

Применение продуцирующих ауксины бактерий при фиторемедиации загрязнённой нефтью почвы

© 2020. М. Д. Бакаева, к. б. н., с. н. с., Е. В. Кузина, к. б. н., с. н. с.,
Г. Ф. Рафикова, к. б. н., с. н. с., Л. Б. Высоцкая, д. б. н., в. н. с.,
Т. Н. Архипова, к. б. н., с. н. с., З. А. Ахтямова, аспирант,
С. П. Четвериков, д. б. н., в. н. с., О. Н. Логинов, д. б. н., профессор, в. н. с.,
Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН,
450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября, д. 69,
e-mail: biolab316@yandex.ru

Растительно-микробные ассоциации эффективны для рекультивации загрязнённых нефтью почв. При этом значение уровня продукции бактериями фитогормонов и влияние нефтяных углеводородов на проявление бактериями стимулирующего эффекта остаются недостаточно изученными.

Исследования проводили в условиях модельного эксперимента с растениями ячменя *Hordeum vulgare* L., выращенного на загрязнённой нефтью песчано-почвенной смеси в условиях искусственного освещения. Внесённые в почву штаммы бактерий *Pseudomonas plecoglossicida* 2,4-D, *P. hunanensis* IB C7, *P. extremaustralis* IB K2, *Enterobacter asburiae* IB UOM3 были способны к деструкции углеводородов и синтезу индолилуксусной кислоты.

Использование бактерий позволило улучшить на 10–33% выживаемость растений ячменя на фоне нефтяного загрязнения. В присутствии углеводородов проявлялась адаптивная реакция, заключающаяся в увеличении массы корневой системы. Обработка ячменя бактериями усиливала проявление данной реакции, причём, при большем загрязнении эффект был сильнее. Стимуляция роста корней внесёнными штаммами микроорганизмов сопровождалась интенсификацией разложения нефти в почве. Скорость деградации углеводородов возрастала в ряду: ячмень, бактерии, ассоциации ячменя с бактериями. В вариантах опыта с ассоциациями содержание углеводородов в почве за 21 сутки снижалось на 45,0–51,2% и 37,5–41,9% при нефтяном загрязнении 40 и 80 г/кг, соответственно.

Ключевые слова: рекультивация, нефть, бактерии, индолилуксусная кислота, ячмень, стимулирование роста растений.

Application of auxin producing bacteria in phytoremediation of oil-contaminated soil

© 2020. M. D. Bakaeva ORCID: 0000-0001-8738-4534, E. V. Kuzina ORCID: 0000-0002-6905-0108,
G. F. Rafikova ORCID: 0000-0001-7655-5588, L. B. Vysotskaya ORCID: 0000-0001-9348-9316,
T. N. Arkhipova ORCID: 0000-0002-6971-1084, Z. A. Ahtyamova ORCID: 0000-0002-3495-0501,
S. P. Chetverikov ORCID: 0000-0002-7961-1503, O. N. Loginov ORCID: 0000-0002-7875-7295,
Ufa Institute of Biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
69, Prospekt Oktyabrya, Ufa, Russia, 450054,
e-mail: biolab316@yandex.ru

Plant-microbial associations are effective for the remediation of oil-contaminated soils. At the same time, the level of production of phytohormones by bacteria and the effect of petroleum hydrocarbons on the manifestation of the stimulating effect by bacteria remain insufficiently studied.

The studies were carried out in a model experiment with plants of *Hordeum vulgare* L. grown on oil-contaminated sand-soil mixture in artificial lighting. The soil mixture was treated with 10⁵ CFU/g of bacteria *Pseudomonas plecoglossicida* 2,4-D, *P. hunanensis* IB C7, *P. extremaustralis* IB K2, *Enterobacter asburiae* IB UOM3. Bacterial strains were able to destroy hydrocarbons and synthesize indoleacetic acid.

