ glucose	+	–	–	–
D-mannitol	+	+	–	+	Phosphatase	+	–	–	+
Palatinose	+	+	–	+	D-sorbitol	+	+	–	–
Lysine decarboxylase	+	–	–	–	5-keto-D-gluconate	+	–	–	+
Succinate alkalinisation	+	–	+	+	Beta-alanine arylamidase pNA	–	–	+	–
Alpha-galactosidase	+	+	–	+	Beta-glucoronidase	–	–	–	–
L-Arabitol	–	+	–	+					

высокий выход индол-3-уксусной кислоты может быть связан с тем, что исследуемые штаммы выделены с техногенно нарушенных территорий в Кемеровской области.

Для создания биопрепарата изучали биосовместимость идентифицированных микроорганизмов. Результаты представлены в таблице 5.

Согласно результатам исследования штамм *K. oxytoca* подавляет рост *P. putida* и *B. megaterium*, а его рост подавляют метаболиты *Enterobacter aerogenes*. На рост *P. putida* положительно влияют все исследуемые микроорганизмы, но он подавляет рост *K. oxytoca*. Метаболиты, синтезируемые *E. aerogenes*, подавляют рост только *B. megaterium*. Штамм *B. megaterium* негативно влияет на рост *K. oxytoca*. Можно сделать вывод о том, что биосовместимыми являются *P. putida* с *E. aerogenes* и *B. megaterium*. В исследовании составлено шесть вариантов консорциумов, представленных на рисунке 3.

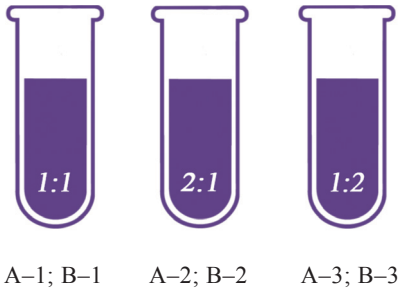

Рисунок 3. Варианты консорциумов: А – консорциум *Pseudomonas putida* с *Enterobacter aerogenes*; В – консорциум *Pseudomonas putida* с *Bacillus megaterium*; 1 – соотношение 1:1, 2 – соотношение 2:1, 3 – соотношение 1:2

Figure 3. Consortia: A – *Pseudomonas putida* + *Enterobacter aerogenes*; C – *Pseudomonas putida* + *Bacillus megaterium*; 1 – 1:1, 2 – 2:1, 3 – 1:2

Для всех исследуемых консорциумов определяли прирост биомассы и антиоксидантную активность. Результаты исследования представлены в таблице 6.

Из таблицы 6 видно, что наибольшей антиоксидантной активностью обладает консорциум А–2, содержащий *P. putida* и *E. aerogenes* в соотношении 2:1. Для создания биопрепарата необходимо подобрать среду с наибольшим выходом биомассы и антиоксидантной активности. По литературным данным для увеличения синтеза веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, в питательную среду добавляют глицин [43]. Для сравнения готовили питательную среду мясопептонного бульона без глицина и с его добавлением в количестве 1, 2 и 5 %. Результаты исследования нарастания биомассы и антиоксидантной активности биопрепарата представлены в таблице 7.

Наиболее оптимальной по соотношению антиоксидантной активности и нарастанию биомассы является среда мясопептонный бульон + 2 % глицина (далее среда А). Предшественником индол-3-уксусной кислоты является L-триптофан, поэтому добавление его в питательную среду способствует увеличению количества синтезируемого фитогормона [29]. Для подтверждения гипотезы готовили питательную среду А с добавлением 0,1, 0,2 и 0,5 % L-триптофана.

Таблица 5. Результаты определения биосовместимости штаммов

Table 5. Microbial biocompatibility

Микроорганизм	*Klebsiella oxytoca*	*Enterobacter aerogenes*	*Pseudomonas putida*	*Bacillus megaterium*
Klebsiella oxytoca		+	–	–
Enterobacter aerogenes	–		+	+
Pseudomonas putida	+	+		+
Bacillus megaterium	–	–	+	

