

Бактерии-деструкторы с ростстимулирующими свойствами для использования в экологической биотехнологии

© 2024. Т. Ю. Коршунова, д. б. н., в. н. с., Е. В. Кузина, к. б. н., с. н. с.,
С. Р. Мухаматдырова, к. б. н., с. н. с., Ю. Ю. Шарипова, м. н. с.,
М. Г. Искужина, к. б. н., н. с.,

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук,
450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября, д. 69,
e-mail: korshunovaty@mail.ru

Актуальным направлением исследований в области экологической биотехнологии является поиск и изучение микроорганизмов-деструкторов, устойчивых к присутствию поллютантов, а также способных к стимуляции роста растений-ремедиантов. Из образцов почвы выделены 4 штамма углеводородокисляющих микроорганизмов, которые идентифицированы на основании их культурально-морфологических, физиолого-биохимических свойств и сравнительного анализа гена, кодирующего 16S рРНК. С помощью метода газовой хроматографии установлено, что бактерии *Acinetobacter calcoaceticus* UOM 22 и UOM 29, *A. courvalinii* UOM 35 способны в значительной степени к биодеструкции нефти (4% объём.) в жидкой среде при 24 и 8 °С (93,0–95,9 и 78,4–81,1% соответственно). Для штамма *Rhodococcus erythropolis* UOM 33 при тех же условиях эти показатели составляли 44,8 и 33,7% соответственно. Все микроорганизмы росли в присутствии ароматических углеводородов (в том числе полициклических), обладали устойчивостью к NaCl (5–7%) и ионам свинца (1,00–1,25 г/л), а также были способны к азотфиксации, растворению неорганического фосфата, синтезу индолил-3-уксусной кислоты (150–1416 нг/мл культуральной жидкости) и продукции липазы. Показано, что штаммы *A. calcoaceticus* UOM 22 и *A. courvalinii* UOM 35 увеличивали всхожесть семян ячменя на 8,6 и 10,5%, а *A. calcoaceticus* UOM 29 и *A. courvalinii* UOM 35 стимулировали рост корней этого растения на 16,3 и 18,1% соответственно. Результаты экспериментов свидетельствуют о возможности использования штаммов *A. calcoaceticus* UOM 22 и UOM 29, а также *A. courvalinii* UOM 35 для очистки нефтезагрязнённых почв, в том числе в комплексе с растениями-ремедиантами.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, бактерии-нефтедеструкторы, хлорид натрия, тяжёлые металлы, стимуляция роста растений, ячмень.

Bacteria-destructors with growth-stimulating properties for use in ecological biotechnology

© 2024. T. Yu. Korshunova ^{ORCID: 0000-0002-6186-0827*}
E. V. Kuzina ^{ORCID: 0000-0002-6905-0108*} S. R. Mukhamatdyarova ^{ORCID: 0000-0001-7641-7943*}
Yu. Yu. Sharipova ^{ORCID: 0000-0002-1794-5137*} M. G. Iskuzhina ^{ORCID: 0000-0003-0196-9596*}
Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center
of the Russian Academy of Sciences (UIB UFRC RAS),
69, Oktyabrya prospect, Ufa, Russia, 450054,
e-mail: korshunovaty@mail.ru

A topical research trend in ecological biotechnology is the search and study of microorganisms-destructor resistant to additional pollutants and growth-stimulating to remediating plants. Four strains of hydrocarbon-oxidizing microorganisms isolated from soil samples were identified on the basis of cultural-morphological, physiological-biochemical properties and a comparative analysis of the gene encoding 16S rRNA. The bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* UOM 22 and UOM 29, *A. courvalinii* UOM 35 showed a significant degree of oil biodegradation in a liquid medium at 24 and 8 °C (93.0–95.6% and 78.4–81.1%, respectively). In the same conditions these indicators were 44.8 and 33.7%, respectively for strain *Rhodococcus erythropolis* UOM 33. All microorganisms grew in the presence of aromatic hydrocarbons (including polycyclic hydrocarbons), were resistant to NaCl (5–7%) and lead ions (1.00–1.25 g/L). They were capable of nitrogen fixation and inorganic phosphate dissolution, indole-3-acetic acid synthesis (150–1416 ng/ml of culture liquid) and hydrolytic enzyme lipase production. We found that *A. calcoaceticus* UOM 22 and *A. courvalinii* UOM 35 strains increased the barley seeds germination by 8.6 and 10.5%, as well as *A. calcoaceticus* UOM 29 and *A. courvalinii* UOM 35

stimulated the barley root growth by 16.3 and 18.1% respectively. The results of the experiments indicate the possibility of using *A. calcoaceticus* UOM 22 and UOM 29, and *A. courvalinii* UOM 35 strains for cleaning oil-contaminated soils, including in combination with remediant-plants.