By the end of the experiment in the variant polluted with 80 g of oil per 1 kg of soil the number of living plants fell to 67%. The addition of growth-stimulating strains of oil destructors significantly improved the survival of barley plants. The mass of the barley root system was the most sensitive to oil pollution and introduction of bacteria. In the presence of hydrocarbons, a useful adaptive reaction was manifested; it consisted in increasing the mass of the root system. Treatment of barley by bacteria increased the manifestation of this reaction. The introduced bacteria increased the growth of

roots more significantly against the background of 80 g/kg than 40 g/kg oil pollution. The revealed stimulation of root growth by microorganisms' introduction accelerated oil decomposition in the soil. Inoculation of contaminated soil with oil destructor strains together with barley plant cultivation reduced pollutant content by 45.0–51.2% and 37.5–41.9% for 21 days (at initial concentration of 40 g/kg and 80 g/kg, respectively). The rate of hydrocarbons' degradation was increased in the row: plant, bacteria, association plant + bacteria.

Keywords: remediation, oil, bacteria, indolylacetic acid, barley, plant growth promoting.

Среди разных подходов к восстановлению загрязнённых нефтью земель биоремедиация выгодно отличается своей эффективностью, стоимостью и экологической безопасностью. В рекультивационных мероприятиях могут быть задействованы штаммы микроорганизмов (МО), обладающие деструктивной способностью в отношении загрязняющих веществ, высшие растения или ассоциативные растительно-микробные комплексы [1].

Растительно-микробные ассоциации имеют преимущества при выживании в неблагоприятных условиях в силу взаимовыгодного сосуществования [2]. Положительное воздействие инокуляции растения-фитомелиоранта бактериальными штаммами выражается в увеличении зелёной массы [3], уменьшении проявления у него признаков стресса [4] и ускорении деструкции углеводов в почве [5, 6]. Некоторые исследователи связывают способность использованных для инокуляции растений штаммов бактерий к стимуляции роста растений в условиях углеводородного загрязнения с синтезом фитогормонов, как правило, индолилуксусной кислоты (ИУК) [7]. При этом вопрос о том, какое влияние оказывает присутствие нефтяных углеводов на проявление ростстимулирующего эффекта остаётся недостаточно изученным.

Целью работы было изучение влияния интродукции окисляющих углеводороды МО, продуцирующих ИУК, на рост ячменя и деструкцию нефти в загрязнённой почве.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили в условиях модельного эксперимента с растениями ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта Челябинский 99, выращенного на песчано-почвенной смеси. Для этого воздушно-сухую почву, просеянную через сито (диаметр отверстий 0,3–0,5 см), смешивали с песком в соотношении 9:1, вносили навески нефти (плотность 0,905 г/см³, содержание общей серы 1,6%) соответствующие 40 г/кг, 80 г/кг почвы и тщательно перемешивали. Песчано-почвенную смесь (далее по тексту почвенная смесь) массой 0,45 кг помещали в вегетационные сосуды и увлажняли до 80%

от полной влагоёмкости (ПВ). Для оптимизации водно-воздушного режима почвенной смеси использовали дренаж и стеклянную трубку. В подготовленные сосуды высаживали двухсуточные проростки ячменя. С целью ускорения разложения нефти почвенную смесь проливали разбавленной жидкой культурой бактерий, из такого расчёта, чтобы титр клеток составил не менее 10⁵ КОЕ/г почвы. По истечении двух недель с начала эксперимента проводилось повторное внесение жидкой культуры. На протяжении всего эксперимента поддерживали влажность почвенной смеси на уровне 70–80% от ПВ. Растения выращивали в условиях искусственного освещения (100 мкмоль/(м² · с)) с 14-часовым фотопериодом при температуре 22–26 °С в течение трёх недель. Контролем служил вариант почвенной смеси без внесения растений и МО.

Для обработки почвенной смеси использовали штаммы бактерий из коллекции МО Уфимского Института биологии УФИЦ РАН *Pseudomonas plecoglossicida* 2,4-D, *P. hunanensis* IB C7, *P. extremaustralis* IB K2, *Enterobacter asburiae* IB UOM3. Штаммы характеризовались наличием комплекса свойств, необходимых для проведения эффективной биоремедиации: способностью к деструкции углеводов и фитогормональной активностью [8]. На среде Кинг Б [9] штаммы продуцировали 0,3–11,5 мкг/мл ИУК.

