

УДК 579.6

DOI: 10.31040/2222-8349-2021-0-2-74-78

**ВЛИЯНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ С РАЗНЫМ НАБОРОМ СВОЙСТВ НА СОДЕРЖАНИЕ НЕФТЕПРОДУКТОВ В ПОЧВЕ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАСТЕНИЙ**

© М.Д. Бакаева, Т.Ю. Коршунова, Е.А. Столярова

Одним из приемов ускорения разложения нефти в почве является применение микробно-растительных комплексов, обладающих гибким метаболизмом и уникальными ферментными системами. Они имеют большие преимущества при выживании в неблагоприятных условиях окружающей среды, связанные с повышенной толерантностью к ксенобиотикам и способностью к их активному удалению из сферы обитания. Целью модельного лабораторного эксперимента было сравнение влияния, которое оказывают микроорганизмы, стимулирующие рост и развитие растений (*Paenibacillus* sp. ИБ-1 и *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51), и консорциум микроорганизмов-деструкторов углеводородов (*Rhodococcus* sp. ИБ НД 1.2 и *Pseudomonas nitroreducens* ИБ НД 1.1) на содержание нефтепродуктов в почве и морфометрические показатели растений овса, выращенных в ней. Посев овса без дополнительного введения в почву микроорганизмов не оказывал значимого влияния на содержание в ней углеводородов по сравнению с вариантом опыта с загрязненной почвой без растений. Интродукция консорциума на фоне посева овса снизила содержание углеводородов в 3.1–3.5 раза по сравнению с загрязненным контролем. Сопоставимые результаты были получены при применении не окисляющего углеводорода штамма *Paenibacillus* sp. ИБ-1. Вероятно, это связано с наличием у него выраженной нитрогеназной активности, приводящей к увеличению на один порядок численности азотфиксирующих микроорганизмов в обработанной им почве по сравнению с другими вариантами опыта. При этом количество окисляющих углеводороды микроорганизмов возросло во всех вариантах с нефтью на 1–2 порядка. Интродукция ростстимулирующих микроорганизмов (*Paenibacillus* sp. ИБ-1 и *P. chlororaphis* ИБ 51) приводила к увеличению длины побегов до тех же значений, что и у контрольных растений в незагрязненной почве. Что касается массы надземной и подземной части растений, выращенных в нефтесодержащей почве, то только штамм *Paenibacillus* sp. ИБ-1 способствовал достоверному увеличению этих показателей. Таким образом, внесение ростстимулирующих бактерий в нефтезагрязненную почву может быть рекомендовано как прием для ускорения фитомелиорации. Результат их применения сопоставим с использованием микроорганизмов-деструкторов углеводородов.

Ключевые слова: фитомелиорация, нефтедеструкция, ростстимулирующие свойства.

В связи с формированием экологически ориентированного мировоззрения растет потребность в технологиях, которые позволяли бы восстанавливать загрязненные территории рентабельными и безопасными способами. Фитомелиорация получает все большее признание в качестве такого способа, позволяющего реабилитировать земли после попадания в них органических поллютантов, металлов и соли. Основным сдерживающим фактором для ее применения является снижение биомассы растений в результате стресса, вызванного совокупностью неблагоприятных почвенных условий:

токсичностью загрязнителя, нарушением водно-воздушного режима. Это, в свою очередь, может привести к неприемлемо медленным темпам восстановления.

Известно, что бактерии способны вносить вклад в преодоление абиотических стрессов растений [1, 2]. В связи с этим предлагается использовать их в процессе фитомелиорации почв, контаминированных органическими поллютантами [3–5]. В качестве инокулята применяются микроорганизмы, обладающие ростстимулирующими свойствами (способность к азотфиксации, фосфатмобилизации, продукции

БАКАЕВА Маргарита Дмитриевна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: margo22@yandex.ru

КОРШУНОВА Татьяна Юрьевна – д.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: korshunovaty@mail.ru

СТОЛЯРОВА Ева Александровна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: sto15@yandex.ru

фитогормонов, АЦК-деаминазы и т.п.), а также микроорганизмы-деструкторы ксенобиотиков. Сравнение эффективности различных подходов затрудняет то, что исследователи работают с различными типами почв и загрязнителей.

Целью работы было изучение влияния ростстимулирующих микроорганизмов и микроорганизмов-деструкторов углеводов на содержание нефтепродуктов в почве и морфометрические показатели растений овса, выращенных в ней.

