

EDN: NZWNRK

УДК 579

Oil-Degrading Microorganisms of the Genus *Pseudomonas* with Resistance to Additional Pollutants and Phytostimulating Activity as Promising Agents of Environmental Biotechnology

Tatiana Yu. Korshunova*,
Elena V. Kuzina, Milyausha G. Iskuzhina,
Svetlana R. Mukhamatdyarova and Yuliyana Yu. Sharipova
Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of RAS
Ufa, Russian Federation

Received 20.03.2023, received in revised form 03.11.2023, accepted 05.12.2023

Abstract. Bioremediation of oil contaminated agricultural soils is greatly hindered by the presence of additional pollutants such as herbicides. They can inhibit the activity of introduced bacterial decomposers. The aim of the study is to screen for herbicide-resistant oil-degrading microorganisms and to evaluate their ability to stimulate growth and development of phytomeliorant plants. Isolated and identified strains of hydrocarbon-oxidizing pseudomonads were found resistant to herbicides based on various active ingredients (2,4-D, imazethapyr, mixtures of imazamox and quizalofop-P-ethyl), as well as to heavy metals such as lead, nickel and zinc. All bacteria exhibited nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing activity and produced indolyl-3-acetic acid. They helped plants to overcome stress caused by the presence of pollutants. They contributed to an increase in the length of the roots and shoots of barley and clover in clean and oil-contaminated soil and had a positive effect on clover seedlings in the presence of a herbicide. The *P. frederiksbergensis* UOM 11 strain was found to have a significant ability to decompose oil; it also enhanced growth and development of plants. Therefore, it is recommended as the basis for microbial-plant complexes for cleaning and restoring soils. The other strains obtained in screening are also valuable from the perspective of environmental biotechnology: *P. alcaligenes* UOM 10 is an effective oil-destroyer; the other microorganisms are prospective growth stimulators for phytomeliorant plants. The results obtained can be used in the development of bioremediation methods for oil-contaminated agricultural soils.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: korshunovaty@mail.ru

ORCID: 0000-0002-6186-0827 (Korshunova T.); 0000-0002-6905-0108 (Kuzina E.); 0000-0003-0196-9596 (Iskuzhina M.); 0000-0001-7641-7943 (Mukhamatdyarova S.); 0000-0002-1794-5137 (Sharipova Yu.)

Keywords: oil, herbicides, pseudomonas, PGP-properties, growth-stimulating activity, barley, clover.

Acknowledgments. This work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23–24–00130, <https://rscf.ru/en/project/23–24–00130/>

Citation: Korshunova T. Yu., Kuzina E. V., Iskuzhina M. G., Mukhamatdyarova S. R., Sharipova Yu. Yu. Oil-degrading microorganisms of the genus *Pseudomonas* with resistance to additional pollutants and phytostimulating activity as promising agents of environmental biotechnology. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(1), 64–81. EDN: NZWNRK



Микроорганизмы-нефтедеструкторы рода *Pseudomonas* с устойчивостью к дополнительным поллютантам и фитостимулирующей активностью как перспективные агенты экобиотехнологии

**Т. Ю. Коршунова, Е. В. Кузина, М. Г. Искужина,
С. Р. Мухаматдырова, Ю. Ю. Шарипова**
*Уфимский институт биологии
Уфимского федерального исследовательского центра РАН
Российская Федерация, Уфа*

Аннотация. Биологическая очистка сельскохозяйственных почв от нефти сильно затруднена присутствием таких дополнительных поллютантов, как гербициды, которые могут ингибировать деятельность интродуцированных бактерий-деструкторов. Целью исследования был скрининг микроорганизмов, разлагающих нефть и устойчивых к гербицидам, изучение их свойств, а также оценка способности к стимуляции роста и развития растений-фитомелиорантов. Выделенные и идентифицированные штаммы углеводородокисляющих псевдомонад проявляли устойчивость к гербицидам на основе различных действующих веществ (2,4-D, имазетапира, смеси имзамокса и хизалофоп-П-этила), а также к тяжелым металлам (свинец, никель и цинк). Все бактерии обладали азотфиксирующей и фосфатмобилизирующей активностью и продуцировали индолил-3-уксусную кислоту. Они помогали растениям ячменя и клевера преодолевать стресс, вызванный присутствием поллютантов путем увеличения длины корней и побегов в чистой и нефтезагрязненной почве и положительно влияли на проростки клевера в почве с гербицидом. Штамм *P. frederiksbergensis* UOM 11 обладал значительной способностью к разложению нефти и был способен к усилению роста и развития растений, поэтому он рекомендуется в качестве основы микробно-растительных комплексов для очистки и восстановления почв. Остальные штаммы также имеют ценность с точки зрения экологической биотехнологии: *P. alcaligenes* UOM 10 как нефтедеструктор, а остальные микроорганизмы – как стимуляторы роста растений-мелиорантов. Полученные результаты можно использовать при разработке способов биоремедиации нефтезагрязненных сельскохозяйственных почв.

Ключевые слова: нефть, гербициды, псевдомонады, PGP-свойства, ростстимулирующая активность, ячмень, клевер.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда № 23–24–00130, <https://rscf.ru/en/project/23–24–00130/>

Цитирование: Коршунова Т. Ю. Микроорганизмы-нефтедеструкторы рода *Pseudomonas* с устойчивостью к дополнительным поллютантам и фитостимулирующей активностью как перспективные агенты экобиотехнологии / Т. Ю. Коршунова, Е. В. Кузина, М. Г. Искужина, С. Р. Мухаматдырова, Ю. Ю. Шарипова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(1). С. 64–81. EDN: NZWNRK

Введение

Во всем мире значительные площади сельскохозяйственных угодий подвержены углеводородному загрязнению (Martínez et al., 2022). При этом в большинстве случаев эти почвы уже изначально были контаминированы различными химическими средствами защиты растений, среди которых самым многочисленным классом (48 % от мирового потребления пестицидов (Gupta, 2017)) являются гербициды, используемые для уничтожения сорной растительности. Как и нефтепродукты (Sui et al., 2021), они отрицательно воздействуют на почвенные микроорганизмы и ингибируют рост и физиологические функции растений (Mahapatra et al., 2019; Meena et al., 2020). Одновременно находясь в почве, поллютанты могут усиливать негативные эффекты друг друга, что значительно усложняет ее очистку и восстановление (Ye et al., 2017). Проведено много исследований влияния на почву и ее биоценоз нефти и гербицидов по отдельности и предложены разные подходы для их удаления (Sun et al., 2018; Michael-Igolima et al., 2022). Однако существуют лишь единичные публикации, посвященные разработке способов очистки нефтезагрязненных территорий в присутствии таких дополнительных токсикантов, как гербициды (Islas-García et al., 2015).

В последнее время при разработке биологических подходов к очистке почв особое

внимание уделяется штаммам бактерий, которые, с одной стороны, обладают устойчивостью и способностью к биодеградации поллютантов, с другой стороны – улучшают рост растений-фитомелиорантов (Ebadi et al., 2018). С этой точки зрения большой интерес представляют бактерии рода *Pseudomonas*. Они являются активными деструкторами благодаря наличию специфических ферментных систем и дополнительного генетического материала в виде плазмид биодеградации и продуцируют биосурфактанты, способствующие диспергированию и солюбилизации гидрофобных веществ, углеводов, в частности (Kahlon, 2016; Silva et al., 2019). *Pseudomonas* spp. могут положительно влиять на растения за счет синтеза фитогормонов, сидерофоров, увеличения доступности микроэлементов, подавления фитопатогенов, а также индуцировать устойчивость к абиотическому стрессу (Sharma, Pathak, 2014; Korshunova et al., 2021). Псевдомонады поддерживают достаточную численность на минимальных питательных средах, обладают высокой скоростью размножения и при их культивировании можно использовать дешевое сырье, например, отходы других производств (Weimer et al., 2020).

