

УДК 579.26 (581.6/504.054)

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РИЗОСФЕРНОЙ МИКРОФЛОРЫ
КУЛЬТИВАРОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА –
HELIANTHUS ANNUUS (ASTERACEAE, MAGNOLIOPSIDA),
ВЫРАЩЕННЫХ НА ПОЧВАХ
С ТЕХНОГЕННЫМИ ПОЛИЭЛЕМЕНТНЫМИ АНОМАЛИЯМИ**

**А. Ю. Муратова¹, Н. А. Зеленова², И. Ю. Сунгурцева¹,
С. В. Горелова³, А. П. Колбас⁴, Е. В. Плешакова^{2✉}**

¹ *Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Россия, 410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13
E-mail: muratova_a@ibpprt.ru*

² *Саратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н. Г. Чернышевского
Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83
✉E-mail: plekat@yandex.ru*

³ *Тульский государственный университет
Россия, 300012, Тула, просп. Ленина, 92*

⁴ *Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина
Республика Беларусь, 224016, Брест, бульвар Космонавтов, 21*

Поступила в редакцию 11.08.2020 г., после доработки 12.10.2020 г., принята 27.10.2020 г.

*Муратова А. Ю., Зеленова Н. А., Сунгурцева И. Ю., Горелова С. В., Колбас А. П., Плешакова Е. В. Сравнительное исследование ризосферной микрофлоры культиваров подсолнечника – *Helianthus annuus* (Asteraceae, Magnoliopsida), выращенных на почвах с техногенными полиэлементными аномалиями // Поволжский экологический журнал. 2020. № 4. С. 442 – 458. DOI: <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2020-4-442-458>*

Аннотация. В лабораторном вегетационном эксперименте на почвах с техногенными полиэлементными аномалиями и контрольной почве фоновой зоны были выращены два мутантных культивара подсолнечника (*Helianthus annuus* cv. r2p2 и *Helianthus annuus* cv. r5n1) и проведен сравнительный анализ их ризосферной микрофлоры. В ходе работы в ризосфере подсолнечников оценивали численность почвенных бактерий, актиномицетов и микромицетов, а также численность ризосферных микроорганизмов, устойчивых к ионам Zn^{2+} , Pb^{2+} и Cu^{2+} . Были установлены количественные изменения в ризосферных микробиоценозах металлтолерантных мутантных культиваров подсолнечника, формируемых под влиянием как сортового генотипа растения, так и техногенного загрязнения почвы. Обнаружена выраженная стимуляция численности ризосферных микроорганизмов всех исследованных групп при выращивании растений на техногенно загрязненной почве ПАО «Косогорский металлургический завод». При этом отмечены сортовые различия – в ризосфере *H. annuus* cv. r2p2 наблюдалась максимальная численность бактерий и актиномицетов, а в ризосфере *H. annuus* cv. r5n1 – микромицетов. Продемонстрирована повышенная численность микроорганизмов, устойчивых к ионам свинца, в ризосфере *H. annuus* cv. r2p2. Обнаруженные изменения в структуре ризосферных сообществ изученных сортов подсолнечника, связанные со стимуля-

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РИЗОСФЕРНОЙ МИКРОФЛОРЫ

цией роста и активности микрофлоры, могут быть востребованы в технологиях фиторемедиации техногенно загрязненной почвы.

Ключевые слова: техногенное загрязнение, тяжелые металлы, фиторемедиация, подсолнечник, ризосферные микроорганизмы.