Таблица 6. Результаты исследования сконструированных консорциумов

Table 6. Properties of the new consortia

Варианты консорциумов	Антиоксидантная активность, %	Количество синтезируемой индол-3-уксусной кислоты, мг/мл питательной среды	Прирост биомассы, оптическая плотность
А–1	88,34 ± 4,12	14,90 ± 0,64	0,49 ± 0,02
А–2	94,52 ± 4,28	15,23 ± 0,56	0,51 ± 0,02
А–3	81,76 ± 3,86	12,54 ± 0,71	0,42 ± 0,01
В–1	89,58 ± 4,05	14,08 ± 0,56	0,38 ± 0,01
В–2	92,81 ± 4,49	16,71 ± 0,63	0,46 ± 0,02
В–3	87,66 ± 3,97	11,39 ± 0,38	0,50 ± 0,02

Таблица 7. Результаты исследования биопрепарата

Table 7. Consortium of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter aerogenes*

Варианты консорциумов	Антиоксидантная активность, %	Прирост биомассы, оптическая плотность
Мясопептонный бульон	94,47 ± 4,53	0,50 ± 0,02
Мясопептонный бульон + 1 % глицина	95,35 ± 4,20	0,56 ± 0,03
Мясопептонный бульон + 2 % глицина	96,81 ± 4,35	0,54 ± 0,02
Мясопептонный бульон + 5 % глицина	92,23 ± 4,04	0,49 ± 0,02

Таблица 8. Результаты исследования биопрепарата

Table 8. Consortium of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter aerogenes*

Варианты консорциумов	Антиоксидантная активность, %	Количество синтезируемой индол-3-уксусной кислоты, мг/мл питательной среды	Нарастание биомассы, оптическая плотность
Мясопептонный бульон	94,30 ± 4,08	15,13 ± 0,56	0,50 ± 0,02
Среда А + 0,1 % L-триптофана	96,05 ± 4,56	16,02 ± 1,02	0,56 ± 0,03
Среда А + 0,2 % L-триптофана	94,63 ± 4,63	16,84 ± 0,75	0,49 ± 0,01
Среда А + 0,5 % L-триптофана	97,18 ± 4,67	18,01 ± 0,91	0,63 ± 0,02

Для сравнения использовали среду мясопептонного бульона. Результаты исследования нарастания биомассы, антиоксидантной активности и количества синтезируемой индол-3-уксусной кислоты биопрепаратом представлены в таблице 8.

Таким образом, оптимальный состав среды для биопрепарата: 3 г пептона, 3,3 г мясного экстракта, 1,5 г натрия хлорнокислого, 3,1 г глицина, 1,6 г L-триптофана и 300 мл дистиллированной воды.

Выводы

Из почв техногенно нарушенных территорий выделили 10 штаммов микроорганизмов. На основании результатов исследования антиоксидантной активности отобрано 8 перспективных микроорганизмов. У образцов № 6 антиоксидантная активность равна 91,05 %, № 2 и 3 превышает 85 %, № 8 – 83,36 %, № 4 и 9 превышает 70 %.

Анализ количества синтезируемой индол-3-уксусной кислоты показал, что перспективными штаммами для составления консорциума являются микроорганизмы № 2, 3, 6 и 8. Наибольшее количество индол-3-уксусной кислоты синтезировал № 2 (15,24 мг/мл питательной среды).

В соответствии с данными, полученными на автоматическом микробиологическом анализаторе, выявили, что № 2 является *Klebsiella oxytoca*, № 3 – *Enterobacter aerogenes*, № 6 – *Pseudomonas putida*, № 8 – *Bacillus megaterium*. Несмотря на то что *K. oxytoca* обладает достаточно высокими характеристиками, данный штамм не совместим с другими. Биосовместимыми оказались *P. putida* с *E. aerogenes* и с *B. megaterium*. Варианты исследуемых консорциумов следующие: А – *P. putida* с *E. aerogenes* и В – *P. putida* с *B. megaterium*. Соотношение микроорганизмов в выбранных консорциумах: 1 – 1:1, 2 – 2:1, 3 – 1:2 соответственно.

Наибольшей антиоксидантной активностью обладал консорциум А–2 (94,52 %), количеством синтезируемой индол-3-уксусной кислоты – В–2 (16,71 мг/мл питательной среды), нарастанием биомассы – А–2 (0,51). Таким образом, для защиты сельскохозяйственных культур от окислительного стресса и лучшей выживаемости выбрали консорциум А–2, несмотря на меньшую способность к синтезу индол-3-уксусной кислоты, чем В–2. Однако А–2 характеризуется более высокой антиоксидантной активностью и приростом биомассы.