Цель работы – выделение новых штаммов углеводородокисляющих бактерий рода *Pseudomonas*, устойчивых к гербицидам и оценка их способности к стимуляции роста и развития растений-фитомелиорантов.

Материалы и методы

Штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов выделяли с помощью метода накопительных культур (Нетрусов, 2005) из образцов нефтезагрязненных пахотных почв с территории Республики Башкортостан, на которых применялись различные гербициды. В колбы со 100 мл жидкой минеральной среды Раймонда (Raymond, 1961) вносили 1 % (масс.) нефти и 2 г почвы и инкубировали на орбитальном шейкере ES-20/60 (SIA BIOSAN, Латвия) при температуре 28 °С и 160 об./мин в течение 7 суток. Для выделения изолятов проводили высеивание из накопительных культур на питательный агар (ПА) (Нетрусов, 2005), после чего микроорганизмы культивировали 5 суток при 28 °С. Для дальнейших исследований отбирали изоляты, наиболее активно растущие на твердой и жидкой среде Раймонда с нефтью в качестве единственного источника углерода. Интенсивность роста в жидкой среде с нефтью (4 % масс.) оценивали по изменению состояния среды и сдвигу pH.

Идентификацию штаммов проводили МАЛДИ масс-спектрометрическим методом (МАЛДИ–ВП) на приборе Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Германия), оснащенный времяпролетным анализатором так, как описано (Korshunova et al., 2015). Для определения таксономической принадлежности штаммов использовали программу Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik). Каждому изоляту присваивали численный рейтинг идентификации (*score*). Согласно рекомендациям производителя, положительная идентификация на уровне рода возможна при $score \geq 1,7$, на уровне вида – при $score \geq 2,0$. $score < 1,7$ обозначает отсутствие идентификации.

Для уточнения видовой принадлежности микроорганизмов проводили секвенирование фрагмента нуклеотидной последовательно-

сти гена 16S рПНК. Тотальную ДНК выделяли по методике, описанной (Wilson, 2003). Амплификацию фрагмента гена 16S рПНК осуществляли с универсальными праймерами 27F (5'-AGAGTTTGGATCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGGTACCTTGTTACGACTT-3') на амплификаторе C 1000 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 PRIZM 3730 (Applied Biosystems, США). Сходство последовательностей генов 16S рПНК рассчитывали с помощью сервера EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>).

Углеводородокисляющую активность штаммов оценивали по степени деструкции алифатической фракции нефти с помощью метода газовой хроматографии (Borzenkov et al., 2006). Бактерии культивировали в жидкой среде Раймонда с нефтью (4 % объём.) при 28 °С и 160 об./мин в течение 5 суток. В качестве эталона использовали штамм-нефтедеструктор *Pseudomonas turukhanskensis* IB 1.1 (Коршунова и др., 2016). После инкубации парафиново-нафтеновую фракцию нефти экстрагировали гексаном и анализировали на газовом хроматографе (Кристалл Люкс 4000, Россия) с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой Zebron™ ZB-1XT. Степень биодеструкции нефти (%) рассчитывали на основе хроматографических данных в соответствии с инструкциями к прибору.

Устойчивость штаммов к действию гербицидов определяли визуально по интенсивности роста на ПА с добавлением различных концентраций препаратов (от 1 до 10 мл/л) после 7 суток культивирования при 28 °С. Ис-

пользовали селективные гербициды российского производства:

– Октапон экстра (производитель ООО «АХК-АГРО»), действующее вещество (д.в.) 2,4-дихлор-феноксисукусная кислота (2,4-Д);

– Чисталан (ООО «АХК-АГРО»), д.в. 2,4-Д (2-этилгексильный эфир) и дикамба (натриевая соль);

– Тапир (ООО «Агро Эксперт Групп»), д.в. имазетапир;

– Гермес (ЗАО «Щелково Агрохим»), д.в. имазамокс и хизалофоп-П-этил;

– Фенизан (ЗАО «Щелково Агрохим»), д.в. дикамба и хлорсульфурон. Готовые препаративные формы были выбраны в связи с тем, что входящие в их состав поверхностно-активные вещества и другие компоненты могут изменять уровень токсичности гербицидов (Rodea-Palomares et al., 2015).

Устойчивость штаммов к тяжелым металлам (Zn, Co, Cd, Pb, Cu, Ni) оценивали визуально по их росту на ПА с солями этих металлов ($ZnSO_4 \times 6H_2O$, $CoCl_2 \times 2H_2O$, $Cd(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$, $Pb(CH_3COO)_2 \times 3H_2O$, $CuSO_4 \times 5H_2O$, $NiCl_2 \times 6H_2O$) после 7 суток культивирования при 28 °С. Концентрацию ионов металлов изменяли от 1 до 10 ммоль/л.

Производство штаммами гидролитических ферментов устанавливали следующими методами: протеазы – по разжижению желатины, амилазы – по диаметру зоны гидролиза крахмала, целлюлазы – по наличию зоны растворения карбоксиметилцеллюлозы; липазы – по наличию непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот на среде с Твин 80 (Нетрусов, 2005; Зубов, Толченев, 2012).

Способность штаммов к растворению неорганических фосфатов определяли на среде Пиковской (Пиковская, 1948) со свежесажженным ортофосфатом кальция через 7 суток культивирования. Индекс солюбилизации

(SI) рассчитывали как отношение диаметра зоны просветления вокруг колонии бактерий (мм) к диаметру колонии (мм). Если значение SI было меньше 2, то принимали, что изолят обладает низким потенциалом солюбилизации, если SI был 2–3, то изолят обладает средним потенциалом солюбилизации, если SI больше 3, то изолят обладает высоким потенциалом (Lisboa et al., 2021).

Наличие способности к азотфиксации выявляли по показателям роста на среде Эшби (Нетрусов, 2005) при 28 °С. Штаммы считали активными, если численность их клеток за 72 ч культивирования увеличивалась с 10^5 до 10^9 КОЕ/мл и более. Меньшая скорость роста интерпретировалась как слабый рост.

Содержание индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в культуральной жидкости анализировали хроматографически так, как это было описано (Стариков, Четвериков, 2020). Отбор проб для оценки содержания ИУК проводили после выращивания бактерий на ПА в течение 5 суток. Культуральную жидкость подвергали центрифугированию при 8000 g с последующей ультрафильтрацией через кассеты с диаметром пор 1 кДа (SARTOCOON Slice Cassete, Германия). Ультрафильтраты анализировали в системе ВЭЖХ LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu, Япония). Для хроматографического разделения использовали колонку Zorbax-ODS (250x4,6 мм) (Shimadzu, Япония) в изократическом режиме при соотношении растворителей 0,1 % уксусной кислоты в воде: ацетонитрил – 20:80. Поглощение регистрировали при длине волны 279 нм. Концентрацию ИУК определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандарта (Sigma, США), в интервале концентраций 10–10000 нг/мл.