DOI: <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2020-4-442-458>

ВВЕДЕНИЕ

Аккумуляция токсичных элементов в почве происходит в результате различных видов промышленной и антропогенной деятельности. Промышленные выбросы, осадки сточных вод, удобрения и добыча полезных ископаемых могут способствовать загрязнению почвы тяжелыми металлами (ТМ), которые снижают плодородие почв, поступают по цепям питания в живые организмы и вызывают в них ряд токсических эффектов (Mortvedt, 1996; Ashraf et al., 2010). Традиционные методы восстановления, такие как снятие верхнего горизонта почвы, укупорка и обработка почвы химическими реагентами, в основном очень дороги и могут нарушать естественные функции почвы (Singh, Prasad, 2011). В связи с этим существует потребность в разработке и использовании простых и экологичных способов очистки почвы, таких как фиторемедиация, при которой неорганические и органические загрязнители удаляются из окружающей среды с помощью растений. Для высокоэффективного использования фиторемедиационных технологий необходим подбор видового состава растений, которые оптимальным образом подходят для устранения данного типа загрязнения и соответствуют конкретным почвенно-климатическим условиям.

Подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus* L., 1753) давно исследуется как аккумулирующий ТМ фиторемедиант (Nehnevajova et al., 2009; Kolbas et al., 2011; Kötschau et al., 2014; Rizwan et al., 2016; Dhiman et al., 2017; Leff et al., 2017; Govarthanan et al., 2018; Mench et al., 2018). Известно, что эта культура не только толерантна к высоким концентрациям различных ТМ (Битюцкий, 1999), но и способна к их накоплению. Так, путем химического мутагенеза семян с использованием этилметасульфоната выведены мутантные культивары подсолнечника, способные аккумулировать в 3 – 7 раз больше Zn, в 3 – 5 раз – Cd, 3 – 8 раз – Pb, 3 – 7 раз – Cr, чем обычные сорта подсолнечника (Nehnevajova et al., 2009). Показана эффективность использования подсолнечника для фитоэкстракции загрязненных Cu почв (Kolbas et al., 2011; Mench et al., 2018). В литературе есть сведения о способности *H. annuus* к аккумуляции Zn в органах (Nehnevajova et al., 2009; Dhiman et al., 2017), а также к аккумуляции Pb и Cd (Alaboudi et al., 2018), Ni и, возможно, также U (Kötschau et al., 2014).

Одним из актуальных направлений в области исследований фиторемедиационного потенциала растений является изучение их ризосферы, представляющей собой уникальную нишу, насыщенную физическими, химическими и биологическими взаимодействиями макро- и микропартнеров как между собой, так и с окружающей средой. Ризосферная микрофлора *H. annuus* исследовалась в работе Zhang с соавт. (2017), в результате которой из четырех исследованных сортов под-

солнечника для улучшения качества солончаково-щелочной почвы был выбран тот, что улучшал функциональное разнообразие ризосферных почвенных микроорганизмов и оптимизировал структуру микробсообществ. Исследование структуры ризосферного микробного сообщества *H. annuus* позволило показать, что ризосфера способствует разложению полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) за счет увеличения биоразложения загрязняющих веществ, а также количества и разнообразия разлагающих ПАУ микроорганизмов (Tejeda-Agredano et al., 2013).

Несмотря на активные исследования в области ризосферной биологии, микроризосферы подсолнечников, выращенных в условиях антропогенного загрязнения, изучена недостаточно. Исследование ризосферной микрофлоры растений-фитореомедиантов, оценка изменений численности почвенных микроорганизмов в ризосфере под влиянием загрязнителей может найти применение для мониторинга эколого-функционального состояния почв. Выделение устойчивых к поллютантам штаммов микроорганизмов, близко ассоциированных с растениями, может послужить основой для создания биопрепаратов, обеспечивающих рост растений-фитореомедиантов и очистку загрязненной почвы.

Цель статьи – сравнительный анализ ризосферной микрофлоры двух мутантных культиваров подсолнечника *Helianthus annuus*, выращенных на почвах с техногенными полиэлементными аномалиями.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись образцы ризосферы двух металлтолерантных мутантных культиваров подсолнечника *Helianthus annuus* cv. r2p2 и *Helianthus annuus* cv. r5n1, выращенных в условиях лабораторного вегетационного эксперимента на техногенно загрязненных почвах санитарно-защитных зон предприятий черной металлургии (ПАО «Косогорский металлургический завод» – КМЗ и ПАО «Тулачермет» – Тулачермет), а также на почве селитебно-транспортной зоны – центральной улицы г. Тулы (просп. Ленина). В качестве контроля использовали почву фоновой зоны с территории музея-заповедника Л. Н. Толстого «Ясная Поляна», расположенного в 14 км к юго-западу от г. Тулы.