Keywords: oil pollution, oil degrading bacteria, sodium chloride, heavy metals, plant growth stimulation, barley.

В настоящее время и в долгосрочной перспективе углеводороды есть и будут оставаться основным источником энергии на планете. Из-за несовершенства или нарушения технологии, а также изношенности оборудования их извлечение, транспортировка и переработка приводят к широкомасштабным отрицательным последствиям для окружающей среды (ОС) [1, 2]. К их числу, помимо механического нарушения почвенного покрова и собственно нефтяного загрязнения, относится техногенное засоление почвы, вызванное попаданием в неё высокоминерализованных нефтепромысловых вод. Другими поллютантами, связанными с нефтеразливами, являются тяжёлые металлы (ТМ). Поступление дополнительных загрязнителей усугубляет неблагоприятное воздействие углеводородов на растения и почвенный биоценоз, ещё более тормозя процесс естественного самовосстановления почвы и существенно осложняя её очистку [3, 4].

Биоремедиация, основанная на способности живых объектов (бактерий и грибов) к разложению загрязнителей, считается наиболее безопасным и относительно недорогим методом ликвидации последствий нефтяного загрязнения [5, 6]. При этом современной тенденцией развития экологической биотехнологии является применение микроорганизмов (МО), которые не только разрушают ксенобиотики, но и обладают способностью к усилению роста растений-ремедиантов, что приводит к ускорению процессов очистки и восстановления почвы [2, 7].

Целью работы было выделение и идентификация штаммов бактерий-нефтедеструкторов, устойчивых к действию повышенных концентраций хлорида натрия и ТМ и изучение их способности к стимуляции роста растений ячменя.

Объекты и методы исследования

Выделение штаммов МО в чистую культуру производили из почвенных образцов с территории Республики Башкортостан методом накопительных культур [8]. Для этого 2 г почвы помещали в колбы со 100 мл жидкой минеральной среды Раймонда [9] с нефтью (1% объём.) и инкубировали 7 сут при 28 °С

и 160 об./мин на шейкере-инкубаторе ES-20/60 («Biosan», Латвия). Далее изоляты высеивали на мясо-пептонный агар (МПА) [10] и культивировали при 28 °С в течение 5 сут.

Для дальнейших исследований отбирали изоляты, наиболее активно растущие на твёрдой и жидкой среде Раймонда с нефтью в качестве единственного источника углерода. Интенсивность роста в жидкой среде (нефть 4% объём.) оценивали по изменению состояния среды и сдвигу pH, а также по численности МО на 3 и 6 сут культивирования, которую определяли методом Коха [8]. Проводили высев из разведений культуральной жидкости на твёрдую среду Раймонда, на поверхность которой наносили 100 мкл стерильной нефти, через 5 сут подсчитывали количество сформировавшихся колоний. Культурально-морфологические свойства бактерий определяли при выращивании на МПА, физиолого-биохимические – по общепринятым методикам [10]. Первичную идентификацию проводили согласно определителю Берджи [11]. Видовую принадлежность МО устанавливали с помощью секвенирования фрагмента последовательности гена 16S рРНК. Тотальную ДНК выделяли по методике, описанной в [12]. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК осуществляли с универсальными праймерами 27F и 1492R [13] на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler («Bio-Rad Laboratories», США). Очистку ПЦР-продуктов и последующую секвенирующую реакцию выполняли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) по инструкциям производителя на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 («Applied Biosystems», США). Для поиска нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, гомологичных соответствующим последовательностям исследуемых штаммов, использовали сервер EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).