**Объекты и методы исследования.** В модельном лабораторном эксперименте использовали чернозем глинисто-иллювиальный (общий гумус – 4.2%; общий азот – 0.5%; подвижный фосфор – 5.6 мг/100 г почвы, рН водной вытяжки – 6.3), который помещали по 3 кг в вегетационные сосуды объемом 5 л и увлажняли до 60% от полной влагоемкости. В почву вносили товарную нефть Туймазинского месторождения (легкая – плотность 0.83 г/см<sup>3</sup>, малосернистая – содержание серы – 2.0%), в количестве 3 или 6% (масс.).

На третьи сутки сажали предварительно замоченные в водопроводной воде семена овса посевного (*Avena sativa* L.) в количестве 30 штук на сосуд, после чего почву поливали суспензией какого-либо штамма микроорганизмов (каждая с титром  $1 \cdot 10^8$  колониеобразующих единиц в 1 мл (КОЕ/мл)) в объеме 10 мл/кг и тщательно перемешивали. Контрольные варианты опыта готовили с чистой и загрязненной почвой без инокуляции микроорганизмами (с посевом и без посева растений). Каждый вариант закладывали в трех повторностях.

В работе использовали штаммы микроорганизмов со следующими свойствами. Штамм *Paenibacillus* sp. ИБ-1 обладал нитрогеназной активностью, способностью к синтезу индолилуксусной кислоты, цитокининоподобных веществ и экзополисахаридов, антагонистической активностью в отношении фитопатогенных грибов [6]. Штамм *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51 продуцировал индолилуксусную кислоту и цитокининоподобные вещества, подавлял рост фитопатогенных грибов [7]. Штаммы *Rhodococcus* sp. ИБ НД 1.2 и *Pseudomonas nitroreducens* ИБ НД 1.1 представляли собой стабильный консорциум с микростатической активностью и способностью к деструкции углеводов (далее консорциум) [8].

Сосуды выдерживали при комнатной температуре (22–26°C) в условиях естественной освещенности на протяжении 42 суток, осуществляя регулярный полив почвы. Перед началом испытания и через каждые 3 недели определяли численность микроорганизмов некоторых эколого-трофических групп путем высева разведенной почвенной суспензии на агаризованные питательные среды Эшби (азотфиксирующие микроорганизмы) и Раймонда (углеводородокисляющие микроорганизмы) [9, 10]. Содержание нефтепродуктов в почве устанавливали гравиметрически, согласно ПНД Ф 16.1.41–04 [11]. На 21 сутки измеряли высоту побегов, в конце опыта на 42 сутки растения извлекали вместе с почвенным монолитом, отмывали корневую систему и оценивали воздушно-сухую массу надземной части и корней.

**Результаты и их обсуждение.** Способность микроорганизмов выживать в загрязненной почве подтверждалась наличием к концу эксперимента в микробиологических посевах колоний с культурально-морфологическими признаками, характерными для внесенных бактерий.

Анализ содержания нефтепродуктов в рекультивируемой почве показал, что все использованные бактериальные штаммы оказывали существенное влияние на этот показатель (табл. 1).

Если посев овса без дополнительного введения в почву микроорганизмов за 42 суток эксперимента не оказывал статистически значимого влияния на содержание в ней углеводов по сравнению с вариантом опыта с загрязненной почвой без растений, то использование консорциума на фоне посева овса снизило содержание углеводов в 3.1–3.5 раза по сравнению с загрязненным контролем. Менее выраженный результат наблюдался при обработке штаммом *P. chlororaphis* ИБ 51, тогда как применение не окисляющего углеводороды штамма *Paenibacillus* sp. ИБ-1 по своей эффективности приближалось к введению нефтеокисляющего консорциума. Успешное использование штамма *Paenibacillus* sp. ИБ-1 можно связать с наличием у него значительной нитрогеназной активности, что косвенно подтверждается увеличением к концу эксперимента на один порядок численности азотфиксирующих микроорганизмов в обработанной им почве по сравнению с другими вариантами опыта (табл. 2).