Серые лесные почвы, используемые для эксперимента, имели нейтральные или близкие к нейтральным значения pH, а также характеризовались значительным содержанием железа. В результате проведенных анализов в почвах выявлены полиэлементные аномалии. Согласно принципам профилно-генетической систематики почв и почвоподобных тел, разработанной М. Н. Строгановой с соавт. (1992, 1997), почвы опытных зон были отнесены к антропогенно-глубоко-преобразованным почвам (урбаноземам).

Для характеристики почвенных образцов проводили определение pH, содержания нефтепродуктов, общего органического и водорастворимого углерода, подвижного фосфора, доступных форм азота – нитратов и водорастворимого аммония. Получение почвенной вытяжки и определение кислотности почвы проводили согласно ГОСТ 26483-85 (1985) с использованием pH-метра Delta 320 (Metler Toledo, КНР). Определение содержания общего органического углерода в почве проводили согласно «Временным методическим рекомендациям по контролю загрязнения

почв» (1984). Содержание подвижного (доступного) фосфора определяли фотоколориметрическим методом по Чирикову (ОСТ 4641-76..., 1976). Определение нитратов и водорастворимого аммония в почве проводили стандартными фотоколориметрическими методами по ГОСТ 26489-85 (1985) и ГОСТ 26488-85 (1985). Определение нефтепродуктов проводили гравиметрическим методом (ПНД Ф 16.1:2.2.2.3.3.64-10 (2010)). Для определения содержания металлов и металлоидов проводился рентгеноспектральный анализ почвенных образцов в лаборатории химико-аналитических исследований Геологического института РАН (ГИН РАН) с использованием последовательного волнового XRF спектрометра S4 Pioneer (Bruker AXS GmbH, Германия). Обработка полученных результатов осуществлялась с помощью пакета программ «S4 Spectra Plus». В качестве образцов сравнения использовались стандартные образцы состава: СЧТ-1, СЧТ-2, IAEA Soil-7, GBW-07404, GBW-07405 (Чиркин, 2009).

Растения подсолнечника выращивали в 2-литровых закрытых пластиковых контейнерах в условиях лабораторного вегетационного опыта в течение полугода. Семена металлтолерантных мутантных культиваров подсолнечника, полученные из швейцарской лаборатории Phytotech Foundation (автор Rolf Herzig), предварительно калибровались, дефектные удалялись. Посев осуществлялся во влажную почву из расчета 25 семян на сосуд. Через 14 сут. после посева осуществляли прореживание всходов, оставляя по 10 растений на сосуд.

Культивирование растений проводили в лабораторных условиях: при температуре 20 – 25°C, со световым периодом 10 – 12 / 14 – 12 ч (день/ночь), интенсивности освещения 7 тыс. люкс. Полив культивированных растений осуществляли дистиллированной водой после пересыхания верхнего слоя земляного кома. Повторность опыта – трехкратная.

По окончании культивирования растения извлекали из сосудов, побеги отделяли от корней, взвешивали и высушивали до постоянного веса в сушильном шкафу при 70°C. Для приготовления почвенной суспензии корни отряхивали от почвы, образцы молодых корней с оставшейся прикрепленной ризосферной почвой использовали для микробиологического анализа. Предварительно взвешенные образцы корней с прикрепленной к ним ризосферной почвой общей массой 1.5 – 2 г помещали в 100 мл водопроводной воды в 0.25-литровые колбы Эрленмейера. Для получения почвенной суспензии колбы встряхивали на качалке при 160 об./мин в течение 1 ч, затем корни извлекали из воды и взвешивали для определения массы ризосферной почвы.