Наличие у штаммов способности к стимуляции роста растений проверяли на семе-

нах ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Челябинский 99 и клевера лугового (красного) (*Trifolium pratense* L.) сорта Ранний 2. Выбор растений обусловлен тем, что они относятся к разным семействам (*Poaceae* и *Fabaceae*), обладают устойчивостью к нефтяному загрязнению, отзывчивостью на бактеризацию и ранее уже применялись в качестве фитомелиорантов (Ertekin et al., 2011; Karličić et al., 2020; Kuzina et al., 2021; Sawicka et al., 2022). Инокуляцию семян проводили в течение 15 мин. Необходимое количество жидкой культуры бактерий рассчитывали таким образом, чтобы титр клеток на семени составлял 10^5 КОЕ для ячменя и 10^4 КОЕ для клевера. Контрольные семена обрабатывали водопроводной водой. Семена ячменя (15 шт.) и клевера (20 шт.) раскладывали на почве и инкубировали при 24–26 °С в течение 3 и 4 суток соответственно, после чего определяли всхожесть, длину побегов и длину корней (у ячменя измеряли суммарную длину корней). Влажность почвы в течение опыта поддерживали на уровне 60 % от полной влагоемкости.

Для проверки влияния штаммов на рост растений в условиях нефтяного загрязнения почву загрязняли нефтью (2 % масс.), ровным слоем раскладывали в чашки Петри (по 40 г в чашку) и оставляли на 2 суток для выветривания токсичных летучих компонентов. Далее эксперимент проводили так, как это было описано выше.

Для оценки влияния бактерий на рост и развитие растений при загрязнении гербицидом в чашки Петри помещали по 40 г почвы и увлажняли ее до 60 % от полной влагоемкости. Почву обрабатывали раствором гербицида Тапир (концентрация 4 мл/л). В одну чашку вносили по 180 мкл рабочего раствора гербицида (при расчете учитывали площадь почвенной пластинки). Количество гербицида было увеличено в 2 раза по срав-

нению с расходом, рекомендованным производителем. После обработки почву перемешивали и раскладывали на ее поверхности семена клевера (20 шт.). Бактеризацию семян проводили, как описано выше. Чашки инкубировали при температуре 24–26 °С в течение 4 суток. После этого подсчитывали всхожесть семян и измеряли длину побегов и корней.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных программ MS Excel. На рисунках и в таблицах данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты

Из 54 визуально различающихся при выращивании на ПА изолятов для дальнейших исследований были отобраны 18, которые характеризовались наиболее интенсивным ростом на агаризованной и жидкой среде Раймонда с нефтью. При культивировании каждого изолята в жидкой среде наблюдалось уменьшение нефтяной пленки на ее поверхности и на стенках колб, диспергирование нефти, образование хлопьев и сдвиг pH в кислую сторону с 6,70–6,74 в начале инкубации до 5,56–6,38 – в конце. У этих изолятов был проведен МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ фракции клеточных белков, согласно данным которого 7 изолятов из 18 были отнесены к роду *Pseudomonas* (UOM 9, UOM 10, UOM 11, UOM 13, UOM 14, UOM 15, UOM 16). *Score* штаммов UOM 9 и UOM 15 был равен 1,903 и 1,989, что соответствует высокой степени точности родовой идентификации. У UOM 10, UOM 11, UOM 13, UOM 14, UOM 16 значение *score* составляло 2,073–2,201. Это соответствует высокой степени видовой идентификации (табл. 1). У всех штаммов псевдомонад был проведен сравнительный анализ нуклеотидной по-

Таблица 1. Изоляты, идентифицированные с помощью МАЛДИ–ВП масс-спектрометрии и секвенирования гена 16S рРНК

Table 1. Isolates identified by MALDI–TOF mass-spectrometry and 16S rRNA gene sequencing

Изолят	Идентификация с помощью МАЛДИ–ВП масс-спектрометрии (score; уровень идентификации)	Идентификация с помощью секвенирования гена 16S рРНК, наиболее близкий типовой штамм (% сходства)	№ нуклеотидной последовательности в GenBank
UOM 9	<i>Pseudomonas</i> spp. (1,903; B)	<i>P. silesiensis</i> A3 ^T (99,50)	OQ439800
UOM 10	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (2,122; A)	<i>P. alcaligenes</i> NBRC 14159 ^T (99,15)	OP692728
UOM 11	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> (2,073; A)	<i>P. frederiksbergensis</i> JAJ28 ^T (99,72)	OP692729
UOM 13	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> (2,186; A)	<i>P. arsenicoxydans</i> CECT 7543 ^T (99,44)	OQ439801
UOM 14	<i>Pseudomonas jessenii</i> (2,201; A)	<i>P. jessenii</i> DSM 17150 ^T (99,86)	OQ439802
UOM 15	<i>Pseudomonas</i> spp. (1,989; B)	<i>P. zhaodongensis</i> NEAU-ST5–21 ^T (99,01)	OQ439803
UOM 16	<i>Pseudomonas avellanae</i> (2,154; A)	<i>P. avellanae</i> BPIC 631 ^T (99,15)	OQ439804

Примечание. А – идентификация до вида, В – идентификация до рода

последовательности гена 16S рРНК, а сами последовательности депонированы в GenBank (табл. 1). Таким образом, по совокупности результатов проведенных исследований было установлено, что штамм UOM 9 принадлежит к виду *P. silesiensis*, UOM 10 – *P. alcaligenes*,

UOM 11 – *P. frederiksbergensis*, UOM 13 – *P. arsenicoxydans*, UOM 14 – *P. jessenii*, UOM 15 – *P. zhaodongensis*, UOM 16 – *P. avellanae*.

Бактерии обладали разной способностью к разложению нефти в жидкой среде (рис. 1). Степень биодеструкции у *P. silesiensis* UOM 9,

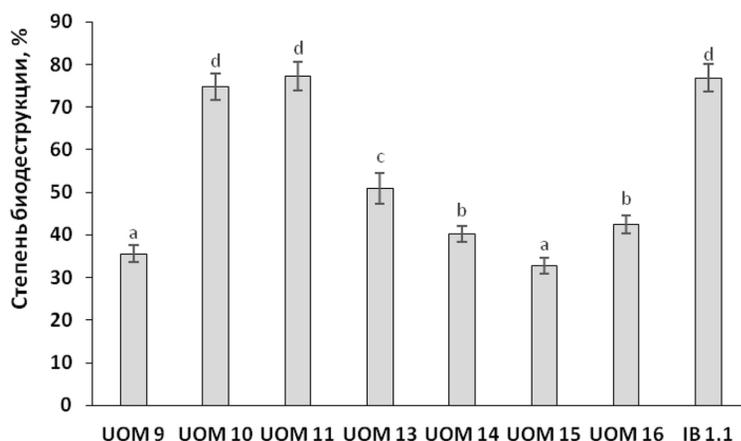


Рис. 1. Степень биодеструкции нефти штаммами псевдомонад. Статистически отличающиеся средние значения отмечены разными буквами ($p \leq 0,05$). UOM 9, UOM 10, UOM 11, UOM 13, UOM 14, UOM 15 и UOM 16, IB 1.1 – штаммы *P. silesiensis* UOM 9, *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. arsenicoxydans* UOM 13, *P. jessenii* UOM 14, *P. zhaodongensis* UOM 15, *P. avellanae* UOM 16, *P. turukhanskensis* IB 1.1 соответственно

Fig. 1. Degree of oil biodegradation by pseudomonad strains. Statistically different means are marked with different letters ($p \leq 0.05$). UOM 9, UOM 10, UOM 11, UOM 13, UOM 14, UOM 15, UOM 16, and IB 1.1 – treatments with *P. silesiensis* UOM 9, *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. arsenicoxydans* UOM 13, *P. jessenii* UOM 14, *P. zhaodongensis* UOM 15, *P. avellanae* UOM 16, and *P. turukhanskensis* IB 1.1, respectively

P. jessenii UOM 14, *P. zhaodongensis* UOM 15, *P. avellanae* UOM 16 составляла 32,7–42,4 %, у *P. arsenicoxydans* UOM 13–50,8 %. Самый высокий уровень деградации нефти зафиксирован для штаммов *P. alcaligenes* UOM 10 (74,8 %) и *P. frederiksbergensis* UOM 11 (77,3 %). Эти показатели были равны таковому у эталонного штамма-нефтедеструктора *P. turukhanskensis* IB 1.1 (76,8 %).