Углеводородокисляющую активность штаммов при комнатной и низкой положительной температуре оценивали по степени деструкции алифатической фракции нефти с помощью метода газовой хроматографии [14]. Бактерии культивировали в жидкой среде Раймонда с нефтью (4% объём.) при 24 и 8 °С

в течении 5 и 10 сут соответственно. В качестве эталона использовали штамм-нефтедеструктор *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 [15].

Субстратную специфичность штаммов в отношении ароматических углеводородов определяли визуально (рост по штриху) без подсчёта численности МО при культивировании на твёрдой среде Раймонда при 28 °С в течении 7 сут. В качестве источника углерода использовали жидкие бензол, толуол, ксилол, фенол и в виде кристаллов нафталин, фенантрен и бифенил. Соединения добавляли на крышку чашки Петри (жидкие – по 100 мкл, сухие – по несколько кристаллов), чашку переворачивали дном вверх и обматывали парафиновой лентой для предотвращения улечуивания [16].

Устойчивость штаммов к хлориду натрия и ТМ (Zn, Co, Cd, Pb, Cu, Ni) оценивали визуально (рост по штриху) без подсчёта численности МО на МПА с NaCl или солями этих металлов ($ZnSO_4 \cdot 6H_2O$, $CoCl_2 \cdot 2H_2O$, $Cd(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$) после инкубации в течение 7 сут при 28 °С. Концентрацию NaCl варьировали в пределах 3–7%, ионов металлов 0,25–1,50 г/л.

Продукцию штаммами гидролитических ферментов устанавливали следующими методами: протеазы – по разжижению желатины, амилазы – по диаметру зоны гидролиза крахмала, липазы – по наличию непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот на среде с Твин 80 [8]. Целлюлозолитическую активность определяли по появлению зоны растворения карбоксиметилцеллюлозы [17].

Способность штаммов к азотфиксации выявляли по показателям роста по штриху без подсчёта численности МО на агаризованной среде Эшби [8], а к растворению неорганических фосфатов – на твёрдой среде Пиковской со свежесажённым ортофосфатом кальция [18] по наличию зон просветления вокруг колоний бактерий.

Содержание индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в культуральной жидкости анализировали хроматографически в системе ВЭЖХ LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором SPD-M20A («Shimadzu», Япония) так, как это было описано в [19].

Наличие у штаммов способности к стимуляции роста растений проверяли на семенах ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Челябинский 99, которые замачивали 15 мин в жидкой культуре бактерий, разбавленной до титра 10^4 КОЕ/мл. Численность МО в культуральной

жидкости для обработки семян определяли методом Коха. Проводили высев разведений трёхсуточной жидкой культуры бактерий на МПА и через 3 сут подсчитывали количество сформировавшихся на плотной среде колоний. Готовую жидкую культуру бактерий в период, предшествующий замачиванию семян, хранили в холодильнике. Непосредственно перед замачиванием семян разбавляли жидкую культуру бактерий до титра 10^4 КОЕ/мл. Контрольные семена обрабатывали водопроводной водой. Семена помещали по 20 шт. во влажные камеры и инкубировали при 24–26 °С в течение 3 сут, после чего определяли количество проросших семян (%), длину побегов и суммарную длину корней.

Эксперименты выполняли в трёхкратной повторности. Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010. В таблице 3 данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Из 24 визуально различающихся при выращивании на МПА изолятов для дальнейших исследований были отобраны два, обозначенные как UOM 29 и UOM 35, которые характеризовались наиболее интенсивным ростом на агаризованной и жидкой среде Раймонда с нефтью. Ранее авторами при тех же условиях были выделены изоляты UOM 22 и UOM 33.2 (в данном исследовании обозначен как UOM 33), у которых было проведено предварительное изучение способности к разложению нефти и устойчивости к присутствию в среде ТМ или NaCl [20]. В настоящей работе они были идентифицированы, а их свойства рассмотрены более подробно. Источники выделения, описание внешнего вида колоний, культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства изолятов приведены в таблице 1.