В настоящем исследовании в ризосферной почве исследуемых растений определяли численность почвенных микроорганизмов – бактерий, актиномицетов и микроскопических грибов (микромикетов). Отдельно проводили учет численности ризосферных микроорганизмов, устойчивых к ионам ТМ: Zn^{2+} , Pb^{2+} и Cu^{2+} . Учет численности гетеротрофных бактерий, актиномицетов и микромикетов в ризосферной почве проводили методом предельных разведений путем посева почвенных суспензий на агаризованные питательные и селективные среды в чашках Петри и подсчета выросших колоний через 7 сут. культивирования при температуре 29°C (Практикум по микробиологии..., 2005).

Для анализа общей численности гетеротрофных бактерий использовали питательную среду ГРМ-агар (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия) следующего состава, г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки – 12; пептон ферментативный – 12; NaCl – 6; агар микробиологический – 10 – 12. Для учета численности актиномицетов использовали крахмало-аммиачный агар следующего состава, г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1.0; NaCl – 1.0; CaCO_3 – 3.0; агар-агар – 20. Для учета численности микроскопических грибов использовали среду Мартина следующего состава, г/л: глюкоза – 10; KH_2PO_4 – 5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; пептон – 5; агар-агар – 20; водопроводная вода – 1 л; pH 5.5. Учет численности микроорганизмов, устойчивых к ионам Zn^{2+} , Pb^{2+} и Cu^{2+} , проводили на агаризованной среде LB следующего состава, г/л: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5. После стерилизации в среду добавляли водорастворимые соли ТМ: $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ или CuSO_4 до конечной концентрации по металлу 0.5 ммоль/л. Высевы на питательные и селективные среды производили из разведений 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} в нескольких повторностях. Все данные по численности микроорганизмов в почве были пересчитаны на воздушно-сухие образцы.

Устойчивость выделенных ризобактерий к присутствию в среде ионов ТМ оценивали по росту на агаризованной среде LB, содержащей возрастающие концентрации ионов двухвалентных металлов (сульфата цинка, сульфата меди или сульфата никеля): 0.2; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 4.0; 5.0 ммоль/л. Устойчивость микроорганизмов к ТМ характеризовали по величине минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и максимальной толерантной концентрации (МТК) металла в среде, при которой наблюдалось подавление роста микроорганизмов.

Обработку полученных данных осуществляли методами статистики, исходя из предварительной проверки выборок на нормальность распределения по критерию Колмогорова – Смирнова и их объема. Сравнение средних проводили с использованием теста Фишера и показателя наименьшей существенной разницы ($P \leq 0.05$) в однофакторном анализе дисперсии (ANOVA). Для обработки и анализа данных использовали пакет STATISTICA 13.0 (TIBCO Software Inc. 2017, Statsoft Russia).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основой для корректной интерпретации результатов микробиологического анализа служит исходная характеристика почв, для которых проводится определение микробных популяций.

Для всех почв, использованных в эксперименте, были определены: тип (на основе гранулометрического состава), кислотность (pH), содержание общего углерода (в том числе водорастворимого), биогенных форм азота (NH_4 и NO_3) и фосфора (P_2O_5), ТМ и металлоидов (Fe, Mn, V, Ni, Cu, Zn, Pb и As), а также углеводородов как возможных органических поллютантов. Результаты исследования почв представлены в табл. 1.

В почвах селитебно-транспортной и промышленных зон отмечалось значительное превышение ПДК по содержанию ТМ, а в некоторых образцах и нефте-

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РИЗОСФЕРНОЙ МИКРОФЛОРЫ

продуктов, что свидетельствовало о техногенном загрязнении почв. В почве КМЗ было обнаружено высокое содержание Fe (78100 мг/кг), превышение ПДК по Mn (в 3.8 раза) и Zn (на 41%). В почве Тулачермета отмечено очень высокое содержание Fe (120600 мг/кг), превышение ПДК (ОДК) по V – Mn (на 36% по V и на 10% по Mn), Ni (в 2.75 раз), Cu (на 36%), Zn (до 3 раз), As (на 28%) и нефтепродуктов (в 4 раза). В почве просп. Ленина обнаружено высокое содержание Fe (37400 мг/кг), превышение допустимых концентраций Mn (на 6 %) и Cu (в 2.8 раза).

