



# ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



## ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЗАЦИИ СЕМЯН СУДАНСКОЙ ТРАВЫ ШТАММАМИ РОДА PSEUDOMONAS НА ИХ ВСХОЖЕСТЬ И ДАЛЬНЕЙШИЙ РОСТ НА ФОНЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ УГЛЕВОДОРОДАМИ НЕФТИ

Кузина Е.В., Бакаева М.Д., Рафикова Г.Ф.,  
Четверикова Д.В., Кудоярова Г.Р.

Уфимский институт биологии Уфимского федерального  
исследовательского центра РАН, Уфа  
E-mail: [biolab316@yandex.ru](mailto:biolab316@yandex.ru)

Изучено влияние бактеризации семян суданской травы штаммами *P. humanensis* IB C7 и *P. plecoglossicida* 2.4-D на их всхожесть и дальнейший рост в чистой и загрязненной нефтью почве. В отсутствие нефти бактеризация обоими штаммами микроорганизмов повышала процент проросших семян и ускоряла удлинение корней, но не влияла на длину побега и массу проростков. Загрязнение почвы нефтью тормозило удлинение корней, но у растений, которые выросли из бактеризованных семян, корни были длиннее, чем у необработанных. Стимулирующий эффект на прорастание и рост корней как в присутствии нефти, так и в ее отсутствие был достоверно выше при инокуляции семян бактериями штамма *P. humanensis* IB C7 по сравнению со штаммом *P. plecoglossicida* 2.4-D. Загрязнение почвы нефтью снижало накопление биомассы проростков, но на фоне более низкой концентрации нефти (5 %) их масса была больше у растений, обработанных обоими штаммами бактерий. Таким образом, показана возможность стимуляции роста растений суданской травы бактериями штаммов рода *Pseudomonas*, что важно для реализации процесса фиторемедиации нефтяных загрязнений.

**Ключевые слова:** бактерии-нефтедеструкторы, *Pseudomonas*, бактеризация семян, всхожесть, вес проростков, длина побегов и корней

## THE INFLUENCE OF BACTERIZATION OF SUDAN GRASS SEEDS WITH THE STRAINS OF PSEUDOMONAS ON SEED GERMINATION AND FURTHER GROWTH AGAINST THE BACKGROUND OF SOIL CONTAMINATION BY PETROLEUM HYDROCARBONS

Kuzina E.V., Bakaeva M.D., Rafikova G.F.,  
Chetverikova D.V., Kudoyarova G. R.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of  
the Russian Academy of Sciences, Ufa  
E-mail: [biolab316@yandex.ru](mailto:biolab316@yandex.ru)

We studied the effect of bacterization of Sudan grass seeds with the strains of *Pseudomonas humanensis* IB C7 and *P. plecoglossicida* 2.4-D on seed germination and further seedling growth in soil contaminated with petroleum and unpolluted. In the absence of oil, bacterization with both strains of microorganisms increased percentage of germinated seeds and accelerated root elongation, but did not influence the shoot length and seedling biomass. Contamination of soil with petroleum inhibited root elongation, but, in plants growing from bacterized seeds, roots were longer than in untreated plants. Stimulating effect on germination and root growth was greater, when seeds were inoculated with bacterial strain *P. humanensis* IB C7 as compared with *P. plecoglossicida* 2.4-D. Soil contamination with oil decreased biomass accumulation of the seedlings, but at lower oil concentration (5 %) their mass was greater in plants treated with both strains. Thus we showed possibility of stimulating the growth of Sudan grass by bacteria of *Pseudomonas* genus, which is important for implementation of the process of phytoremediation of oil pollution.

**Keywords:** bacteria-destructors of petroleum, *Pseudomonas*, bacterization of seeds, germination, biomass of seedlings, length of shoots and roots.