При росте каждого изолята в жидкой среде с нефтью наблюдалось помутнение среды, диспергирование нефти, образование хлопьев и сдвиг pH в кислую сторону с 6,54 (начало инкубации) до 5,13–5,28 на шестые сут. На третьи и шестые сут культивирования численность изолятов UOM 29, UOM 33 и UOM 35 находилась в пределах $1-2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, а UOM 22 – $3-4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Указанные результаты свидетельствуют об активном разложении нефти микроорганизмами.

Источники выделения и таксономические признаки изолятов
Isolation sources and taxonomic features of isolates

Признаки и свойства Features and properties	Изолят / Isolate			
	UOM 22	UOM 29	UOM 33	UOM 35
Источник выделения Isolation source	г. Уфа, урбанозем*	Баймакский район, пос. Тубинский	г. Уфа, урбанозем*	Гафурийский район, берег р. Усолка
Морфология колоний при росте на МПА Morphology of colonies during growth on MPA	Круглые, диаметр 6 мм, молочного цвета с ровным краем и гладкой поверхностью*	Круглые, диаметр 4 мм, кремового цвета с ровным краем и гладкой поверхностью	Круглые, выпуклые, диаметр 1 мм, тёмно-кремового цвета с волнистым краем и гладкой поверхностью плотной консистенции*	Круглые, диаметр 5 мм, кремового цвета с ровным краем и гладкой блестящей поверхностью
Морфология клеток Cell morphology	Грамотрицательные палочки, диаметром 0,8–1,5 и длиной 1,5–2,0 мкм	Грамотрицательные палочки, диаметром 0,6–1,5 и длиной 1,6–2,2 мкм	Грамположительные, на ранней стадии клетки палочковидные или кокковидные	Грамотрицательные палочки, диаметром 0,9–1,6 и длиной 1,5–2,5 мкм
Физиолого-биохимические свойства Physiological and biochemical properties	Аэробные, неспорообразующие бактерии. Оксидазоотрицательные, каталазоположительные. Крахмал, карбоксиметилцеллюлозу не гидролизуют			
	Не разжижают желатин. Растут при 4 и 37 °С. Используют цитрат, малонат, D-глюкозу, сахарозу, глутарат, L-гистидин, L-тирозин, β-аланин, L-орнитин, L-аргинин, этанол, глицерин	Не разжижают желатин. Растут при 4 и 37 °С. Используют цитрат, малонат, D-глюкозу, сахарозу, глутарат, L-гистидин, L-аспартат, L-тирозин, β-аланин, L-орнитин, L-аргинин, L-лейцин, γ-аминобутират	Не разжижают желатин. Растут при 4 и 41 °С. Используют мальтозу, D-фруктозу, сахарозу, бензойную кислоту, L-аспарагин, инозитол, маннитол, сорбитол	Разжижают желатин. Растут при 4 и 41 °С. Используют лактат, малонат, аминобутират, фенилацетат, бензоат, цитрат, глутамат, глутарат, L-гистидин, L-аргинин, L-лейцин, L-фенилаланин
Типовой штамм, % сходства, номер доступа GenBank Type strain, % similarity, GenBank accession number	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006T, 100%, OP686570	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006T, 99,94%, OP686572	<i>Rhodococcus erythropolis</i> NBRC 15567T, 99,91%, OP686571	<i>Acinetobacter courvalinii</i> ANC 3623T, 99,22%, OP686573

Примечание: * – данные по [20] / Note: * – data from [20].

Таблица 2 / Table 2

Свойства штаммов / Strain properties

Свойства / Properties		Штамм / Strain			
		<i>A. calcoaceticus</i> UOM 22	<i>A. calcoaceticus</i> UOM 29	<i>R. erythropolis</i> UOM 33	<i>A. courvalinii</i> UOM 35
Степень биодеструкции нефти, % Degree of oil biodegradation, %	24 °C	93,0*	95,6	44,8*	95,9
	8 °C	78,4	81,1	33,7	79,2
Максимальная концентрация NaCl, % Maximum concentration of NaCl, %		5*	5	7*	6
Максимальная концентрация ТМ, г/л Maximum concentration of heavy metals, g/L	Pb ²⁺	1,00*	1,25	1,25*	1,25
	Zn ²⁺	0,25*	0,25	0,25*	0,25
	Cd ²⁺	<0,25*	<0,25	0,25*	<0,25
	Co ²⁺	<0,25*	<0,25	0,50*	0,25
	Cu ²⁺	<0,25*	0,25	0,25*	<0,25
	Ni ²⁺	<0,25*	<0,25	0,25*	0,25
Продукция ИУК, нг/мл Indole-3-acetic acid production, ng/mL		1416	521	150	658