Таблица 1. Характеристика почв, использованных в вегетационном эксперименте
Table 1. Characteristics of the soils used in our pot experiment

Показатели	Территории отбора образцов почв			
	Заповедник Ясная поляна (контроль)	ПАО «КМЗ»	ПАО «Тулачермет»	просп. Ленина
Тип почвы	Суглинок	Суглинок	Супесь	Суглинок
pH	6.20	7.26	7.35	7.29
Металлы, мг/кг:				
Mn	1300	5700	1100	1600
Fe	15600	78100	120600	37400
V	57	41/55	136	61
Ni	25	31	55	41
Cu	19	51	75	378
Zn	47	310	161	186
Pb	18	72	26	59
As	5	6	6.4	7.3
Нефтепродукты, г/кг	1.5±0.6	2.6±0.4	4.1±1.0	2.5±0.7
N-NO ₃ , мг/кг	20.5±1.2	28.2±1.6	38.6±3.5	41.1±2.4
N-NH ₄ , мг/кг	12.9±1.2	6.9±0.7	9.5±0.3	2.3±0.2
P ₂ O ₅ , мг/кг	51.0±4.8	159.5±3.6	98.4±7.6	218.0±6.7
Общ. углерод, % к воздушно сухой почве	4.87±0.05	4.41±0.11	4.84±0.33	3.83±0.06
Водорастворимый углерод, % к общему	0.14±0.05	0.13±0.02	0.14±0.06	0.12±0.03

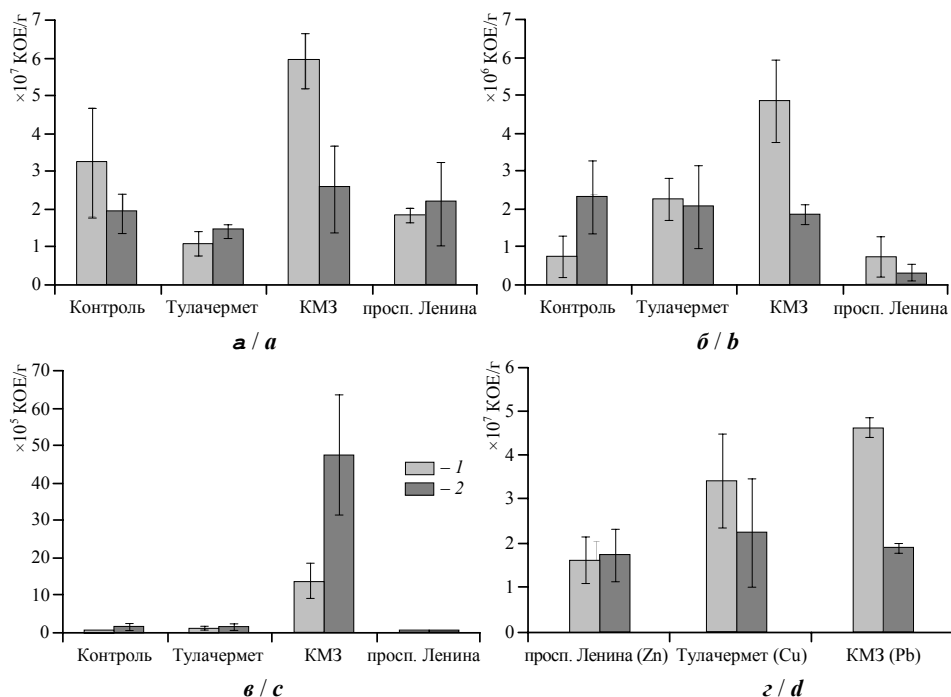
Примечание. ПДК и ОДК определяли по ГН 2.1.7.2041-06 (2006), ГН 2.1.7.2511-09 (2009), содержание нефтепродуктов по Ю. С. Другову, А. А. Родину (2017); полужирный шрифт – превышение нормативных показателей для Fe (ПДК_{вал} – 1500 мг/кг), Mn+V (ПДК 100+1000 мг/кг), Ni (ОДК_{вал, супесь} – 20 мг/кг), Cu (ПДК_{вал} – 55 мг/кг; ОДК_{вал, супесь} – 33 мг/кг), Zn (ОДК_{вал, суглинка нейтр} – 220 мг/кг; ОДК_{вал, супесь} – 55 мг/кг), As (ПДК_{вал} – 2 мг/кг; ОДК_{вал, супесь} – 2 мг/кг), нефтепродуктам (1000 мг/кг).