Т а б л и ц а 1

Содержание нефтепродуктов (%) в рекультивируемой почве

Вариант опыта, добавка к почве	Сроки отбора проб, сутки	
	21	42
овес	0.0031 ± 0.0007	0.0030 ± 0.0008
нефть 3%	2.81 ± 0.12	2.22 ± 0.11
нефть 6%	5.44 ± 0.24	5.12 ± 0.31
овес + нефть 3%	2.86 ± 0.18	2.02 ± 0.14
овес + нефть 6%	5.33 ± 0.35	4.94 ± 0.29
овес + нефть 3% + <i>Paenibacillus</i> sp. ИБ-1	1.15 ± 0.07	0.73 ± 0.07
овес + нефть 6% + <i>Paenibacillus</i> sp. ИБ-1	2.62 ± 0.17	1.55 ± 0.10
овес + нефть 3% + <i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	1.20 ± 0.11	0.81 ± 0.07
овес + нефть 6% + <i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	2.95 ± 0.18	1.78 ± 0.12
овес + нефть 3% + консорциум	1.07 ± 0.09	0.72 ± 0.05
овес + нефть 6% + консорциум	2.42 ± 0.14	1.46 ± 0.13

Т а б л и ц а 2

Численность фиксирующих атмосферный азот микроорганизмов, КОЕ/г

Вариант опыта, добавка к почве	Сроки отбора проб, сутки	
	21	42
овес	$(2.2 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(1.0 \pm 0.1) \cdot 10^5$
нефть 3%	$(5.8 \pm 0.3) \cdot 10^5$	$(5.6 \pm 0.3) \cdot 10^5$
нефть 6%	$(3.2 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(5.1 \pm 0.1) \cdot 10^5$
овес + нефть 3%	$(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^6$	$(5.4 \pm 0.4) \cdot 10^5$
овес + нефть 6%	$(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^6$	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^5$
овес + нефть 3% + <i>Paenibacillus</i> sp. ИБ-1	$(3.1 \pm 0.4) \cdot 10^8$	$(5.5 \pm 0.4) \cdot 10^7$
овес + нефть 6% + <i>Paenibacillus</i> sp. ИБ-1	$(2.6 \pm 0.3) \cdot 10^8$	$(3.8 \pm 0.2) \cdot 10^7$
овес + нефть 3% + <i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	$(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^7$
овес + нефть 6% + <i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	$(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^6$
овес + нефть 3% + консорциум	$(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^7$
овес + нефть 6% + консорциум	$(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^6$

Т а б л и ц а 3

Численность окисляющих углеводороды микроорганизмов, КОЕ/г

Вариант опыта, добавка к почве	Сроки отбора проб, сутки	
	21	42
овес	$(9.0 \pm 0.4) \cdot 10^3$	$(2.9 \pm 0.1) \cdot 10^4$
нефть 3%	$(9.0 \pm 0.5) \cdot 10^4$	$(6.2 \pm 0.3) \cdot 10^4$
нефть 6%	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^5$
овес + нефть 3%	$(7.5 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$(7.4 \pm 0.2) \cdot 10^4$
овес + нефть 6%	$(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(4.0 \pm 0.3) \cdot 10^5$
овес + нефть 3% + <i>Paenibacillus</i> sp. ИБ-1	$(4.6 \pm 0.5) \cdot 10^7$	$(3.3 \pm 0.5) \cdot 10^7$
овес + нефть 6% + <i>Paenibacillus</i> sp. ИБ-1	$(8.7 \pm 0.4) \cdot 10^6$	$(4.8 \pm 0.6) \cdot 10^7$
овес + нефть 3% + <i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	$(2.9 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(2.0 \pm 0.3) \cdot 10^6$
овес + нефть 6% + <i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	$(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(4.8 \pm 0.1) \cdot 10^6$
овес + нефть 3% + консорциум	$(3.6 \pm 0.4) \cdot 10^7$	$(1.8 \pm 0.3) \cdot 10^7$
овес + нефть 6% + консорциум	$(3.7 \pm 0.3) \cdot 10^7$	$(4.3 \pm 0.4) \cdot 10^7$

Средние массовые и размерные показатели растений овса

Вариант опыта, добавка к почве	Длина проростков, см (21 сутки)	Масса, г (42 сутки)	
		корня	надземной части
овес	20.1 ± 1.2	0.34 ± 0.03	0.81 ± 0.03
овес + нефть 3%	14.4 ± 0.7	0.76 ± 0.02	0.73 ± 0.02
овес + нефть 6%	16.1 ± 0.8	0.66 ± 0.04	0.86 ± 0.04
овес + нефть 3% + <i>Paenibacillus</i> sp. ИБ-1	20.8 ± 0.5	0.87 ± 0.07	1.46 ± 0.05
овес + нефть 6% + <i>Paenibacillus</i> sp. ИБ-1	19.5 ± 0.8	0.85 ± 0.06	1.35 ± 0.07
овес + нефть 3% + <i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	19.3 ± 0.6	0.71 ± 0.07	0.81 ± 0.03
овес + нефть 6% + <i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	19.7 ± 0.6	0.60 ± 0.05	0.75 ± 0.05
овес + нефть 3% + консорциум	19.2 ± 0.9	0.72 ± 0.04	0.77 ± 0.04
овес + нефть 6% + консорциум	18.9 ± 0.4	0.67 ± 0.03	0.80 ± 0.04

Мониторинг численности окисляющих углеводов микроорганизмов показал увеличение со временем данного показателя во всех вариантах опыта с нефтью (табл. 3).