Культуру для инокуляции почвенной смеси получали путём культивирования штаммов бактерий на жидкой питательной среде Кинг Б в колбах Эрленмейера на термостатируемом шейкере (160 об./мин) при температуре 28 °С в течение 72 часов.

Численность углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) в почве определяли методом высева разведений почвенной суспензии на агаризованную питательную среду Раймонда с дизельным топливом в качестве источника углерода [10]. Содержание нефтепродуктов в почве устанавливали гравиметрически по ПНД Ф 16.1.41-04. Образцы почвенной смеси для анализа отбирали на 1-е и 21-е сутки после постановки эксперимента.

У ячменя оценивали такие показатели как отношение числа не погибших к концу экс-

перимента к числу появившихся на 3 сутки из почвы растений (выживаемость), сырую массу проростков, сырую массу корней и длину листьев.

Статистическую обработку данных проводили по стандартным программам MS Excel. На рисунках и в таблицах представлены средние арифметические ± стандартные ошибки средних арифметических. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Интенсивность деградации углеводов возрастала в ряду: растение, бактерия, ассоциация растение + бактерия (табл.). Установлено, что инокуляция загрязнённой почвы штаммами-нефтедеструкторами совместно с выращиванием растений ячменя способствовала уменьшению содержания в ней поллютанта на 45,0–51,2 и 37,5–41,9% (при содержании нефти 40 и 80 г/кг соответственно). Использование тех же штаммов, но в отсутствие растения-фиторемедианта привело к снижению эффективности биорекультивации в среднем на 5,0–9,5%. При использовании только ячменя без дополнительного внесения бактерий остаточное содержание нефтепродуктов достоверно не отличалось от контроля.

В почве, загрязнённой 40 г/кг нефти, штаммы демонстрировали сопоставимую деструктивную активность как в вариантах опыта с ячменем, так и без него. При содержании нефти 80 г/кг в почве без растений наилучшие результаты были достигнуты с использованием штамма *P. plecoglossicida* 2,4-D. Однако, в присутствии ячменя эффективность применения штаммов *P. hunanensis* IB C7, *E. asburiae* IB UOM3 также достоверно возрастала.

Созданный в лабораторных условиях благоприятный водный и температурный режим способствовал существенному росту в загрязнённой почве числа аборигенных МО, способных использовать углеводороды в качестве единственного источника углерода. К окончанию эксперимента их численность возросла на 2 порядка по сравнению с исходной $(2-5) \cdot 10^5$ КОЕ/г и достигла через три недели эксперимента $(4-6) \cdot 10^7$ КОЕ/г. Интродукция углеводородокисляющих штаммов лишь немного увеличивала данный показатель. Посев растений ячменя способствовал значительному повышению численности углеводородокисляющих МО в почве ризосферы до $(2,5-3,4) \cdot 10^8$ КОЕ/г. Варианты с внесением и без внесения исследуемых штаммов отличались несущественно, в то время как скорость разложения углеводов в них не была

Таблица / Table
Биодеструкция нефти при различных вариантах рекультивации (21-е сутки эксперимента)
Biodegradation of oil in various remediation options (21 days of the experiment)