Note. Maximum permissible concentrations (MPC) and approximate permissible concentrations (APC) of metals were determined according to GN 2.1.7.2041-06 (2006), GN 2.1.7.2511-09 (2009), the oil product content was determined according to Yu. S. Drugov and A. A. Rodin (2017); bold type means exceeding the permissible concentrations for Fe (MPC_{total} – 1500 mg/kg), Mn+V (MPC 100+1000 mg/kg), Ni (APC_{total, sandy loam} – 20 mg/kg), Cu (MPC_{total} – 55 mg/kg; APC_{total, sandy loam} – 33 mg/kg), Zn (APC_{total, loamy loam} – 220 mg/kg; APC_{total, sandy loam} – 55 mg/kg), As (MPC_{total} – 2 mg/kg; APC_{total, sandy loam} – 2 mg / kg), petroleum products (1000 mg/kg).

Почва фоновой зоны (контроль) не имела аномалий по ПДК и ОДК экотоксикантов, за исключением железа, содержание которого было достаточно высоким по сравнению с мировыми значениями, но минимальным (15600 мг/кг) по сравнению с используемыми в данном исследовании урбаноэмами.

Таким образом, все выявленные превышения допустимых концентраций токсичных элементов и нефтепродуктов в исследуемых почвах могли быть факторами, влияющими на количественный и качественный состав почвенных микробных сообществ.

На рисунке представлены результаты анализа основных групп культивируемых гетеротрофных почвенных микроорганизмов – бактерий, актиномицетов и микромицетов в ризосфере двух сортов подсолнечника. Полученные результаты показали, что оба сорта подсолнечника поддерживали в своей ризосфере при культивировании в контрольной незагрязненной почве почти равное количество бактерий ($2 \times 10^7 - 3 \times 10^7$ КОЕ/г) (рисунок, а). Культивирование на урбаногемах не приводило к достоверным количественным изменениям в бактериальных популяциях в ризосфере подсолнечника *H. annuus* cv. r5n1, свидетельствуя о стабильности микробоценозов, несмотря на вероятное токсичное воздействие загрязнителей почвы.



Численность почвенных микроорганизмов в ризосфере подсолнечника сортов r2p2 (1) и r5n1 (2): а – бактерии; б – актиномицеты; в – микромицеты; г – микроорганизмы, устойчивые к металлам

Figure. Numbers of soil microorganisms in the rhizosphere of sunflower cultivars r2p2 (1) and r5n1 (2): а – bacteria; б – actinomycetes; в – micromycetes; г – microorganisms resistant to heavy metals