В результате сравнительного анализа максимальное сходство нуклеотидных последовательностей гена, кодирующего 16S рРНК, изолятов UOM 22 и UOM 29 наблюдалось со штаммом *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 30006T, UOM 33 – с *Rhodococcus erythropolis* NBRC 15567T, UOM 35 – с *A. courvalinii* ANC 3623T. Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank (табл. 1).

Несомненно, самым важным качеством углеводородокисляющих бактерий является их способность к деградации нефти, особенно при пониженных температурах, что позволяет удлинить рекультивационный сезон в регионах с холодным климатом. Штаммы *A. calcoaceticus* UOM 22 и UOM 29, *A. courvalinii* UOM 35 продемонстрировали значительную и приблизительно одинаковую (между собой) степень биодеструкции нефти при комнатной (93,0–95,9%) и низкой положительной температуре (78,4–81,1%) (табл. 2).

В первом случае она даже превосходила таковую у эталонного штамма-нефтедеструктора *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 (73,3% при 24 °C и 83,2% – при 8 °C). Самая низкая степень биодеструкции наблюдалась в вариантах с *R. erythropolis* UOM 33 (44,8 и 33,7% при 24 и 8 °C соответственно).

Установлен активный рост штаммов *A. calcoaceticus* UOM 22 и UOM 29, *R. erythropolis* UOM 33 в присутствии бензола, фенола, ксилола, нафталина, бифенила и фенантрена. При этом ни один из четырёх изучаемых МО не использовал толуол как источник углерода и энергии, что, вероятно, связано с высокой токсичностью последнего для этих бактерий.

При извлечении углеводородного сырья загрязнение почвы нефтью часто сопровождается разливами нефтепромысловых вод, содержащих большое количество солей, значительная доля которых приходится на хлориды [21]. Одновременное присутствие нескольких поллютантов ингибирует жизнедеятельность автохтонной углеводородокисляющей микробиоты и приводит к снижению эффективности самоочищения такой почвы. Поэтому для её биорекультивации следует использовать микроорганизмы-нефтедеструкторы, способные переносить повышенные концентрации солей. Выделенные в данной работе штаммы оказались устойчивыми к присутствию в среде NaCl в количестве 5–7% (табл. 2), что позволяет говорить о перспективах их использования для очистки нефтезагрязнённых почв, подвергшихся засолению.

Тяжёлые металлы считаются одними из наиболее широко распространённых загрязнителей ОС [22]. Среди прочего, они вызывают изменения в составе и строении клеточных структур и влияют на биосинтетические процессы у МО, а также значительно снижают биоразнообразие и биомассу микробных сообществ [23]. Поэтому подбор штаммов, устойчивых к воздействию этих веществ и их соединений, является важным подготовительным этапом при проведении биоремедиации. В настоящем исследовании бактерии демонстрировали отсутствие роста (или очень слабый рост) при наличии в среде ионов кадмия, цинка, никеля, меди и кобальта в количестве более 0,25 г/л, за исключением *R. erythropolis* UOM 33, который выдерживал присутствие

Co²⁺ в количестве 0,50 г/л [20]. Микроорганизмы проявили устойчивость к свинцу в концентрации 1,00 (все штаммы) и 1,25 г/л (кроме *A. calcoaceticus* UOM 22) (табл. 2), несмотря на то что, согласно ГОСТ 17.4.1.02-83, он (как цинк и кадмий), относится к первому классу токсичности (вещества высокоопасные).

Выделение МО гидролитических ферментов, катализирующих процессы расщепления различных классов соединений, является ценным с биотехнологической точки зрения свойством. Штамм *R. erythropolis* UOM 33 не продуцировал ферменты из тестируемого набора, штамм *A. courvalinii* UOM 35 образовывал липазу и протеазу, остальные изученные бактерии – липазу. Наличие способности к синтезу последней повышает перспективы использования штаммов *A. calcoaceticus* UOM 22 и UOM 29, а также *A. courvalinii* UOM 35 в качестве биодеструкторов, так как известно, что липазная активность МО используется для мониторинга биодegradации нефти и нефтепродуктов в ходе очистки [24], а сам фермент может служить эффективным средством для разложения углеводов [25, 26].