Вариант опыта The variant of the experiment	Исходное содержание нефти в почве, г/кг Initial oil content in soil, g/kg			
	40	80	40	80
	остаточные углеводороды, г/кг Residual hydrocarbons, g/kg		численность углеводородокисляющих микроорганизмов, КОЕ/г · 10 ⁷ Number of hydrocarbon-oxidizing microorganisms, CFU/g · 10 ⁷	
Контроль / Control	28,9±1,4 ^a	59,0±1,5 ^a	4±1 ^a	6±1 ^a
<i>E. asburiae</i> IB UOM3	23,3±0,9 ^{bc}	54,2±1,3 ^b	10±3 ^b	13±3 ^b
<i>P. extremaustralis</i> IB K2	24,0±0,8 ^b	54,7±1,9 ^{ab}	11±2 ^b	15±4 ^b
<i>P. plecoglossicida</i> 2,4-D	23,0±0,9 ^{bc}	47,9±1,6 ^c	14±3 ^b	14±4 ^b
<i>P. hunanensis</i> IB C7	23,3±0,9 ^{bc}	52,6±1,7 ^b	12±3 ^b	15±3 ^b
<i>H. vulgare</i>	25,2±1,2 ^{ab}	56,2±2,0 ^{ab}	28±5 ^c	26±4 ^c
<i>H. vulgare</i> + <i>E. asburiae</i> IB UOM3	20,8±1,0 ^c	48,3±1,8 ^c	32±5 ^c	28±4 ^c
<i>H. vulgare</i> + <i>P. extremaustralis</i> IB K2	22,0±1,2 ^{bc}	50,0±1,8 ^{bc}	27±4 ^c	25±3 ^c
<i>H. vulgare</i> + <i>P. plecoglossicida</i> 2,4-D	20,6±1,2 ^c	47,0±1,5 ^c	33±5 ^c	30±5 ^c
<i>H. vulgare</i> + <i>P. hunanensis</i> IB C7	19,5±1,3 ^c	46,5±1,7 ^c	31±4 ^c	34±6 ^c

Примечание: достоверно отличающиеся значения помечены разными буквами (p ≤ 0,05, t-тест).
Note: significantly different means are marked with different letters (p ≤ 0.05, t-test).

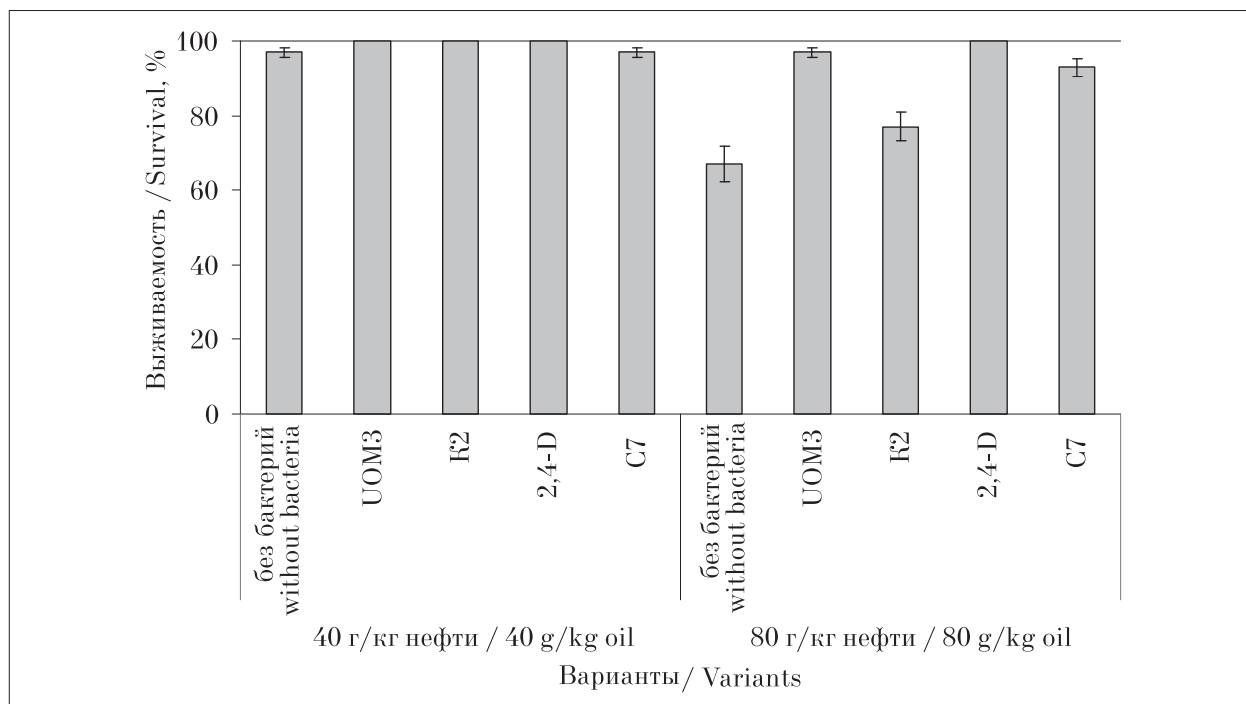


Рис. 1. Влияние интродукции бактерий на выживаемость растений ячменя при различных уровнях нефтяного загрязнения