Несмотря на то что гербициды Октапон экстра, Тапир и Гермес содержат разные действующие вещества, все штаммы обладали устойчивостью к ним во всем диапазоне концентраций, что свидетельствует об отсутствии токсичности этих препаратов для изучаемых бактерий. Исключение составлял *P. jessenii*

UOM 14, который не выдерживал присутствия Октапон экстра более 5 мл/л. Устойчивость бактерий к Чисталану и Фенизану была намного ниже (не более 5 мл/л). Штаммы *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. jessenii* UOM 14, *P. zhaodongensis* UOM 15 не росли при концентрации Чисталана выше 1 мл/л (табл. 2).

Среди всех изучаемых микроорганизмов *P. jessenii* UOM 14 проявил самую высокую устойчивость к четырем тяжелым металлам из шести (свинец, кадмий, цинк, медь). Наиболее токсичным для микроорганизмов был кадмий. Он полностью подавлял рост некоторых штаммов (*P. alcaligenes* UOM 10 и *P. zhaodongensis* UOM 15). Наименее токсичными были свинец, цинк и никель. Псевдомо-

Таблица 2. Свойства штаммов псевдомонад

Table 2. Properties of pseudomonad strains

Свойство		Штамм						
		UOM 9	UOM 10	UOM 11	UOM 13	UOM 14	UOM 15	UOM 16
Максимальная концентрация* гербицидов, г/л	Октапон экстра	10	10	10	10	5	10	10
	Чисталан	5	5	1	5	1	1	5
	Тапир	10	10	10	10	10	10	10
	Гермес	10	10	10	10	10	10	10
	Фенизан	5	5	5	5	5	5	5
Максимальная концентрация* тяжелых металлов, ммоль/л	Pb ²⁺	5	5	5	5	6	5	5
	Zn ²⁺	4	4	4	4	8	4	4
	Cd ²⁺	1	-	1	1	2	-	1
	Co ²⁺	3	3	4	3	3	2	4
	Cu ²⁺	2	3	3	2	4	3	2
	Ni ²⁺	4	4	4	4	4	4	4
Продукция гидролитических ферментов	липаза	-	+	+	+	+	+	-
	амилаза	-	-	-	-	-	+	-
	протеаза	-	+	-	-	+	-	-
	целлюлаза	-	-	-	-	-	+	-
Индекс солюбилизации		2,2±0,2	1,8±0,1	3,2±0,2	2,3±0,2	2,0±0,1	1,8±0,2	3,0±0,2
Азотфиксация		+	+	+	+	+	+	+
Продукция ИУК, нг/мл		539±29	1627±75	898±40	305±22	1615±69	975±48	940±53

Примечание. Прочерк – отсутствие признака, + – наличие признака. UOM 9, UOM 10, UOM 11, UOM 13, UOM 14, UOM 15 и UOM 16 – штаммы *P. silesiensis* UOM 9, *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. arsenicoxydans* UOM 13, *P. jessenii* UOM 14, *P. zhaodongensis* UOM 15, *P. avellanae* UOM 16 соответственно. * – максимальная концентрация, при которой еще возможен рост бактерий.

нады (исключение *P. jessenii* UOM 14) проявляли одинаковую устойчивость к ионам этих металлов (не более 4–5 ммоль/л) (табл. 2).

Бактерии *P. silesiensis* UOM 9 и *P. avellanae* UOM 16 не продуцировали ферменты из тестируемого набора, *P. zhaodongensis* UOM 15 образовывал липазу, амилазу и целлюлазу. Большинство штаммов (5 из 7) обладали липазной активностью (табл. 2).

Все микроорганизмы продемонстрировали хорошие показатели роста на среде Эшби, не содержащей азота и были способны к растворению фосфата кальция, но в разной степени. *P. alcaligenes* UOM 10 и *P. zhaodongensis* UOM 15 обладали низким потенциалом солиubilизации (SI меньше 2), *P. frederiksbergensis* UOM 11 – высоким (SI больше 3), остальные бактерии имели средний потенциал (SI 2–3) (табл. 2). Кроме того, исследуемые штаммы синтезировали ИУК от 305 (*P. arsenicoxydans* UOM 13) до 1627 нг/мл культуральной жидкости (*P. alcaligenes* UOM 10) (табл. 2).

Всхожесть семян ячменя независимо от варианта опыта на чистой почве составляла 100 %. Обработка штаммами *P. alcaligenes* UOM 10, *P. zhaodongensis* UOM 15 и *P. avellanae* UOM 16 приводила к удлинению побегов на 12,1–21,9 %, а использование *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. jessenii* UOM 14, *P. zhaodongensis* UOM 15 и *P. avellanae* UOM 16 увеличивало суммарную длину корней на 26,4–49,4 % (рис. 2). Всхожесть семян клевера в контроле составила 72 %. Бактеризация всеми штаммами увеличивала ее до 77–86 % и способствовала росту побегов и корней проростков на 19,9–34,0 и 23,5–48,0 % (рис. 3).

Всхожесть семян на нефтезагрязненной почве в целом осталась такой же, как и на чистой почве, хотя нефть оказывала заметное негативное воздействие на развитие обоих растений. Длина корней и побегов ячменя

в контроле уменьшилась на 34,6 и 45,1 %, клевера – на 27,5 и 33,3 % соответственно (рис. 2, 3). Соотношение корень/побег у обоих растений выросло по сравнению с этим же показателем на чистой почве (табл. 3). Под влиянием бактериализации растения смогли компенсировать отставание в росте корней и частично побегов. Корни инокулированных растений ячменя на нефтезагрязненной почве были сопоставимы по длине с корнями контрольных растений на чистой почве. В присутствии нефти длина корней проростков клевера при интродукции штаммов *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. zhaodongensis* UOM 15 и *P. avellanae* UOM 16 была выше, чем в чистом контроле на 24,5–35,3 %. В нефтесодержащей почве инокулированные растения ячменя имели более длинные побеги, чем у необработанных растений в контроле (на 22,9–32,2 % при внесении штаммов *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. zhaodongensis* UOM 15 и *P. avellanae* UOM 16). В этих же условиях длина побегов клевера после инокуляции выросла на 18,1–26,6 %. Таким образом, использование бактерий положительно влияло на морфометрические показатели растений в чистой и нефтезагрязненной почве. Соотношение корень/побег при обработке бактериями увеличилось и на чистой и на загрязненной почве, но максимальные значения у обработанных растений зафиксированы на почве с нефтью (табл. 3).