Азот и фосфор являются ключевыми по значимости и количественной потребности элементами в минеральном питании растений. Первый входит в состав аминокислот, из которых синтезируются белки, и играет важную роль практически во всех метаболических процессах в растительных клетках. Вторым влияет на формирование зачатков репродуктивных частей растений и ветвление корней. При этом содержащийся в почве фосфор практически недоступен растениям из-за плохой растворимости и образования комплексов с металлами. Поэтому штаммы, обладающие азотфиксирующей и фосфатмобилизирующей активностью, представляют большой практический интерес для экологической и сельскохозяйственной биотехнологии. Все выделенные МО

активно росли на среде Эшби без азота, что свидетельствует об их олигонитрофильности и растворяли неорганический фосфат (за исключением *R. erythropolis* UOM 33).

Как известно, продукция бактериями фитогормонов играет важную роль в их рост-стимулирующем влиянии на растения [27]. Ауксины являются основными регуляторами роста и развития растений, а ИУК – наиболее распространённым индольным соединением этой группы. Количество этого вещества в культуральной жидкости изучаемых МО значительно различалось (табл. 2). Самый высокий уровень накопления ИУК зафиксирован у штамма *A. calcoaceticus* UOM 22 (1416 нг/мл культуральной жидкости), а самый низкий – у *R. erythropolis* UOM 33 (150 нг/мл).

Обработка семян ячменя штаммами *A. calcoaceticus* UOM 22 и *A. courvalinii* UOM 35 приводила к достоверному повышению их всхожести на 8,6 и 10,5% (табл. 3).

Инокуляция не оказала значимого эффекта на длину побегов у проростков, но способствовала увеличению этого показателя у корней на 16,3 и 18,1% в случае использования *A. calcoaceticus* UOM 29 и *A. courvalinii* UOM 35 соответственно. Скорее всего, это объясняется действием ИУК, которая, в числе прочего, активизирует рост подземной части растений [27]. Причём, оба вышеупомянутых МО синтезируют её в среднем количестве (521 и 658 нг/мл соответственно), в то время как штаммы *R. erythropolis* UOM 33 и *A. calcoaceticus* UOM 22, характеризующиеся минимальным и максимальным уровнем продукции данного вещества, не усиливали рост корней. Вероятно, причина отсутствия ускорения корнеобразования при бактериализации в первом случае связана с недостаточностью образования ИУК, а во втором – с его избыточностью, так как высокие концентрации этого ауксина стимулируют образование этилена,

Таблица 3 / Table 3

Влияние бактериализации на всхожесть и ростовые параметры растений ячменя
Effect of bacterization on germination and growth parameters of barley plants

Штаммы / Strains	Всхожесть, % Germination, %	Длина, мм / Length, mm	
		корень (суммарно) root (total)	побег / shoot
Контроль / Control	87,3±3,9	121±6	15,5±0,6
<i>A. calcoaceticus</i> UOM 22	94,8±3,2*	129±7	15,0±0,9
<i>A. calcoaceticus</i> UOM 29	91±4	140±8*	15,8±0,8
<i>R. erythropolis</i> UOM 33	86,7±2,9	121±5	15,1±0,7
<i>A. courvalinii</i> UOM 35	96,5±3,5*	142±8*	16,1±0,7

Примечание: * – различия с контролем достоверны при $p < 0,05$.
Note: * – differences with control are significant at $p < 0,05$.

который подавляет рост растений [28]. Такое свойство бактерий как увеличение всхожести и ростовых характеристик растений (особенно их подземной части) очень важно при биоремедиации почвы, загрязнённой нефтью и ТМ, с помощью микробно-растительных ассоциаций. Развитая корневая система помогает растениям преодолеть дефицит воды и питательных элементов, который возникает при нефтяном загрязнении. Она способствует увеличению потока растительных экссудатов в ризосферу, что повышает в ней численность бактерий, в том числе углеводородокисляющих. Кроме того, высокая плотность МО в прикорневой зоне приводит к иммобилизации ТМ путём усиления их бактериального связывания в хелатные комплексы [29, 30].