Fig. 1. Effect of bacterial introduction on survival of barley plants at different levels of oil pollution

одинаковой. Таким образом, для биодеструкции углеводов имеет значение не только факт проявления ризосферного эффекта, но и то, с какими штаммами МО было ассоциировано растение.

По литературным данным ячмень относится к числу культур устойчивых к нефтяному загрязнению [11]. Действительно, загрязнение почвы нефтью в дозе 40 г/кг практически не вызывало гибель проростков, тогда как в варианте опыта с внесением 80 г нефти на 1 кг почвы выживаемость растений к концу эксперимента составляла лишь 67%. С другой стороны, при той же дозе загрязнителя (80 г/кг), но с добавлением ростстимулирующих штаммов-нефтедеструкторов процент выживших растений через три недели эксперимента был выше на 10–33%, т. е. в некоторых вариантах опыта не погибло ни одного растения (рис. 1). Причём, штамм *P. extremaustralis* IB K2 в меньшей степени способствовал выживанию растений ячменя на загрязнённой почве.

В ходе проведённых исследований установлено, что ингибирующему действию нефти более подвержена надземная часть ячменя. По сравнению с контрольными растениями, выращенными на незагрязнённой почве, масса побегов при концентрации нефти в почве 40 и 80 г/кг уменьшилась в 2,7 и 3,8 раза, соот-

ветственно (рис. 2). Отрицательное влияние нефти на формирование надземной части ячменя проявлялось также в замедлении скорости появления новых листьев, некротических поражениях листовых пластин. Так, к концу эксперимента (21 сутки) в вариантах с загрязнённой почвой растения успели образовать только два настоящих листа (в варианте без загрязнения – три).

В то же время, в присутствии 40 г/кг загрязнителя у растений отмечено значительное увеличение массы корня – на 30–50% по сравнению с ячменём, выращенным на незагрязнённой почве. Известно, что значительная активация роста корней по сравнению с побегом является характерной адаптивной реакцией растений на снижение доступности почвенных ресурсов [12]. Поскольку загрязнение почвы нефтью препятствует поглощению растением воды и минеральных солей [13], активация роста корней является способом преодоления существующего дефицита элементов питания. При увеличении концентрации углеводов в почве до 8% масса корней у растений уменьшалась по сравнению с почвой, не содержащей поллюганта. Таким образом, токсичное действие нефти в более высокой концентрации тормозило проявление адаптивной реакции у растений ячменя.