Поступила в редакцию: 03.06.2019

DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-2-184-188](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-2-184-188)

## ВВЕДЕНИЕ

Токсичность нефти создает угрозу для окружающей среды в тех местах, где добыча, транспортировка и переработка нефти сопровождается ее разливом [Beyer et al., 2016; Gkorezis et al., 2016; Laffon et al., 2016]. Для очистки почвы от нефти применяют различные подходы, направленные на ее детоксикацию. В отличие от химических методов очистки, при

использовании которых может происходить вторичное загрязнение окружающей среды, методы биоремедиации, основанные на использовании взаимодействия растений и бактерий-деструкторов нефти, экологически безопасны [Yavari et al., 2015; Adipah, 2018]. Хотя и растения, и микроорганизмы потенциально способны сами по себе осуществлять освобождение почвы от углеводородов нефти, их ассоциация может функционировать более эффективно [Kamath et al., 2004; Hou et al., 2015; Agnello et al., 2016; Коршунова и др., 2018]. В основе ассоциации растений и бактерий лежит их взаимовыгодное взаимодействие. Распространение корней в почве создает экологическую нишу для бактерий, поскольку корневые выделения являются субстратом для роста микроорганизмов [Liu et al., 2015]. Кроме того, развитие корневой системы увеличивает пористость почвы, облегчая диффузию кислорода [Gkorezis et al., 2016]. В свою очередь бактерии, как более эффективные деструкторы нефти, снижают токсичность почвы, тем самым создавая благоприятные условия для роста растений. При этом бактерии могут синтезировать регуляторы, которые непосредственно влияют на развитие растений [Kudoyarova et al., 2015]. Хотя это положение не вызывает сомнений, влияние бактерий-деструкторов нефти (в том числе синтезирующих фитогормоны) на рост растений исследовано не достаточно полно. В данной работе было изучено влияние двух штаммов бактерий рода *Pseudomonas* на прорастание семян и дальнейший рост растений суданской травы в чистой и загрязненной нефтью почве. Штаммы были предварительно отобраны по способности накапливать в культуральной жидкости оптимальную (0,5-1,5 мкг/мл) концентрацию ауксинов и, соответственно, более эффективно стимулировать рост растений разных видов [Бакаева и др., 2019]. Суданская трава была выбрана как растение, которое отличается относительной устойчивостью к загрязнению нефтью [Kamath et al., 2004] и мощной корневой системой, проникающей на глубину до 2,5 м, что важно для осуществления процесса фиторемедиации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были растения суданской травы (*Sorghum × drummondii*) сорта Чишминская ранняя. Для оценки влияния бактерий-деструкторов нефти на рост суданской травы были выбраны штаммы бактерий *P. hunanensis* IB C7 (выделен из степной почвы Соль-Илецкого района Оренбургской области, РФ), *P. plecoglossicida* 2.4-D (штамм описан в статье Четверикова и др. [2017]). Штаммы хранятся в Коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН.

Бактерии культивировали в жидкой питательной среде Кинг Б (г/л воды): пептон – 20,0, глицерин – 10,0,  $K_2HPO_4$  – 1,5,  $MgSO_4 \cdot xH_2O$  – 1,5 [King et al., 1954]. Посев штаммов в питательную среду производили из суспензий бактериальных клеток в стерильной водопроводной воде так, чтобы их исходный титр в питательной среде составлял  $(1 \pm 0,5) \cdot 10^5 - 10^6$  КОЕ/мл. Микроорганизмы культивировали в колбах Эрленмейера на термостатируемом шейкере (160 об/мин) при температуре 28°C в течение 72 часов.