Заключение

Из образцов почвы выделены и идентифицированы штаммы микроорганизмов *A. calcoaceticus* UOM 22 и UOM 29, *R. erythropolis* UOM 33, *A. courvalinii* UOM 35, которые проявляют значительную степень биодеструкции нефти при 24 и 8 °С (44,8–95,9 и 33,7–81,1% соответственно) и способны к использованию ароматических углеводородов (в том числе полициклических) в качестве источника углерода. Помимо этого, бактерии обладают набором других биотехнологически значимых свойств, таких как азотфиксация, фосфатмобилизация, устойчивость к NaCl (5–7%) и ионам свинца (1,00–1,25 г/л), продукция ИУК (150–1416 нг/мл культуральной жидкости) и липазы. Показано, что штаммы *A. calcoaceticus* UOM 22 и *A. courvalinii* UOM 35 повышают всхожесть семян ячменя, а *A. calcoaceticus* UOM 29 и *A. courvalinii* UOM 35 стимулируют рост корневой системы этого растения.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения штаммов *A. calcoaceticus* UOM 22 и UOM 29, а также *A. courvalinii* UOM 35 для ликвидации последствий углеводородного загрязнения, в том числе совместно с растениями-ремедиантами.

Исследование выполнено за счёт гранта Российской государственной академии наук № 23-24-00130, <https://rscf.ru/project/23-24-00130/>.

References

1. Fowzia A., Fakhruddin A.N.M. A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons and its

biodegradation // Int. J. Environ. Sci. Nat. Res. 2018. V. 11. No. 3. P. 63–69. doi: 10.19080/IJESNR.2018.11.555811

2. Korshunova T. Yu., Chetverikov S. P., Bakaeva M. D., Kuzina E. V., Rafikova G. F., Chetverikova D. V., Loginov O. N. Microorganisms in the elimination of oil pollution consequences (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. No. 4. P. 344–354. doi: 10.1134/S0003683819040094

3. Gao Y., Wang J., Guo S., Hu Y.-L., Li T., Mao R., Zeng D.-H. Effects of salinization and crude oil contamination on soil bacterial community structure in the Yellow River Delta region, China // Appl. Soil Ecol. 2015. V. 86. P. 165–173. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.10.011

4. Camacho-Montealegre C. M., Rodrigues E. M., Morais D. K., Tótola M. R. Prokaryotic community diversity during bioremediation of crude oil contaminated oilfield soil: effects of hydrocarbon concentration and salinity // Braz. J. Microbiol. 2021. V. 52. No. 2. P. 787–800. doi: 10.1007/s42770-021-00476-5

5. Turkovskaya O., Muratova A. Plant-bacterial degradation of polyaromatic hydrocarbons in the rhizosphere // Trends Biotechnol. 2019. V. 37. No. 9. P. 926–930. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.04.010

6. Hoang S. A., Lamb D., Seshadri B., Sarkar B., Chopala G., Kirkham M. B., Bolan N. S. Rhizoremediation as a green technology for the remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils // J. Hazard Mater. 2021. V. 401. Article No. 123282. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123282

7. Domracheva L. I., Skugoreva S. G., Kovina A. L., Korotkikh A. I., Starikov P. A., Ashikhmina T. Ya. Specificity of plant-microbial complexes under anthropogenic soil pollution (review) // Theoretical and Applied Ecology. 2022. No. 3. P. 14–25 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2022-3-014-025

8. Microbiology workshop / Ed. A. I. Netrusov. Moskva: Akademiya, 2005. 602 p. (in Russian).

9. Raymond R. L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Develop. Industr. Microbiol. 1961. V. 2. No. 1. P. 23–32.

10. Manual of methods for general bacteriology / Eds. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, G. B. Phillips. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1981. 524 p.

11. Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. Bergey's manual of determinative bacteriology. Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

12. Current protocols in molecular biology / Eds. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl. John Wiley & Sons, Inc., 2003. P. 241–245.