В ризосфере подсолнечника *H. annuus* cv. r2p2, напротив, наблюдались изменения: сокращение численности гетеротрофных бактерий при культивировании на почвах Тулачермета и просп. Ленина (на 66 и 43% соответственно) и увеличение численности гетеротрофных бактерий на 82% при культивировании на почве КМЗ. Наблюдаемые вариации в численности ризосферных бактерий при выращивании *H. annuus* cv. r2p2 на урбаноземах связаны со свойствами почв, характером и компонентами их загрязнения. Снижение численности ризосферных бактерий может происходить под действием повышенных концентраций ТМ, которые, как известно (Lenart-Boroń, Boroń, 2014), могут нарушать окислительно-восстановительные реакции, повреждать ферменты, изменять конформацию нуклеиновых кислот и белков, что приводит к образованию комплексов с белковыми молекулами, которые делают их неактивными. Известно, что на изменения в бактериальных популяциях может повлиять не только концентрации ТМ и срок их действия, но и синергическое действие комплекса ТМ (Колесников и др., 2010; Фокина и др., 2015). Устойчивость же бактериальной популяции к действию ТМ во многом зависит от свойств почвы, количества содержащегося в ней органического вещества и других биогенных элементов (Марфенина, 2005).

Надо также отметить, что при выращивании подсолнечников на почве КМЗ численность бактерий в ризосфере *H. annuus* cv. r2p2 была в 2.3 раза выше, чем в ризосфере *H. annuus* cv. r5n1 и в 1.8 раза выше, чем в контрольной незагрязненной почве.

ТМ оказывают влияние в большей степени на бактериальные сообщества почвы, способствуя увеличению или снижению общей численности микроорганизмов, видового разнообразия, смене доминирующих и соподчиненных видов (Колесников и др., 2008; Grishko, Syshchikova, 2009; Lenart-Boroń, Boroń, 2014; Shirokikh et al., 2014). Вместе с тем по литературным источникам ТМ оказывают негативное действие на состав и численность актиномицетов и грибов в почвенных сообществах (Hemida et al., 1997; Joyn et al., 2006; Terekhova et al., 2017).

На рисунке, б представлены результаты оценки численности актиномицетов в ризосфере подсолнечника. Установлено, что при выращивании растений на контрольной незагрязненной почве популяция актиномицетов в ризосфере *H. annuus* cv. r5n1 была в 3 раза больше, чем в ризосфере *H. annuus* cv. r2p2, не уменьшалась при культивировании этого сорта на техногенно загрязненных почвах Тулачермета и КМЗ, но сокращалась на 86% на почве просп. Ленина. Численность ризосферных актиномицетов увеличивалась при культивировании *H. annuus* cv. r2p2 на загрязненных почвах Тулачермет и КМЗ (в 3 и 6.5 раза соответственно) и не изменялась при культивировании на почве пр. Ленина. Аналогично данным, полученным при оценке численности ризосферных бактерий, при выращивании подсолнечников на почве КМЗ численность актиномицетов в ризосфере *H. annuus* cv. r2p2 была в 2.6 раза выше, чем в ризосфере *H. annuus* cv. r5n1 и в 6.5 раз выше, чем в контрольной незагрязненной почве.

Численность микромицетов в ризосфере обоих исследованных культиваров подсолнечника была минимальной по сравнению с численностью бактерий и актиномицетов и не превышала $10^4 - 10^5$ КОЕ/г в контрольной и в загрязненных поч-

вах Тулачермета и просп. Ленина (рисунок, в). Максимальная численность микромицетов обнаруживалась в ризосфере подсолнечника, выращенного на почве КМЗ (1.4×10^6 и 4.7×10^6 КОЕ/г для сортов r2p2 и r5n1 соответственно), причем, популяция микроскопических грибов в ризосфере *H. annuus* cv. r5n1 была в 3.5 раза выше, чем в ризосфере *H. annuus* cv. r2p2, и значительно выше, чем на контрольной незагрязненной почве. В отличие от динамики численности бактерий и актиномицетов численность микромицетов, наоборот, была выше в ризосфере *H. annuus* cv. r5n1.