Инокуляцию семян осуществляли путем смачивания их поверхности жидкой культурой бактерий, таким образом, чтобы титр клеток составил  $10^6$  КОЕ/семя. Контрольные семена замачивали в воде. Семена в семикратной повторности по 15 штук высевали в сосуды с 60 г почвы и инкубировали при температуре 20°C 10 суток при освещенности  $100 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ . Почву искусственно загрязняли нефтью в концентрации 5%, 8% от массы почвы, влажность поддерживали на уровне 80% от полной влагоемкости. У растений определяли всхожесть, измеряли массу проростков, длину побегов и длину первичного корня.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение влияния нефти на прорастание семян и ранние стадии их дальнейшего роста важно, поскольку именно эти этапы онтогенеза растений наиболее чувствительны к токсическому действию углеводородов нефти [Kamath et al., 2004]. Бактеризация обоими штаммами микроорганизмов повышала процент проросших семян, который в контроле (т.е. у необработанных бактериями семян) был довольно низким (табл.). При этом всхожесть семян, инокулированных бактериями штамма *P. hunanensis* IB C7, была достоверно выше, чем в случае бактеризации семян штаммом *P. plecoglossicida* 2.4-D.

**Таблица. Влияние нефтяного загрязнения и обработки семян бактериями на всхожесть и рост растений суданской травы**

| Варианты опыта  |          | Всхожесть, %       | Длина корня, мм       | Длина побега, мм       | Масса проростка, мг    |
|---|----------|--------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Бактерии  | Нефть, % |                    |                       |                        |                        |
| Без бактерий<br>(контроль)                            | -        | 27±2 <sup>b*</sup> | 50.3±0.9 <sup>d</sup> | 46.5±1.0 <sup>e</sup>  | 46.3±1.3 <sup>de</sup> |
|   | 5        | 33±2 <sup>c</sup>  | 42.5±0.6 <sup>c</sup> | 30.2±0.9 <sup>cd</sup> | 40.1±1.4 <sup>c</sup>  |
|   | 8        | 20±1 <sup>a</sup>  | 15.0±1.5 <sup>a</sup> | 28.0±0.9 <sup>bc</sup> | 20.8±1.1 <sup>ab</sup> |
| <i>Pseudomonas</i><br><i>plecoglossicida</i><br>2.4-D | -        | 40±1 <sup>d</sup>  | 67.3±1.2 <sup>f</sup> | 45.8±0.8 <sup>e</sup>  | 52.4±2.2 <sup>e</sup>  |
|   | 5        | 87±4 <sup>g</sup>  | 50.0±1.0 <sup>d</sup> | 35.0±1.9 <sup>d</sup>  | 44.6±1.4 <sup>d</sup>  |
|   | 8        | 18±2 <sup>a</sup>  | 19.2±1.2 <sup>a</sup> | 22.6±1.3 <sup>a</sup>  | 18.7±1.1 <sup>a</sup>  |
| <i>Pseudomonas</i><br><i>hunanensis</i> IB C7         | -        | 47±2 <sup>e</sup>  | 74.3±1.3 <sup>g</sup> | 45.6±0.7 <sup>e</sup>  | 49.4±1.6 <sup>e</sup>  |
|   | 5        | 60±3 <sup>f</sup>  | 57.5±0.8 <sup>e</sup> | 29.3±0.5 <sup>c</sup>  | 45.4±1.7 <sup>d</sup>  |
|   | 8        | 33±2 <sup>c</sup>  | 33.6±1.2 <sup>b</sup> | 25.8±0.5 <sup>ab</sup> | 24.0±1.0 <sup>b</sup>  |

\* представлены средние значения ± SE. Достоверно отличающиеся значения отмечены различными буквами (P≤0,05, t-тест).

Бактеризация также ускоряла удлинение корней. Обработка семян суданской травы штаммом *P. hunanensis* IB C7 была более эффективной по сравнению со штаммом *P. plecoglossicida* 2.4-D, что проявлялось в большей длине корней. В отсутствие загрязнения бактерилизация не оказывала достоверного влияния ни на длину побега, ни на массу проростков. Тем не менее, стимуляция бактериями прорастания семян и удлинения корней, которая проявлялась в отсутствие загрязнения почвы нефтью, свидетельствует о способности бактерий-нефтедеструкторов непосредственно влиять на рост растений, а не только снижать фитотоксичность загрязненной почвы за счет разрушения углеводородов.