В середине эксперимента на 21-е сутки была измерена длина побегов овса. Отмечено, что нефть угнетающе влияла на рост надземной части растений. Добавление микроорганизмов, обладающих ростстимулирующей активностью (*Paenibacillus* sp. ИБ-1 и *P. chlororaphis* ИБ 51), способствовало достижению показателей, сопоставимых с незагрязненным контролем (табл. 4).

Однако определение массы надземной и подземной части растений после окончания опыта на 42 сутки показало, что лишь штамм *Paenibacillus* sp. ИБ-1 способствовал увеличению данных показателей. Первоначальная стимуляция роста овса бактериями *P. chlororaphis* ИБ 51 сменилась его угнетением, высушиванием отдельных листьев из-за неблагоприятных почвенных условий. Консорциум микроорганизмов слабо стимулировал рост овса, эффект от его применения заключался, в основном, в ускорении деструкции углеводов в почве.

Таким образом, внесение ростстимулирующих бактерий в нефтезагрязненную почву в процессе ее фитомелиорации может быть рекомендовано как прием для ускорения деструкции углеводов, увеличения микробиологической активности почвы, стимуляции роста растений-мелиорантов. Результат их применения может быть сопоставим с использованием микроорганизмов-деструкторов углеводов. Более стойкий положительный эффект, по-видимому, оказывают бактерии, способные не только к синтезу фитогормонов, но и улучшающие плодородие почв (например, за счет фиксации азота).

### Литература

1. Sarma R.K., Saikia R. Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21 // Plant Soil. 2014. V. 377, № 1–2. P. 111–126.
2. Wang Q., Jiang F., Dodd I.C., Belimov A.A. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase growth and photosynthesis of pea plants under salt stress by limiting Na<sup>+</sup> accumulation // Functional Plant Biology. 2016. V. 43, № 2. P. 161–172.
3. Степанова А.Ю., Соловьева А.И., Гладков Е.А. Влияние нефти как неблагоприятного фактора на растения и фиторемедиация нефтезагрязненных территорий // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2017. Т. 13, № 3. С. 51–57.
4. Kuppusamy S., Thavamani P., Venkateswarlu K., Lee Y.B., Naidu R., Megharaj M. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions // Chemosphere. 2017. V. 168. P. 944–968.
5. Fatima K., Imran A., Amin I., Khan Q.M., Afzal M. Successful phytoremediation of crude-oil contaminated soil at an oil exploration and production company by plants-bacterial synergism // International Journal of Phytoremediation. 2018. V. 20, № 7. P. 675–681.
6. Бакаева М.Д., Четвериков С.П., Коршунова Т.Ю., Логинов О.Н. Новый штамм бактерий *Paenibacillus* sp. ИБ-1 – продуцент экзополисахарида и биологически активных веществ с фитогормональной и антигрибной активностью // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53, № 2. С. 204–212.
7. Свешникова Е.В. Новые бактерии рода *Pseudomonas* – антагонисты фитопатогенов и перспективы их использования в сельскохозяйственной практике: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Уфа, 2003. 24 с.
8. Бакаева М.Д., Логинов О.Н., Смолова О.С. Влияние микроорганизмов – деструкторов углеводов на токсичность загрязненного нефтью чернозема // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т. 15, № 3 (5). С. 1563–1566.

9. Дзержинская И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов. Астрахань: Изд-во АГТУ, 2008. 348 с.

10. Raymond R. L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Development Industrial Microbiology. 1961. V. 2. P. 23–32.

11. ПНД Ф 16.1.41–04. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах почв гравиметрическим методом. 2004. Портал нормативных документов. URL: <http://www.OpenGost.ru>

### References

1. Sarma R.K., Saikia R. Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. *Plant Soil*, 2014, vol. 377, no. 1–2, pp. 111–126.