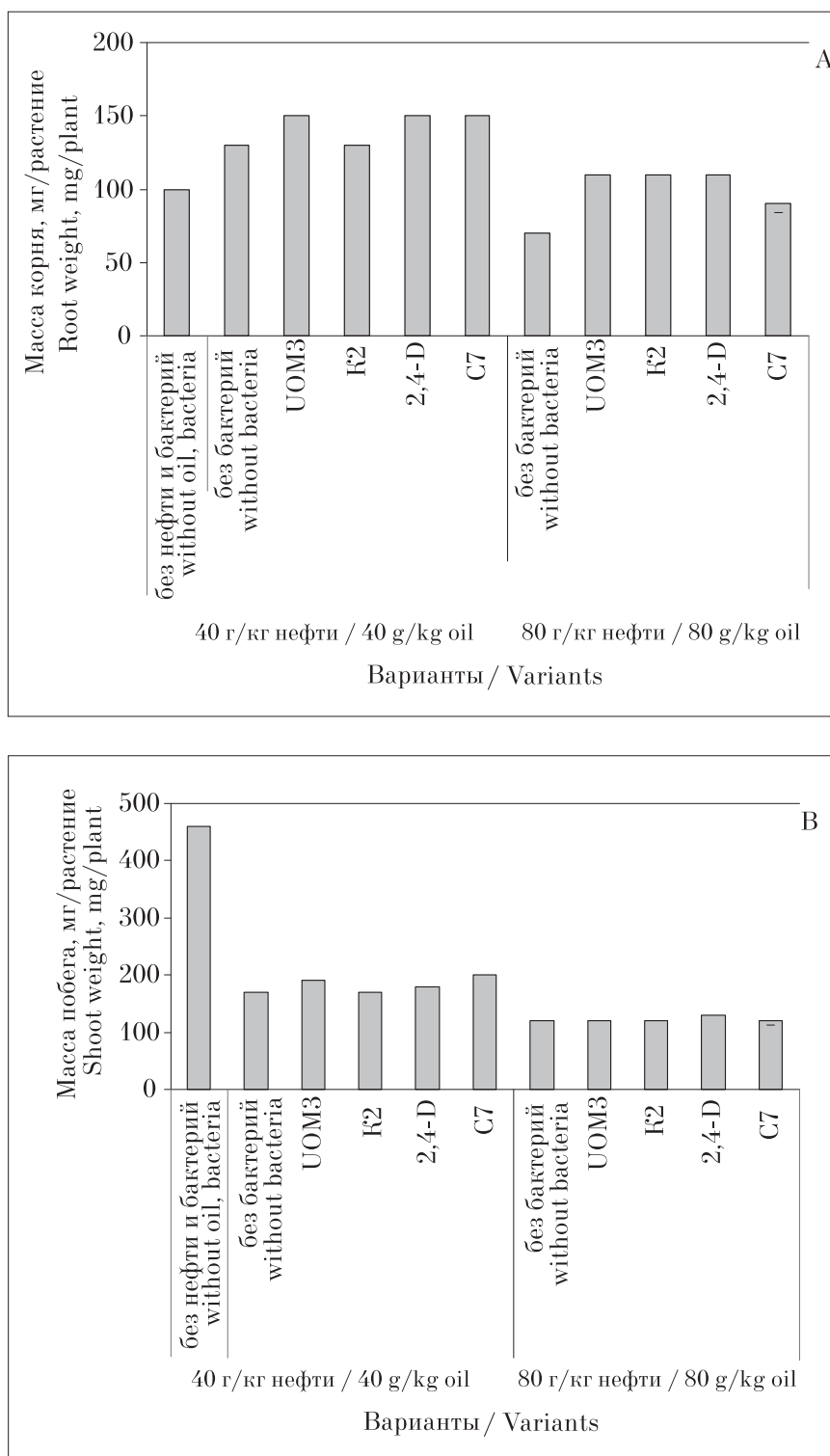


Рис. 2. Влияние нефтяного загрязнения на морфологические показатели ячменя:
 А – масса корня, В – масса побега

Fig. 2. The impact of oil pollution on morphological parameters of barley:
 A is the weight of the root, B is the weight of the shoot

Внесение бактерий в загрязнённую почву положительно влияло на морфологические показатели растений ячменя. В вариантах опыта с исходным уровнем загрязнения 40 г/кг использование штаммов *Enterobacter*

asburiae IB UOM3, *Pseudomonas hunanensis* IB C7 приводило к увеличению массы побега на 11,8–17,6%. Что касается длины листьев, достоверных отличий между контролем (только растение) и вариантами опыта (растение