Гербицид Тапир предназначен для уничтожения двудольных и злаковых сорняков в посевах бобовых растений. Он плохо поддается разложению и может накапливаться в почве, поэтому ростстимулирующую активность штаммов оценивали именно в его присутствии. Предварительно нами установлено, что ячмень был устойчив к воздействию данного препарата, поэтому в качестве тест-объекта использовали клевер. Всхожесть се-

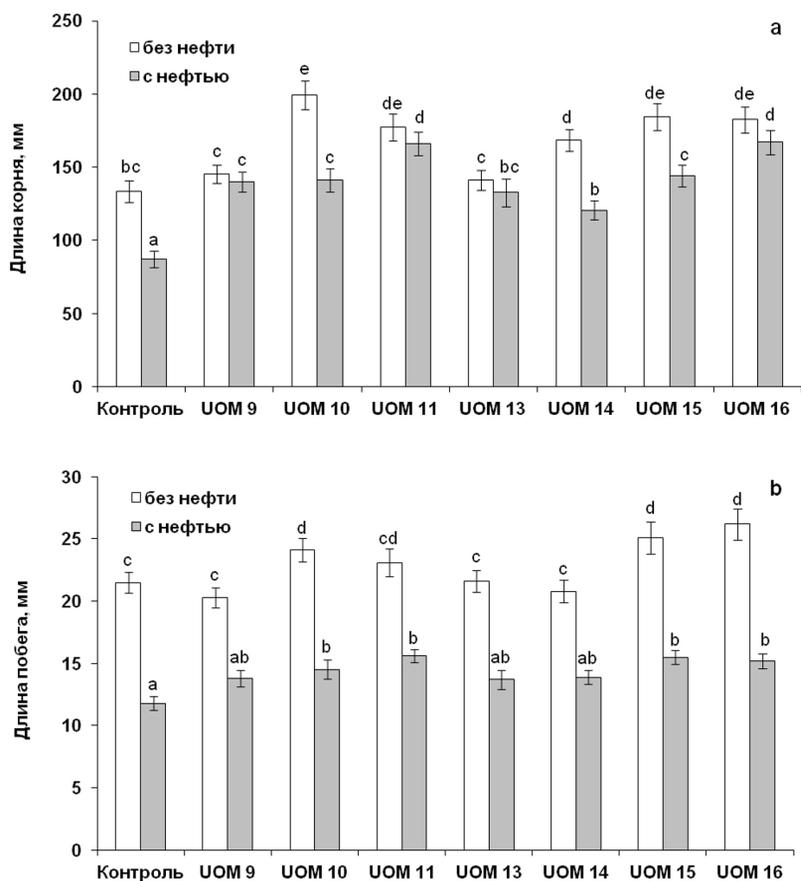


Рис. 2. Влияние бактериализации на длину корней (а) и побегов (б) растений ячменя. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами ($p \leq 0,05$). Обозначение штаммов как на рис. 1

Fig. 2. Effect of bacterization on the length of roots (a) and shoots (b) of barley plants. Statistically different means for each indicator are marked with different letters ($p \leq 0.05$). Designation of strains as in Fig. 1

мян и морфометрические показатели его проростков на почве, обработанной гербицидом, оказались значительно ниже, чем на чистой почве. Всхожесть уменьшилась с 72 до 52 %, длина корня и побега сократилась на 12,7 и 26,9 % соответственно (рис. 4). Отношение длины корня к длине побега увеличилось с 0,72 до 0,86 (табл. 3).

Бактеризация семян клевера перед их прорастиванием на почве с гербицидом улучшила все три анализируемых показателя. Всхожесть семян составила 76–84 %, а длина побегов выросла на 28,2–47,6 %. Длина корней также увеличилась, но достоверные

отличия от контроля (на 22,5–29,2 %) были установлены только в вариантах со штаммами *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11 и *P. avellanae* UOM 16. Отношение длины корня к длине побега у обработанных растений приблизилось к значению данного показателя на чистой почве и составило 0,69–0,78 (табл. 3).

Обсуждение

В мире накоплен большой научно-практический опыт ликвидации последствий нефтяного загрязнения (Lim et al., 2016). Однако учитывая важную роль углеводородно-

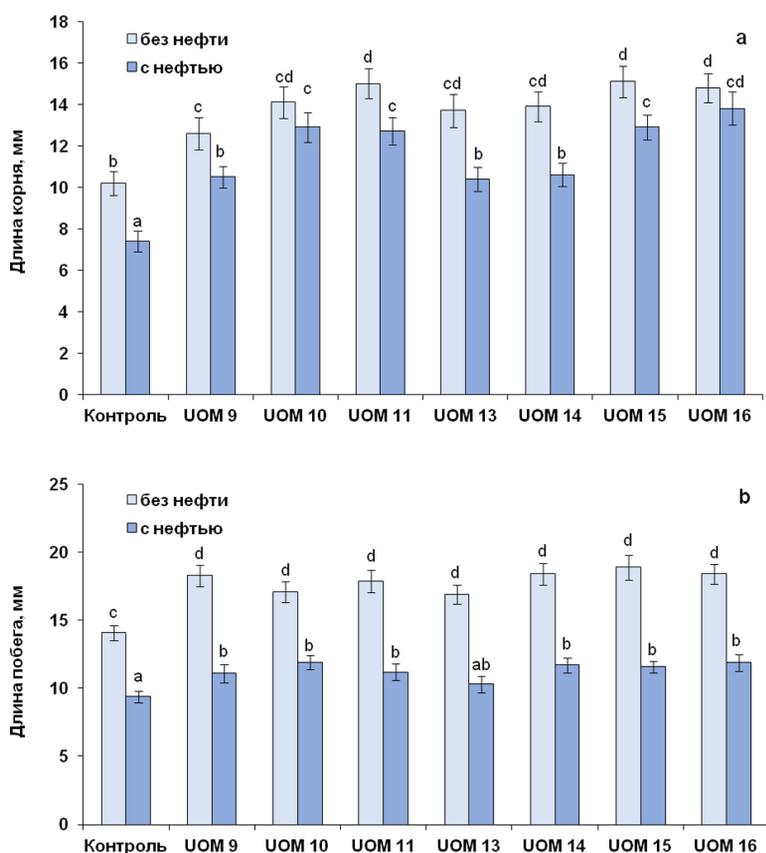


Рис. 3. Влияние бактеризации на длину корней (а) и побегов (б) растений клевера. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами ($p \leq 0,05$). Обозначение штаммов как на рис. 1

Fig. 3. Effect of bacterization on the length of roots (a) and shoots (b) in clover plants. Statistically different means for each indicator are marked with different letters ($p \leq 0.05$). Designation of strains as in Fig. 1

Таблица 3. Соотношение корень/побег у растений ячменя и клевера

Table 3. Root/shoot ratio in barley and clover plants

Растение	Почва	Вариант							
		Контроль	UOM 9	UOM 10	UOM 11	UOM 13	UOM 14	UOM 15	UOM 16
Ячмень	чистая	6,2	7,2	8,3	7,7	6,5	8,1	7,3	6,9
	с нефтью	7,4	10,1	9,7	10,7	9,7	8,7	9,3	11,0
Клевер	чистая	0,72	0,69	0,82	0,84	0,81	0,76	0,79	0,80
	с нефтью	0,79	0,95	1,08	1,13	1,01	0,91	1,11	1,16
	с гербицидом	0,86	0,75	0,78	0,77	0,75	0,72	0,69	0,76

Примечание. Обозначение штаммов как в табл. 1.