Для увеличения антиоксидантных свойств в мясопептонный бульон добавили глицин в 3 вариантах: 1, 2 и 5 % от объема питательной среды. Наибольшая антиоксидантная активность выявлена на среде с добавление 2 % глицина (96,81 ± 4,35), что выше на 2,34 % контрольного образца (мясопептонный бульон без добавления глицина). Прирост биомассы составил 0,54 ± 0,02. Таким образом, для создания биопрепарата в среду мясопептонного бульона следует вносить 2 % глицина (среда А).

Чтобы увеличить содержание индол-3-уксусной кислоты в среду А добавляли L-триптофон в количестве 0,1, 0,2 и 0,5 %. По результатам исследования в среде А + 0,5 % L-триптофона биопрепарат синтезирует в 1,2 раза больше индол-3-уксусной кислоты по сравнению с контролем (мясопептонный бульон).

Можно сделать вывод о том, что консорциум *P. putida* с *E. aerogenes* в соотношении 2:1 обладает большой антиоксидантной активностью,

а также высоким содержанием идол-3-уксусной кислоты в культуральной жидкости. Добавление в мясопептонный бульон 2 % глицина и 0,5 % L-триптофона увеличивает антиоксидантную активность на 2,88 %, индол-3-уксусную кислоту – на 3,12 мг/мл питательной среды по сравнению с мясопептонным бульоном. Для создания биопрепарата оптимально культивирование консорциума в среде мясопептонный бульон + 2 % глицина + 0,5 % L-триптофана.

В дальнейшем планируется исследовать влияние разработанного биопрепарата на рост и развитие растений. Данные исследования необходимы для установления способности препарата снижать окислительный стресс у растений и влиять на всхожесть и урожайность сельскохозяйственных культур.

Критерии авторства

Авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в данной публикации.

Contribution

The authors were equally involved in writing the manuscript and bear equal responsibility for any possible plagiarism.

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Fatemi H, Esmaiel Pour B, Rizwan M. Isolation and characterization of lead (Pb) resistant microbes and their combined use with silicon nanoparticles improved the growth, photosynthesis and antioxidant capacity of coriander (*Coriandrum sativum* L.) under Pb stress. Environmental Pollution. 2020;266. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114982

2. Rada AO, Kuznetsov AD. Digital inventory of agricultural land plots in the Kemerovo Region. Foods and Raw Materials. 2022;10(2):206–215. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2022-2-529

3. Milentyeva IS, Le VM, Kozlova OV, Velichkovich NS, Fedorova AM, Loseva AI, *et al.* Secondary metabolites in *in vitro* cultures of Siberian medicinal plants: Content, antioxidant properties, and antimicrobial characteristics. Foods and Raw Materials. 2021;9(1):153–163. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-1-153-163

4. Gu D, Andreev K, Dupre ME. Major trends in population growth around the world. China CDC Weekly. 2021;3(28): 604–613. https://doi.org/10.46234/ccdcw2021.160

5. Kumaraswamy RV, Kumari S, Choudhary RC, Pal A, Raliya R, Biswas P, *et al.* Engineered chitosan based nanomaterials: Bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth. International Journal of Biological Macromolecules. 2018;113:494–506. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.130

6. Nizamutdinov TI, Suleymanov AR, Morgun EN, Dinkelaker NV, Abakumov EV. Ecotoxicological analysis of fallow soils at the yamal experimental agricultural station. Food Processing: Techniques and Technology. 2022;52(2):350–360. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2369

7. Fotina NV, Emelianenko VP, Vorob'eva EE, Burova NV, Ostapova EV. Contemporary biological methods of mine reclamation in the Kemerovo Region – Kuzbass. Food Processing: Techniques and Technology. 2021;51(4):869–882. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-4-869-882

8. Liu W-C, Song R-F, Zheng S-Q, Li T-T, Zhang B-L, Gao X, *et al.* Coordination of plant growth and abiotic stress responses by tryptophan synthase β subunit 1 through modulation of tryptophan and ABA homeostasis in *Arabidopsis*. Molecular Plant. 2022;15(6):973–990. https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.04.009

9. Kerchev P, van der Meer T, Sujeeth N, Verlee A, Stevens CV, Van Breusegem F, *et al.* Molecular priming as an approach to induce tolerance against abiotic and oxidative stresses in crop plants. Biotechnology Advances. 2020;40. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107503

10. Dias MC, Mariz-Ponte N, Santos C. Lead induces oxidative stress in *Pisum sativum* plants and changes the levels of phytohormones with antioxidant role. Plant Physiology and Biochemistry. 2019;137:121–129. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.02.005