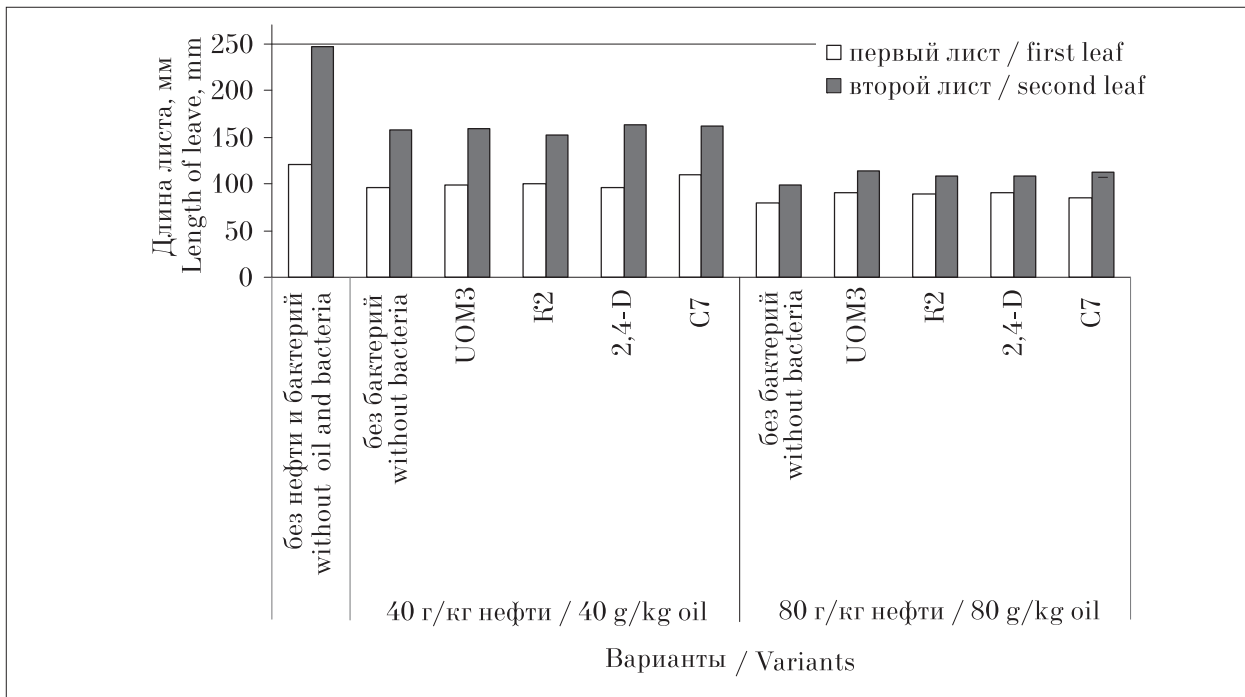


Рис. 3. Влияние нефтяного загрязнения на длину листьев ячменя
 Fig. 3. The impact of oil pollution on the length of barley leaves

+ бактерия) выявлено не было (рис. 3). При увеличении содержания углеводов до 80 г/кг почвы был замечен небольшой положительный эффект. Например, интродукция в ризосферу ячменя штамма *E. asburiae* IB UOM3 способствовала увеличению длины первого листа на 15,2%, второго – на 15,3%.

При обработке ячменя бактериями на фоне загрязнения нефтью 40 г/кг была отмечена тенденция к увеличению массы корней, однако отличия от загрязнённого варианта без внесения бактерий не были статистически достоверны при $p \leq 0,05$. Вместе с тем, с увеличением техногенной нагрузки до 80 г нефти на 1 кг почвы ростстимулирующий эффект на корни от применения бактерий становился более заметным и статистически значимым. Интродукция штаммов *E. asburiae* IB UOM3, *P. extremaustralis* IB K2, *P. plecoglossicida* 2,4-D способствовала увеличению массы корней растений в 1,5 раза по сравнению с вариантом без внесения МО. Ускорение роста корней может быть следствием воздействия экзогенных фитогормонов, синтезируемых МО [14]. Поскольку именно при загрязнении 80 г/кг отмечено достоверное положительное влияние бактериализации растений на скорость разрушения углеводов, можно сделать вывод, что стимуляция роста корней внесёнными штаммами МО способствовала ускорению рекультивации почвы.

Заключение

Таким образом, среди фиксированных в ходе эксперимента показателей наиболее чувствительной к интродукции бактерий оказалась масса корневой системы ячменя. Вносимые в почву способные к синтезу ИУК бактерии более существенно усиливали рост корней на фоне загрязнения нефтью в дозе 80 г/кг, чем в дозе 40 г/кг. Внесение под посевы ячменя штаммов *E. asburiae* IB UOM3, *P. plecoglossicida* 2,4-D, *P. hunanensis* IB C7 способствовало ускорению разложения нефти в почве на 14–23% по сравнению с растениями без интродукции бактерий.