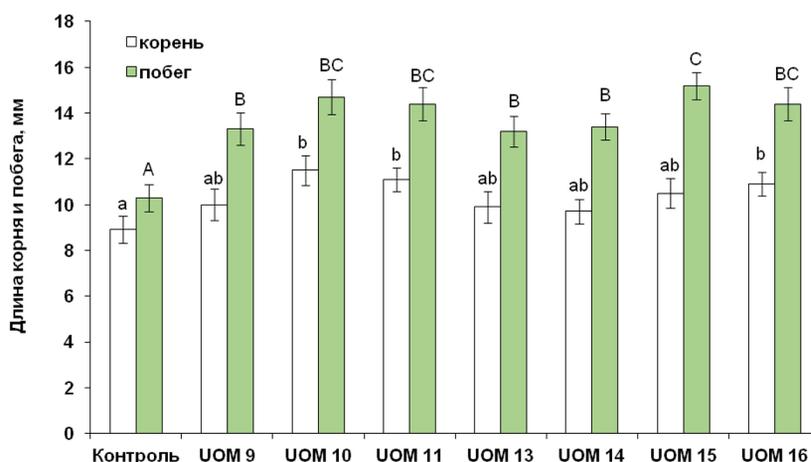


Рис. 4. Влияние бактериализации на длину корней и побегов растений клевера в присутствии гербицида. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами ($p \leq 0,05$). Обозначение штаммов как на рис. 1

Fig. 4. Effect of bacterization on the length of roots and shoots in clover plants in the presence of herbicide. Statistically different means for each indicator are marked with different letters ($p \leq 0.05$). Designation of strains as in Fig. 1

го сырья в мировой экономике, а также разнообразии почвенно-климатических условий и неодинаковость качественного и количественного состава нефти и нефтепродуктов, задача разработки и внедрения эффективных способов очистки и восстановления территорий, загрязненных углеводородами, по-прежнему очень актуальна. В настоящем исследовании были выделены и идентифицированы 7 штаммов углеводородокисляющих псевдомонад, которые проявили разную степень деструкции нефти (32,7–77,3 %) (рис. 1). Наиболее эффективными оказались *P. alcaligenes* UOM 10 и *P. frederiksbergensis* UOM 11. Они являются представителями видов, которые хорошо известны своей способностью к разложению нефти, нефтепродуктов и полициклических ароматических углеводородов (Gofar, 2013; Adeleye et al., 2018; Wang et al., 2020; Ruiz et al., 2021). Дополнительным преимуществом выделенных бактерий является наличие способности к синтезу липазы (табл. 2). Этот фермент может служить эффек-

тивным средством для разложения углеводородов (Bamitale, Ayomikun, 2020), а липазная активность микроорганизмов используется для мониторинга биодegradации нефти и нефтепродуктов в процессе биоремедиации (Margesin et al., 2007).

В настоящее время антропогенное загрязнение почв чаще всего имеет комплексный характер. Примером такого негативного воздействия может служить контаминация нефтью и пестицидами (Guo et al., 2016; Martínez et al., 2022). Она возникает при авариях на нефтепроводах, проходящих через сельскохозяйственные угодья, на которых применялись химические средства защиты растений. Наличие дополнительных поллютантов ингибирует жизнедеятельность автохтонной углеводородокисляющей микробиоты и приводит к снижению эффективности самоочищения нефтезагрязненной почвы (Dai et al., 2020). Поэтому для ее биорекультивации следует использовать микроорганизмы-нефтедеструкторы, устойчивые к присут-

ствию других загрязнителей. Все выделенные нами штаммы псевдомонад обладали одинаково высокой устойчивостью к гербицидам Октапон экстра, Тапир и Гермес, несмотря на то, что их действующие вещества относятся к разным классам химических соединений. Устойчивость к Чисталану и Фенизану была минимум в 2 раза ниже (табл. 2). В состав этих двух препаратов входит дополнительный компонент дикамба, который мог оказать негативное влияние на рост бактерий.

Кроме гербицидов, в нефтезагрязненных сельскохозяйственных почвах могут содержаться тяжелые металлы. Они накапливаются при разливах сырой нефти, а также при нарушении регламента применения пестицидов и удобрений (Masindi, Muedi, 2018) и обладают собственной токсичностью, в том числе по отношению к микроорганизмам (Etesami, 2018). На сегодняшний момент нет единого мнения о том, какая концентрация служит границей разделения штаммов на устойчивые и неустойчивые к воздействию тяжелых металлов. Например, было предложено, что псевдомонады, рост которых не ингибируется NiCl_2 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ в концентрации 1 ммоль/л, являются устойчивыми к воздействию никеля, цинка и свинца (Ceulan, Uğur, 2012). В работе (Zhang et al., 2016) бактерии рода *Pseudomonas*, изолированные из воды, содержащей соли металлов (оборотная охлаждающая вода металлургического завода), считали устойчивыми, если они росли в присутствии никеля, цинка и свинца в количестве 3,5–4,0, 2,5–3,0 и 2,5–3,0 ммоль/л соответственно. Выделенные в настоящем исследовании бактерии проявляли устойчивость к ионам свинца, цинка и никеля в количестве 4,0–5,0 ммоль/л (исключение *P. jessenii* UOM 14) (табл. 2). Эта особенность может служить дополнительным преимуществом штаммов при отборе агентов для биоремеди-

ации нефтезагрязненных сельскохозяйственных почв.

Для повышения эффективности очистки почв часто сочетают микробиологическую деструкцию и фиторемедиацию. Микроорганизмы, которые используют для этого, должны не только разрушать поллютанты, но и стимулировать рост растений, т.е. обладать PGP-свойствами (от англ. plant growth-promoting – стимулирование роста растений). Поэтому представлялось важным выяснить, относятся ли изучаемые углеводородокисляющие псевдомонады к группе PGPB (от англ. plant growth-promoting bacteria – бактерии, стимулирующие рост растений). В частности, могут ли они увеличивать для растений доступность азота и фосфора, которые являются ключевыми элементами в минеральном питании растений (Mäkelä et al., 2020). При этом содержащийся в почве фосфор практически недоступен растениям из-за плохой растворимости и образования комплексов с металлами (Ando et al., 2021). В связи с этим штаммы, обладающие азотфиксирующей и фосфатмобилизирующей активностью, имеют большое практическое значение для экологической и сельскохозяйственной биотехнологии. Изучаемые в данной работе бактерии имели потенциал для фиксации атмосферного азота. Они активно росли на среде, не содержащей азота, т.е. являются по меньшей мере олигонитрофилами. Кроме того, штаммы были способны к фосфатмобилизации. Особенно перспективным с этой точки зрения был штамм *P. frederiksborgensis* UOM 11, у которого был высокий индекс солиubilизации (3,2) (табл. 2), что характерно для многих представителей этого вида (Zeng et al., 2016).

Бактеризация положительно воздействовала на длину корней и побегов ячменя и клевера в чистой и нефтезагрязненной почве, а также

на рост и развитие проростков клевера в почве с гербицидом (рис. 2–4). Способность бактерий увеличивать ростовые показатели растений (длину корней, в частности) имеет очень большое значение при проведении биоремедиации с помощью микробно-растительных комплексов. Так как попадание углеводов в почву уменьшает влагоудерживающую способность и аэрируемость почвы, а также доступность элементов минерального питания (Devatha et al., 2019), то усиление роста подземной части является важной ответной реакцией растений на нефтяной стресс.

Как известно, продукция бактериями фитогормонов играет важную роль в их стимулирующем влиянии на растения (Kudoyarova et al., 2019). Ауксины являются основными регуляторами роста и развития растений, а ИУК (индолил-3-уксусная кислота) – наиболее распространенным индольным соединением этой группы. Все исследуемые штаммы синтезировали ИУК, но по ее содержанию в культуральной жидкости их можно разделить на две группы: микроорганизмы с низким уровнем продукции ИУК (*P. silesiensis* UOM 9 и *P. arsenicoxydans* UOM 13 и со средним (табл. 2). Видимо, именно количеством продуцируемой ИУК, которая в числе прочего усиливает рост подземной части растений (Kudoyarova et al., 2019), можно объяснить то, что исследуемые микроорганизмы в разной степени способствовали возрастанию длины корней у обоих растений в загрязненной почве (рис. 2а, 3а). Так, *P. silesiensis* UOM 9 и *P. arsenicoxydans* UOM 13, выделяющие меньше всего этого фитогормона (539 и 305 нг/мл), оказывали более слабое стимулирующее действие, чем остальные штаммы. Вместе с тем штаммы *P. alcaligenes* UOM 10 и *P. jessenii* UOM 14, образующие одинаковое количество ауксина (1627 и 1615 нг/мл), отличались друг от друга по способности усили-

вать рост растений. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что стимуляция роста растений обусловлена комплексным воздействием микроорганизмов, и высокая концентрация ИУК в культуральной жидкости не гарантирует наличие ростстимулирующего эффекта от бактериализации (Ali et al., 2009).