11. Drozdova MYu, Pozdnyakova AV, Osintseva MA, Burova NV, Minina VI. The microorganism-plant system for remediation of soil exposed to coal mining. Foods and Raw Materials. 2021;9(2):406–418. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-2-406-418

12. Yu X, Shoaib M, Cheng X, Cui Y, Hussain S, Yan J, *et al.* Role of rhizobia in promoting non-enzymatic antioxidants to mitigate nitrogen-deficiency and nickel stresses in *Pongamia pinnata*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2022;241. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113789

13. AbdElgawad H, Zinta G, Hamed BA, Selim S, Beemster G, Hozzein WN, *et al.* Maize roots and shoots show distinct profiles of oxidative stress and antioxidant defense under heavy metal toxicity. Environmental Pollution. 2020;258. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113705

14. Ali MA, Fahad S, Haider I, Ahmed N, Ahmad S, Hussain S, *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense in plants exposed to metal/metalloid toxicity. In: Hasanuzzaman M, Fotopoulos V, Nahar K, Fujita M, editors. Reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants: Production, metabolism, signaling and defense mechanisms. John Wiley & Sons; 2019. pp. 353–370. https://doi.org/10.1002/9781119468677.ch15

15. Khademi Astaneh R, Bolandnazar S, Zaare Nahandi F. Exogenous nitric oxide protect garlic plants against oxidative stress induced by salt stress. Plant Stress. 2022;5. https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100101

16. Patel M, Parida AK. Salinity alleviates the arsenic toxicity in the facultative halophyte *Salvadora persica* L. by the modulations of physiological, biochemical, and ROS scavenging attributes. Journal of Hazardous Materials. 2021;401. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123368

17. Farooq M, Ullah A, Usman M, Siddique KHM. Application of zinc and biochar help to mitigate cadmium stress in bread wheat raised from seeds with high intrinsic zinc. Chemosphere. 2020;260. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127652

18. Haider FU, Liqun C, Coulter JA, Cheema SA, Wu J, Zhang R, *et al.* Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2021;211. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887

19. Rizwan M, Ali S, Ali B, Adrees M, Arshad M, Hussain A, *et al.* Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat. Chemosphere. 2019;214:269–277. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.120

20. Kaya C, Okant M, Ugurlar F, Alyemeni MN, Ashraf M, Ahmad P. Melatonin-mediated nitric oxide improves tolerance to cadmium toxicity by reducing oxidative stress in wheat plants. Chemosphere. 2019;225:627–638. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.026

21. Alka S, Shahir S, Ibrahim N, Ndejiko MJ, Vo D-VN, Manan FA. Arsenic removal technologies and future trends: A mini review. Journal of Cleaner Production. 2021;278. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123805

22. Zou L, Liu Y, Wang Y, Hu X. Assessment and analysis of agricultural non-point source pollution loads in China: 1978–2017. Journal of Environmental Management. 2020;263. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110400

23. Dugan I, Pereira P, Barcelo D, Telak LJ, Filipovic V, Filipovic L, *et al.* Agriculture management and seasonal impact on soil properties, water, sediment and chemicals transport in a hazelnut orchard (Croatia). Science of the Total Environment. 2022;839. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156346

24. Wang H, Yang Q, Ma H, Liang J. Chemical compositions evolution of groundwater and its pollution characterization due to agricultural activities in Yinchuan Plain, northwest China. Environmental Research. 2021;200. https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111449

25. Chen J, Zhang H, Zhang X, Tang M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis mitigates oxidative injury in black locust under salt stress through modulating antioxidant defence of the plant. Environmental and Experimental Botany. 2020;175. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104034

26. Dias MC, Mariz-Ponte N, Santos C. Lead induces oxidative stress in *Pisum sativum* plants and changes the levels of phytohormones with antioxidant role. Plant Physiology and Biochemistry. 2019;137:121–129. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.02.005

27. Singh S, Parihar P, Singh R, Singh VP, Prasad SM. Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. Frontiers in Plant Science. 2016;6. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143

28. Ahmad N, Yasin D, Bano F, Fatma T. Ameliorative effects of endogenous and exogenous indole-3-acetic acid on atrazine stressed paddy field cyanobacterial biofertilizer *Cylindrospermum stagnale*. Scientific Reports. 2022;12(1). https://doi.org/10.1038/s41598-022-15415-z