Положительное влияние бактерий на удлинение корней, обнаруженное в наших экспериментах, потенциально важно для осуществления ими фиторемедиации, поскольку условия для роста бактерий наиболее благоприятны именно на поверхности корней и в ризосфере [Khan et al., 2013]. Вместе с тем важно было убедиться, что положительное влияние бактерий на рост корней сохраняется в присутствии нефти в почве. Загрязнение почвы нефтью тормозило удлинение корней, и они были короче, чем у соответствующего контроля. Вместе с тем на фоне 5 % уровня нефти, у растений, которые выросли из бактеризованных семян, корни были длиннее, чем у необработанных бактериями растений. Штамм бактерий *P. hunanensis* IB C7 показал большую эффективность по сравнению со штаммом *P. plecoglossicida* 2.4-D: корни обработанных им растений были длиннее по сравнению не только с контролем, но и с растениями, инокулированными штаммом *P. plecoglossicida* 2.4-D. Бактерии штамма *P. hunanensis* IB C7 оказались способны

поддерживать удлинение корней и на фоне более высокой концентрации нефти (8 %): корни у обработанных штаммом растений были длиннее, чем у необработанных. При этой концентрации нефти длина корней суданской травы в варианте опыта со штаммом *P. plecoglossicida* 2.4-D не отличалась достоверно от контроля. В целом, бактериализация семян способствовала снижению ингибирующего действия загрязненной почвы на рост корней, что важно для осуществления растениями функции ремедиации.

На фоне 5% уровня загрязнения почвы нефтью наблюдался парадоксальный эффект: увеличение всхожести семян по сравнению с растениями, которые проросли на чистой почве. Этот эффект проявлялся как у обработанных, так и необработанных бактериями растений. Однако в случае бактериализации увеличение всхожести семян суданской травы было более ярко выражено. Например, в присутствии 5 % нефти бактериализация штаммом *P. hunanensis* IB C7 увеличивала всхожесть семян более чем 2 раза. Хотя на первый взгляд такой эффект может показаться неожиданным, он, тем не менее, соответствует некоторым данным литературы. Так присутствие нефти в почве увеличивало всхожесть семян овсяницы красной (*Festuca rubra*) [Klokk, 1984]. По мнению Вона с соавторами [2011], этот эффект может объясняться присутствием в нефти рострегулирующих веществ. Так или иначе, более высокие концентрации нефти снижали всхожесть семян, а их дальнейший рост подавляли обе концентрации нефти.

В присутствии более низкой концентрации нефти (5 %) проявлялось положительное влияние бактериализации на накопление биомассы проростков, которая хотя и снижалась по сравнению с растениями, развивающимися в чистой почве, но была выше, чем у необработанных бактериями растений, росших на том же фоне загрязнения. При этом в условиях загрязнения почвы нефтью бактериализация не оказывала достоверного влияния на длину побега.

Таким образом, бактериализация семян положительно сказывалась на росте растений суданской травы, как в присутствии, так и в отсутствие нефти. Хотя полностью избежать ингибирования роста под влиянием загрязнения не удалось, бактериализация снижала степень отрицательного действия нефти на рост растений. Штамм *P. hunanensis* IB C7 проявлял более выраженный стимулирующий эффект на прорастание семян и удлинение корней в отсутствие загрязнения, эффективнее поддерживал удлинение корней на фоне низкой концентрации нефти (4 %) по сравнению со штаммом *P. plecoglossicida* 2.4-D и, в отличие от последнего, проявлял положительное действие на длину корней и на фоне более высокого уровня загрязнения (8%). При этом и тот и другой штамм в условиях загрязнения почвы нефтью оказывали положительное влияние на биомассу проростков. По результатам проведенных исследований оба штамма представляются перспективными для оптимизации процесса фиторемедиации.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 18-29-05025/18 с использованием оборудования ЦКП «БиоАналит» (Уфа, Россия).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакаева М.Д., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Четверикова Д.В., Столярова Е.А., Мухаматдярова С.Р., Кудоярова Г.Р. Влияние бактерий-деструкторов углеводов нефти на прорастание и рост растений // Экобиотех, 2019, Том 2, № 2, С. 175-183. DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-2-175-183](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-2-175-183)