Соотношение корень/побег характеризует условия произрастания растений. Чем хуже обеспеченность растений питательными веществами и водой, тем это соотношение выше. На примере обоих растений видно, что при контаминации почвы нефтью и гербицидом оно увеличилось. Для ячменя в чистой и нефтезагрязненной почве оно составило 6,2 и 7,4 (табл. 3). При бактериализации соотношение корень/побег у растений ячменя на почве с нефтью оказалось больше, чем в варианте без инокуляции в 1,2–1,5 раза. Это свидетельствует о том, что под воздействием микроорганизмов растения на ранних этапах своего развития смогли сформировать более мощную корневую систему, которая в дальнейшем должна обеспечить активный рост надземной части.

При изучении растений клевера можно было сравнить, как интродукция бактерий влияет на их развитие в присутствии разных ксенобиотиков. Как и у ячменя, инокуляция клевера приводила к еще большему усилению корнеобразования в нефтесодержащей почве. Соотношение корень/побег увеличилось по сравнению с контролем тоже в 1,2–1,5 раза. Совершенно другая зависимость была обнаружена в почве, загрязненной гербицидом Тапир. Внесение микроорганизмов привело к уменьшению соотношения корень/побег по сравнению с необработанными растениями (0,86 на контроле и 0,69–0,78 в вариантах с применением псевдомонад) (табл. 3). Это значит, что бактеризованные растения успешно преодолели стресс и сохранили ро-

стовые показатели на уровне растений, развивавшихся на чистой почве.

Таким образом, предпосевная обработка семян способствовала лучшей адаптации растений к условиям абиотического стресса, вызванного разными поллютантами. Растения смогли практически полностью нивелировать последствия от наличия в почве гербицида, а негативное влияние нефти на ростовые характеристики было компенсировано частично. По всей видимости, это связано с тем, что для развития растений большим препятствием являлось не токсическое воздействие поллютантов, а наличие у нефти способности оказывать отрицательное влияние на физико-химические и структурные свойства почвы.

Заключение

В настоящем исследовании выделены и идентифицированы 7 штаммов углеводородокисляющих псевдомонад, устойчивых к гербицидам на основе различных действующих веществ (2,4-D, имазетапира, смеси

имазамокса и хизалофоп-П-этила). Все изученные бактерии обладали PGP-свойствами и в разной степени стимулировали рост корней и побегов ячменя и клевера в чистой и нефтезагрязненной почве, а также положительно влияли на проростки клевера в почве с гербицидом, тем самым помогая растениям преодолевать стресс, вызванный присутствием поллютантов. Наибольшим потенциалом в качестве основы микробно-растительных комплексов для биоремедиации нефтезагрязненных сельскохозяйственных почв обладал штамм *P. frederiksbergensis* UOM 11 благодаря наличию у него высокой способности к деградации нефти и стимуляции роста и развития растений. Однако остальные штаммы тоже имеют перспективы для использования в процессе очистки и восстановления почв: *P. alcaligenes* UOM 10 как нефтеструктор, а остальные бактерии – как PGPB. Полученные результаты можно будет использовать при разработке способов биоремедиации комплексно загрязненных почв.

Список литературы / References

Зубов Д. В., Толченев А. А. (2012) Экспресс-методика контроля активности ферментного комплекса. *Вестник Саратовского государственного технического университета*, 2: 389–392 [Zubov D. V., Tolchenov A. A. (2012) Rapid method for control activity of enzyme complex. *Bulletin of Saratov State Technical University* [Vestnik Saratovskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta], 2: 389–392 (in Russian)]

Коршунова Т. Ю., Четвериков С. П., Валиуллин Э. Г., Логинов О. Н. (2016) Биотехнологический потенциал бактерии *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1 как основы полифункционального биопрепарата. *Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология*, 6(1): 93–99 [Korshunova T. Yu., Chetverikov S. P., Valiullin E. G., Loginov O. N. (2016) Biotechnological potential of the bacterium *Pseudomonas* sp. IB-1.1 as bases of the multifunctional biological product. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology* [Izvestiya VUZov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya], 6(1): 93–99 (in Russian)]

Нетрусов А. И. (2005) *Практикум по микробиологии*. Москва, Академия, 608 с. [Netrusov A. I. (2005) *Practicals in microbiology*. Moscow, Akademiya, 608 p. (in Russian)]

Пиковская Р. И. (1948) Мобилизация фосфатов в почве в связи с жизнедеятельностью некоторых видов микробов. *Микробиология*, 17: 362–370 [Pikovskaya R. I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil due to microbial activity. *Microbiology* [Mikrobiologiya], 17: 362–370 (in Russian)]

Стариков С.Н., Четвериков С.П. (2020) Штамм *Enterobacter* sp. UOM-3 способен к синхронной деструкции галогенсодержащих гербицидов и синтезу индол-3-уксусной кислоты. *Экобиотех*, 3(4): 716–721 [Starikov S.N., Chetverikov S.P. (2020) Strain *Enterobacter* sp. UOM-3 is able to synchronous destruction of halogen-containing herbicides and synthesis of indol-3-acetic acid. *Ecobiotech* [Ekobiotekh], 3(4): 716–721 (in Russian)]

Adeleye A. O., Nkereuwem M. E., Omokhudu G. I., Amoo A. O., Shiaka G. P., Yerima M. B. (2018) Effect of microorganisms in the bioremediation of spent engine oil and petroleum related environmental pollution. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 22(2): 157–167

Ali B., Sabri A. N., Ljung K., Hasnain S. (2009) Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Letters in Applied Microbiology*, 48(5): 542–547

Ando K., Yamaguchi N., Nakamura Y., Kasuya M., Taki K. (2021) Speciation of phosphorus accumulated in fertilized cropland of Aichi prefecture in Japan with different soil properties by sequential chemical extraction and P K-edge XANES. *Soil Science and Plant Nutrition*, 67(2): 150–161

Bamitale O.M., Ayomikun A.M. (2020) Biodegradation potential of tropical hydrocarbon degrading *Providencia stuartii*. *Trends in Applied Sciences Research*, 15(3): 253–259

Borzenkov I.A., Milekhina E.I., Gotoeva M.T., Rozanova E.P., Belyaev S.S. (2006) The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, Western Siberia, and Vietnam. *Microbiology*, 75(1): 66–72

Ceylan Ö., Uğur A. (2012) Bio-monitoring of heavy metal resistance in *Pseudomonas* and *Pseudomonas* related genus. *Journal of Biological & Environmental Sciences*, 6(18): 233–242

Dai Y., Liu R., Zhou Y., Li N., Hou L., Ma Q., Gao B. (2020) Fire Phoenix facilitates phytoremediation of PAH-Cd co-contaminated soil through promotion of beneficial rhizosphere bacterial communities. *Environment International*, 136: 105421

Devatha C.P., Vishnu Vishal A., Purna Chandra Rao J. (2019) Investigation of physical and chemical characteristics on soil due to crude oil contamination and its remediation. *Applied Water Science*, 9: 89

Ebadi A., Khoshkholgh Sima N.A., Olamaee M., Hashemi M., Ghorbani Nasrabadi R. (2018) Remediation of saline soils contaminated with crude oil using the halophyte *Salicornia persica* in conjunction with hydrocarbon-degrading bacteria. *Journal of Environmental Management*, 219: 260–268