2. Wang Q., Jiang F., Dodd I.C., Belimov A.A. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase growth and photosynthesis of pea plants under salt stress by limiting Na<sup>+</sup> accumulation. *Functional Plant Biology*, 2016, vol. 43, no. 2, pp. 161–172.

3. Stepanova A.Yu., Solovyeva A.I., Gladkov E.A. Influence of oil as an unfavorable factor on plants and phytoremediation of oil contaminated territories. Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology, 2017, vol. 13, no. 3, pp. 51–57.

4. Kuppusamy S., Thavamani P., Venkateswarlu K., Lee Y.B., Naidu R., Megharaj M. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging

trends and future directions. *Chemosphere*, 2017, vol. 168, pp. 944–968.

5. Fatima K., Imran A., Amin I., Khan Q.M., Afzal M. Successful phytoremediation of crude-oil contaminated soil at an oil exploration and production company by plants-bacterial synergism. *International Journal of Phytoremediation*, 2018, vol. 20, no. 7, pp. 675–681.

6. Bakaeva M.D., Chetverikov S.P., Korshunova T.Yu., Loginov O.N. The new bacterial strain *Paenibacillus* sp. IB-1: A producer of exopolysaccharide and biologically active substances with phytohormonal and antifungal activities. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, vol. 5, no. 2, pp. 201–208.

7. Sveshnikova E.V. New bacteria of the genus *Pseudomonas* as phytopatogene antagonists and prospects for their use in agricultural practice. PhD Thesis in Biology. Ufa, 2003. 24 p.

8. Bakaeva M.D., Loginov O.N., Smolova O.S. Influence of microorganisms – destructors of hydrocarbons on toxicity of the oil polluted chernozem. *Vestnik Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*, 2013, vol. 15, no. 3 (5), pp. 1563–1566.

9. Dzerzhinskaya I.S. Growth media for isolation and cultivation of microorganisms. Astrakhan, AGTU, 2008. 348 p.

10. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Development Industrial Microbiology*, 1961, vol. 2, pp. 23–32.

11. ПНД Ф 16.1.41–04. Methods for measuring mass concentration of oil products in soil samples using gravimetric analysis. 2004. Portal normativnykh dokumentov. Available at: <http://www.OpenGost.ru>

## INFLUENCE OF MICROORGANISMS WITH DIFFERENT SETS OF PROPERTIES ON THE CONTENT OF OIL PRODUCTS IN SOIL AND MORPHOMETRIC INDICATORS OF PLANTS

© M.D. Bakaeva, T.Yu. Korshunova, E.A. Stolyarova

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences,  
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

One of the methods to accelerate oil degradation in soil is the use of microbial-plant complexes with metabolic flexibility and unique enzyme systems. They have great advantages in surviving under adverse environmental conditions associated with increased tolerance to xenobiotics and the ability to actively remove them from the habitat. The aim of the model laboratory experiment was to compare the effect of microorganisms that stimulate plant growth and development (*Paenibacillus* sp. IB-1 and *Pseudomonas chlororaphis* IB 51) and a consortium of microorganisms that destroy hydrocarbons (*Rhodococcus* sp. IB ND 1.2 and *Pseudomonas nitroreducens* IB ND 1.1) on the content of oil products in soil and morphometric parameters of oat plants grown in it. Sowing oats without additional introduction of microorganisms into soil did not have any significant effect on the content of hydrocarbons compared to the experimental variant with plantless contaminated soil. The introduction of the consortium against the background of sowing oats reduced the content of hydrocarbons by 3.1–3.5 times compared to the contaminated control. Comparable results were obtained with the use of a non-oxidizing hydrocarbon strain *Paenibacillus* sp. IB-1. This is probably due to the presence of a pronounced nitrogenase activity leading to an increase by one order of magnitude in the number of nitrogen-fixing microorganisms in the treated soil compared to other experimental variants. At the same time, the number of microorganisms oxidizing hydrocarbons increased by 1–2 orders of magnitude in all variants with oil. The introduction of growth-stimulating microorganisms (*Paenibacillus* sp. IB-1 and *P. chlororaphis* IB 51) resulted in an increase in the shoot length by the same values as in control plants in uncontaminated soil. As for the mass of the aboveground and underground parts of plants grown in oily soil, only *Paenibacillus* sp. IB-1 contributed to a significant increase in these indicators. Thus, the introduction of growth-stimulating bacteria into oil-contaminated soil can be recommended as a method to accelerate phytomelioration. The result of their application is comparable to the use of microorganisms that destroy hydrocarbons.

Key words: phytomelioration, oil destruction, growth-stimulating properties.