13. Lane D. J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic acid techniques in bacterial systematic / Eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. John Wiley and Sons, Ltd., 1991. P. 115–175.

14. Borzenkov I. A., Milekhina E. I., Gotoeva M. T., Rozanova E. P., Belyaev S. S. The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan,

- Western Siberia, and Vietnam // *Microbiology*. 2006. V. 75. No. 1. P. 66–72.
15. Mukhamatdyarova S.R., Korshunova T.Yu., Loginov O.N. Oxidation of oil and oil hydrocarbons by bacteria *Acinetobacter* sp. strain IB DT-5.1/1 // *Izvestiya UNTS RAN*. 2013. No. 3. P. 16–18 (in Russian).
16. Rybkina D.O., Gusev V.A., Plotnikova E.G. Soil microorganisms degrading wide spectrum of technogenous compounds // *Vestnik Permskogo universiteta. Biologiya*. 2005. No. 6. P. 115–122 (in Russian).
17. Zubov D.V., Tolchenov A.A. Rapid method for control activity of enzyme complex // *Vestnik SGTU*. 2012. No. 1 (64). P. 389–392 (in Russian).
18. Pikovskaya R.I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species // *Mikrobiologiya*. 1948. V. 17. P. 362–370 (in Russian).
19. Starikov S.N., Chetverikov S.P. Strain *Enterobacter* sp. UOM-3 is able to synchronous destruction of halogen-containing herbicides and synthesis of indol-3-acetic acid // *Ecobiotech*. 2020. V. 3. No. 4. P. 716–721 (in Russian). doi: 10.31163/2618-964X-2020-3-4-716-721
20. Korshunova T.Yu., Kuzina E.V., Mukhamatdyarova S.R., Sharipova Yu.Yu. Screening for hydrocarbon-oxidizing microorganisms resistant to heavy metals and sodium chloride // *Izvestiya UNTS RAN*. 2022. No. 3. P. 23–30 (in Russian). doi: 10.31040/2222-8349-2022-0-3-23-30
21. Gabbasova I.M., Suleymanov R.R., Garipov T.T. Degradation and remediation of soils polluted with oil-field wastewater // *Eurasian Soil Sci*. 2013. V. 46. No. 2. P. 204–211. doi: 10.1134/S1064229313020051
22. Vareda J.P., Valente A.J., Dur es L. Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: a review // *J. Environ. Manage*. 2019. V. 246. P. 101–118. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.05.126
23. Fokina A.I., Ashikhmina T.Ya., Domracheva L.I., Gornostaeva E.A., Ogorodnikova S.Yu. Heavy metals as a factor of microorganisms metabolism changes (review) // *Theoretical and Applied Ecology*. 2015. No. 2. P. 5–18 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2015-2-005-018
24. Margesin R., Hämmerle M., Tschirko D. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time // *Microb. Ecol*. 2007. V. 53. No. 2. P. 259–269. doi: 10.1007/s00248-006-9136-7
25. Kadri T., Magdouli S., Rouissi T., Brar S.K. *Ex-situ* biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes // *Biochem. Eng. J*. 2018. V. 132. P. 279–287. doi: 10.1016/j.bej.2018.01.014
26. Bamitale O.M., Ayomikun A.M. Biodegradation potential of tropical hydrocarbon degrading *Providencia stuartii* // *Trends Appl. Sci. Res*. 2020. V. 15. No. 3. P. 253–259. doi: 10.3923/tasr.2020.253.259
27. Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T., Bakaeva M., Loginov O. Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses // *Front. Plant Sci*. 2019. V. 10. Article No. 1368. doi: 10.3389/fpls.2019.01368
28. Glick B.R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world // *Microbiol. Res*. 2014. V. 169. No. 1. P. 30–39. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.009
29. 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 // *Sci. Total Environ*. 2016. V. 563–564. P. 693–703. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.061
30. Pishchik V.N., Vorob'ev N.I., Provorov N.A., Khomyakov Yu.V. Mechanisms of plant and microbial adaptation to heavy metals in plant–microbial systems // *Microbiology*. 2016. V. 85. No. 3. P. 257–271. doi: 10.1134/S0026261716030097