Исследование выполнено при частичной поддержке гранта РФФИ № 18-29-05025/18, ГЗ Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А19-119021390081-1 и № АААА-А18-118022190100-9 с использованием оборудования ЦКП УФИЦ РАН «Агидель».

References

1. Domracheva L.I. Territory remediation with the help of organisms and biosystems // Theoretical and Applied Ecology. 2009. No. 4. P. 4–16 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2009-4-004-016
2. Agnello A.C., Bagard M., van Hullebusch E.D., Esposito G., Huguenot D. Comparative bioremediation of

heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation // Science of the Total Environment. 2016. V. 563–564. P. 693–703. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.061

3. Hou, J., Liu W., Wang B., Wang Q., Luo Y., Franks A.E. PGPR enhanced phytoremediation of petroleum contaminated soil and rhizosphere microbial community response // Chemosphere. 2015. V. 138. P. 592–598. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.07.025

4. Wojtera-Kwiczor J., Zukowska W., Graj W., Malecka A., Piechalak A., Ciszewska L., Chrzanowski L., Lisiecki P., Komorowicz I., Barankiewicz D., Voss I., Scheibe R., Tomaszewska B. Rhizoremediation of diesel-contaminated soil with two rapeseed varieties and petroleum degraders reveals different responses of the plant defense mechanisms // International Journal of Phytoremediation. 2014. V. 16. P. 770–789. doi: 10.1080/15226514.2013.856848

5. Tang J., Wang R., Niu X., Zhou Q. Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms // Soil & Tillage Research. 2010. V. 110. P. 87–93. doi: 10.1016/j.still.2010.06.010

6. Korshunova T.Yu., Bakaeva M.D., Loginov O.N. Multifunctional biological products-oil destructors: effect on plants and soil oil content // Ekologiya i promyshlennost' Rossii. 2018. V. 22. No. 9. P. 18–22 (in Russian). doi: 10.18412/1816-0395-2018-9-18-22

7. Cruz-Morales N.K., Rodríguez-Tovar A.V., Guerrero-Zúñiga L.A., Rodríguez-Dorantes A. Plant growth promoting characterization of soil bacteria isolated from petroleum contaminated soil // International Journal of Environmental & Agriculture Research. 2016. V. 2. No. 7. P. 15–21.

8. Bakaeva M.D., Kuzina E.V., Rafikova G.F., Chetverikova D.V., Stolarova E.V., Muchamatdyarova S.R., Kudoyarova G.R. Influence of bacteria-destructors of oil hydrocarbons on germination and growth of plants // Ekobiotech. 2019. V. 2. No. 2. P. 175–183. doi: 10.31163/2618-964X-2019-2-2-175-183

9. King E.O., Ward M.K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein // Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 1954. V. 44. P. 301–307.

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

11. Xu J.G., Johnson R.L. Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbon contents planted to barley and field pea // Canadian Journal of Soil Science. 1997. V. 77. P. 453–458. doi: 10.4141/S96-046

12. Kudoyarova G.R., Dodd I.C., Veselov D.S., Rothwell S.A., Veselov S.Y. Common and specific responses to availability of mineral nutrients and water // Journal of Experimental Botany. 2015. V. 66. P. 2133–2144. doi: 10.1093/jxb/erv017

13. Han G., Cui B.X., Zhang X.X., Li K.R. The effects of petroleum-contaminated soil on photosynthesis of *Amorpha fruticosa* seedlings // International Journal of Environmental Science and Technology. 2016. V. 13. P. 2383–2392. doi: 10.1007/s13762-016-1071-7

14. Patten C.L., Glick B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system // Applied and Environmental Microbiology. 2002. V. 68. No. 8. P. 3795–3801. doi: 10.1128/AEM.68.8.3795–3801.2002