Ertekin O., Erol C., Unlu S., Yildizhan Y., Pelitli V., Yuksel B., Memon A. (2011) Aliphatic hydrocarbon fingerprints in *Trifolium* spp. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(2): 367–371

Etesami H. (2018) Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 175–191

Gofar N. (2013) Synergism of wild grass and hydrocarbonoclastic bacteria in petroleum biodegradation. *Journal of Tropical Soils*, 18(2): 161–168

Guo M., Gong Z., Allinson G., Tai P., Miao R., Li X., Jia C., Zhuang J. (2016) Variations in the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial and agricultural soils after bioremediation. *Chemosphere*, 144: 1513–1520

Gupta P.K. (2017) Herbicides and fungicides. *Reproductive and developmental toxicology*. Gupta R. C. (Ed.) Academic Press, p. 657–679

Islas-García A., Vega-Loyo L., Aguilar-López R., Xoconostle-Cázares B., Rodríguez-Vázquez R. (2015) Evaluation of hydrocarbons and organochlorine pesticides and their tolerant microorganisms from an agricultural soil to define its bioremediation feasibility. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(2): 99–108

Kahlon R.S. (2016) Biodegradation and bioremediation of organic chemical pollutants by *Pseudomonas*. *Pseudomonas: molecular and applied biology*. Kahlon R.S. (Ed.) Springer, Cham, Switzerland, p. 343–417

Karličić V.M., Radić D.S., Jovičić-Petrović J.P., Raičević V.B. (2020) Red clover and plant growth promoting bacteria: the combination that can speed up soil remediation rate. *Journal of Agricultural Sciences (Belgrade)*, 65(2): 163–174

Korshunova T. Yu., Bakaeva M.D., Kuzina E.V., Rafikova G.F., Chetverikov S.P., Chetverikova D.V., Loginov O.N. (2021) Role of bacteria of the genus *Pseudomonas* in the sustainable development of agricultural systems and environmental protection (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 57(3): 281–296

Korshunova T. Yu., Mukhamatdyarova S.R., Loginov O.N. (2015) Taxonomic classification of the oil destructing bacterium using mass spectrometry methods by the results of analysis of cellular proteins and study of cellular fatty acids. *Biology Bulletin*, 42(3): 220–225

Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T., Bakaeva M., Loginov O., Dodd I.C. (2019) Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1368

Kuzina E., Rafikova G., Vysotskaya L., Arkhipova T., Bakaeva M., Chetverikova D., Kudoyarova G., Korshunova T., Chetverikov S. (2021) Influence of hydrocarbon-oxidizing bacteria on the growth, biochemical characteristics, and hormonal status of barley plants and the content of petroleum hydrocarbons in the soil. *Plants*, 10(8): 1745

Lim M.W., Lau E.V., Poh P.E. (2016) A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil – present works and future directions. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1): 14–45

Lisboa P.H. G., de Andrade P.H. M., Machado P.C., de Sousa C.P., Lacava P.T. (2021) Isolation and in vitro screening of plant growth-promoting rhizobacteria from *Solanum lycocarpum* St. Hil., an endemic plant of the Brazilian tropical savannah. *African Journal of Microbiology Research*, 15(5): 253–261

Mahapatra K., De S., Banerjee S., Roy S. (2019) Pesticide mediated oxidative stress induces genotoxicity and disrupts chromatin structure in fenugreek (*Trigonella foenum – graecum* L.) seedlings. *Journal of Hazardous Materials*, 369: 362–374

Margesin R., Hämmerle M., Tschërko D. (2007) Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial Ecology*, 53(2): 259–269

Martínez B.C. S., Benavides L.M., Santoyo G., Sánchez-Yáñez J. M. (2022) Biorecovery of agricultural soil impacted by waste motor oil with *Phaseolus vulgaris* and *Xanthobacter autotrophicus*. *Plants*, 11(11): 1419

Masindi V., Muedi K.L. (2018) Environmental contamination by heavy metals. *Heavy Metals*. IntechOpen, London, p. 115–132

Meena R.S., Kumar S., Datta R., Lal R., Vijayakumar V., Brtnický M., Sharma M.P., Yadav G.S., Jhariya M.K., Jangir C.K., Pathan S.I., Dokulilova T., Pecina V., Marfo T.D. (2020) Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: a review. *Land*, 9(2): 34

- Michael-Igolima U., Abbey S. J., Ifelebuegu A. O. (2022) A systematic review on the effectiveness of remediation methods for oil contaminated soils. *Environmental Advances*, 9: 100319
- Mäkelä P. S. A., Wasonga D. O., Solano Hernandez A., Santanen A. (2020) Seedling growth and phosphorus uptake in response to different phosphorus sources. *Agronomy*, 10(8): 1089
- Raymond R. L. (1961) Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Developments in Industrial Microbiology*, 2: 23–32
- Rodea-Palomares I., Makowski M., Gonzalo S., González-Pleiter M., Leganés F., Fernández-Piñas F. (2015) Effect of PFOA/PFOS pre-exposure on the toxicity of the herbicides 2,4-D, Atrazine, Diuron and Paraquat to a model aquatic photosynthetic microorganism. *Chemosphere*, 139: 65–72
- Ruiz O. N., Radwan O., Striebich R. C. (2021) GC–MS hydrocarbon degradation profile data of *Pseudomonas frederiksbergensis* SI8, a bacterium capable of degrading aromatics at low temperatures. *Data in Brief*, 35: 106864
- Sawicka B., Vambol V., Krochmal-Marczak B., Messaoudi M., Skiba D., Pszczółkowski P., Barbaś P., Farhan A. K. (2022) Green technology as a way of cleaning the environment from petroleum substances in south-eastern Poland. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 14(4): 28
- Sharma S., Pathak H. (2014) *Pseudomonas* in biodegradation. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 2(1): 213–222
- Silva E. J., Silva I. A., Brasileiro P. P. F., Correa P. F., Almeida D. G., Rufino R. D., Luna J. M., Santos V. A., Sarubbo L. A. (2019) Treatment of oily effluent using a low-cost biosurfactant in a flotation system. *Biodegradation*, 30(4): 335–350
- Sui X., Wang X., Li Y., Ji H. (2021) Remediation of petroleum-contaminated soils with microbial and microbial combined methods: advances, mechanisms, and challenges. *Sustainability*, 13(16): 9267
- Sun S., Sidhu V., Rong Y., Zheng Y. (2018) Pesticide pollution in agricultural soils and sustainable remediation methods: a review. *Current Pollution Reports*, 4(3): 240–250
- Wang R., Wu B., Zheng J., Chen H., Rao P., Yan L., Chai F. (2020) Biodegradation of total petroleum hydrocarbons in soil: isolation and characterization of bacterial strains from oil contaminated soil. *Applied Sciences*, 10(12): 4173
- Weimer A., Kohlstedt M., Volke D. C., Nickel P. I., Wittmann C. (2020) Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(18): 7745–7766
- Wilson K. (2003) Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (Eds.) New York, Green Publishing Associates, p. 241–245
- Ye S., Zeng G., Wu H., Zhang C., Liang J., Dai J., Liu Z., Xiong W., Wan J., Xu P., Cheng M. (2017) Co-occurrence and interactions of pollutants, and their impacts on soil remediation – a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47(16): 1528–1553
- Zeng Q., Wu X., Wen X. (2016) Effects of soluble phosphate on phosphate-solubilizing characteristics and expression of *gcd* gene in *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD 2. *Current Microbiology*, 72(2): 198–206
- Zhang J.-K., Wang Z.-H., Ye Y. (2016) Heavy metal resistances and chromium removal of a novel Cr(VI)-reducing pseudomonad strain isolated from circulating cooling water of iron and steel plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(7): 1328–1344