29. Šípošová K, Labancová E, Kučerová D, Kollárová K, Vivodová Z. Effects of exogenous application of indole-3-butyric acid on maize plants cultivated in the presence or absence of cadmium. Plants. 2021;10(11). https://doi.org/10.3390/plants10112503

30. Parsa A, Salout SA. Investigation of the antioxidant activity of electrosynthesized polyaniline/reduced graphene oxide nanocomposite in a binary electrolyte system on ABTS and DPPH free radicals. Journal of Electroanalytical Chemistry. 2016;760:113–118. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.11.021

31. Sarmiento-Lopez LG, López-Meyer M, Maldonado-Mendoza IE, Quiroz-Figueroa FR, Sepúlveda-Jiménez G, Rodríguez-Monroy M. Production of indole-3-acetic acid by *Bacillus circulans* E9 in a low-cost medium in a bioreactor. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2022;134(1):21–28. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.03.007

32. Voitenkova EV, Matveeva ZN, Makarova MA, Egorova SA, Zabrovskaya AV, Suzhaeva LV, *et al.* Difficulties in identification of Comamonas kerstersii strains isolated from intestinal microbiota of residents of republic of Guinea and Russian federation. Russian Journal of Infection and Immunity. 2018;8(2):163–168. https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-2-163-168

33. Volkova GS, Kuksova EV, Serba EM. Investigation of biological interstrains and growing properties of lactic acid bacteria production strains. Relevant Issues of the Dairy Industry, Cross-Industry Technologies, and Quality Management Systems. 2020;1(1):104–109. (In Russ.). https://doi.org/10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-104-109

34. Gevorgiz RG, Alisievich AV, Shmatok MG. Estimation of biomass *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl with use of optical density of culture. Ekologiya morya. 2005;70:96–106. (In Russ.). [Геворгиз Р. Г., Алисиевич А. В., Шматок М. Г. Оценка биомассы *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. по оптической плотности культуры // Экология моря. 2005. Т. 70. С. 96–106.].

35. Wu Z, Peng Y, Guo L, Li C. Root colonization of encapsulated *Klebsiella oxytoca* Rs-5 on cotton plants and its promoting growth performance under salinity stress. European Journal of Soil Biology. 2014;60:81–87. https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.11.008

36. Pavlova AS, Leontieva MR, Smirnova TA, Kolomeitseva GL, Netrusov AI, Tsavkelova EA. Colonization strategy of the endophytic plant growth-promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl. Journal of Applied Microbiology. 2017;123(1):217–232. https://doi.org/10.1111/jam.13481

37. Saeed Z, Naveed M, Imran M, Bashir MA, Sattar A, Mustafa A, *et al.* Combined use of *Enterobacter* sp. MN17 and zeolite reverts the adverse effects of cadmium on growth, physiology and antioxidant activity of *Brassica napus*. PLoS ONE. 2019;14(3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213016

38. Zhang B-X, Li P-S, Wang Y-Y, Wang J-J, Liu X-L, Wang X-Y, *et al.* Characterization and synthesis of indole-3-acetic acid in plant growth promoting *Enterobacter* sp. RSC Advances. 2021;11(50):31601–31607. https://doi.org/10.1039/d1ra05659j

39. Alipour Kafi S, Arabhosseini S, Karimi E, Koobaz P, Mohammadi A, Sadeghi A. *Pseudomonas putida* P3-57 induces cucumber (*Cucumis sativus* L.) defense responses and improves fruit quality characteristics under commercial greenhouse conditions. Scientia Horticulturae. 2021;280. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109942

40. Leveau JHJ, Lindow SE. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. Applied and Environmental Microbiology. 2005;71(5):2365–2371. https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2365-2371.2005

41. Pei F, Ma Y, Chen X, Liu H. Purification and structural characterization and antioxidant activity of levan from *Bacillus megaterium* PFY-147. International Journal of Biological Macromolecules. 2020;161:1181–1188. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.140

42. Ali B, Sabri AN, Ljung K, Hasnain S. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008;25(3):519–526. https://doi.org/10.1007/s11274-008-9918-9

43. Zhang H, Wang Z, Li Z, Wang K, Kong B, Chen Q. L-glycine and L-glutamic acid protect *Pediococcus pentosaceus* R1 against oxidative damage induced by hydrogen peroxide. Food Microbiology. 2022;101. https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103897