2. Коршунова Т.Ю., Бакаева М.Д., Логинов О.Н. Полифункциональные биопрепараты – нефтеструкторы: влияние на растения и содержание нефти почве // Экология и промышленность России. 2018. Т. 22(9). С. 18-22. DOI: [10.18412/1816-0395-2018-9-18-22](https://doi.org/10.18412/1816-0395-2018-9-18-22)
3. Четвериков С.П., Шарипов Д.А., Коршунова Т.Ю., Логинов О.Н. Разложение перфтороктансульфоната штаммом *Pseudomonas plecoglossicida* 2.4-D // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53(5). С. 477-483. DOI: [10.7868/S0555109917050026](https://doi.org/10.7868/S0555109917050026)
4. Adipah S. Remediation of petroleum hydrocarbons contaminated soil by fenton's oxidation // Journal of Environmental Science and Public Health. 2018. V. 2. No. 4. P. 168-178. DOI: [10.26502/jesph.96120036](https://doi.org/10.26502/jesph.96120036)
5. 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](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.061)
6. Beyer J., Trannum H.C., Bakke T., Hodson P.V., Collier T.K. Environmental effects of the deepwater horizon oil spill: A review // Marine Pollution Bulletin. 2016. V. 110. No. 1. P. 28-51. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2016.06.027](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.027)
7. Bona C., Rezende I.M., Oliveira Santos G., Souza L.A. Effect of soil contaminated by diesel oil on the germination of seeds and the growth of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) seedlings // Brazilian Archives of Biology and Technology. 2011. V. 54. No. 6. P. 1379-1387. DOI: [10.1590/s1516-89132011000600025](https://doi.org/10.1590/s1516-89132011000600025)
8. Gkorezis P., Daghighi M., Franzetti A., Van Hamme J.D., Sillen W., Vangronsveld J. The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective // Frontiers in Microbiology. 2016. V. 7: 1836. DOI: [10.3389/fmicb.2016.01836](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01836)
9. 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](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.025)
10. Kamath R., Rentz J.A., Schnoor J.L., Alvarez P.J.J. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: principles and applications // Studies in Surface Science and Catalysis. 2004. V. 151. P. 447-478.
11. Khan S., Afzal M., Iqbal S., Khan Q.M. Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. // Chemosphere. 2013. V 90. No. 4. P. 1317-1332. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2012.09.045](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.045)
12. 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.
13. Klokk M. Effects of oil pollution on the germination and vegetative growth of five species of vascular plant // Oil and Petrochemical Pollution. 1984. V. 21. P. 25-30.
14. Kudoyarova G.R., Arkhipova T.N., Melent'ev A.I. Role of bacterial phytohormones in plant growth regulation and their development // In: Maheshwari D. (eds) Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem. Sustainable Development and Biodiversity. 2015. V. 12. P. 69-86. DOI: [10.1007/978-3-319-24654-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3_4)
15. Laffon B., Pásaro E., Valdiglesias V. Effects of exposure to oil spills on human health: Updated review // Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B. 2016. V. 19. No. 3-4. P. 105-128. DOI: [10.1080/10937404.2016.1168730](https://doi.org/10.1080/10937404.2016.1168730)
16. Liu W., Hou J., Wang Q., Yang H., Luo Y., Christie P. Collection and analysis of root exudates of *Festuca arundinacea* L. and their role in facilitating the phytoremediation of petroleum-contaminated soil // Plant and Soil. 2015. V. 389. P. 109. DOI: [10.1007/s11104-014-2345-9](https://doi.org/10.1007/s11104-014-2345-9)
17. Yavari S., Malakahmad A., Sapari N.B. A Review on phytoremediation of crude oil spills // Water, Air, & Soil Pollution. 2015. V. 226: 279. DOI: [10.1007/s11270-015-2550-z](https://doi.org/10.1007/s11270-015-2550-z)