Итак, проведенный эксперимент выявил различия мутантных культиваров подсолнечника в формировании ризосферных сообществ бактерий, актиномицетов и микромицетов. Эти различия зарегистрированы при выращивании растений на контрольной незагрязненной почве и особенно выражены при культивировании подсолнечника на техногенно загрязненной почве КМЗ (рисунок, а – в). Обнаруженные различия могут быть обусловлены как свойствами почв и уровнем их загрязнения, так и различиями в составе корневых экссудатов растений двух мутантных культиваров, имеющих приоритетное значение для формирования специфического ризосферного микробиома того или иного растения (Schlemper et al., 2017, 2018; Deng et al., 2020).

Как показали результаты исследований (рисунок, з), в ризосфере обоих исследованных сортов подсолнечника, выращенных в урбаногемах, наблюдалась высокая численность микроорганизмов, устойчивых к ионам Zn^{2+} , Cu^{2+} и Pb^{2+} (1.6×10^7 – 4.6×10^7 КОЕ/г). Сравнение численности ризосферных микроорганизмов, проявляющих устойчивость к свинцу, выявило достоверные сортовые различия между растениями подсолнечника, выращенными на почве КМЗ. Численность устойчивых к свинцу микроорганизмов в ризосфере *H. annuus* cv. r2p2 была в 2.4 раза выше, чем в ризосфере *H. annuus* r5n1.

При учете численности культивируемых гетеротрофных микроорганизмов, проявляющих устойчивость к присутствию в среде ТМ, были отобраны различные морфотипы колоний для получения чистых культур ризосферных изолятов и определения для них минимальной ингибирующей и максимальной толерантной концентраций металлов – загрязнителей почвенных образцов. Всего было получено 22 чистые культуры ризобактерий. Результаты определения МТК у штаммов, изолированных из корневой зоны растений, представлены в табл. 2.

Наибольшее количество устойчивых к ТМ ризобактерий было изолировано из образцов ризосферы *H. annuus* cv. r2p2, тогда как из ризосферы *H. annuus* cv. r5n1 было выделено почти в два раза меньше. Нужно отметить, что эти данные свидетельствуют лишь о большем или меньшем разнообразии устойчивых к металлам культивируемых бактерий в ризосфере того или иного растения, но не характеризуют устойчивость его ризосферной микрофлоры к ТМ.

Из данных, представленных в табл. 2, видно, что цинк характеризовался наибольшей токсичностью для выделенных ризобактерий. МТК цинка для большинства выделенных штаммов не превышала 1 – 1.5 ммоль/л. Лишь для одного штамма МТК по цинку составляла 5.0 ммоль/л и для четырех – 3.0 ммоль/л. Медь и никель оказывали меньший токсический эффект на исследуемые штаммы. Для большинства изолятов МТК меди и никеля составляла 3.0 ммоль/л. Один изолят (из

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РИЗОСФЕРНОЙ МИКРОФЛОРЫ

ризосферы *H. annuus* cv. r2p2) проявлял устойчивость к 5.0 ммоль/л меди, и три изолята – к 5.0 ммоль/л никеля.

Таблица 2. Число ризосферных изолятов, проявивших устойчивость к различным концентрациям тяжелых металлов в среде культивирования

Table 2. Number of rhizospheric isolates resistant to various concentrations of heavy metals in the cultivation medium

Растение	Концентрация металла, ммоль/л										Всего
	0.2	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0		
Zn											
<i>H. annuus</i> cv. r2p2	1	4	2	2	–	4	–	–	1	14	
<i>H. annuus</i> cv. r5n1	–	2	3	2	1	–	–	–	–	8	
Cu											
<i>H. annuus</i> cv. r2p2	–	–	2	1	1	–	5	7	1	17	
<i>H. annuus</i> cv. r5n1	–	–	–	1	1	–	2	3	–	7	
Ni											
<i>H. annuus</i> cv. r2p2	–	–	–	–	4	3	4	3	1	15	
<i>H. annuus</i> cv. r5n1	–	–	–	–	2	–	5	–	2	9	

Из штаммов, проявивших максимальную устойчивость к исследованным металлам, была сформирована коллекция ризобактерий для дальнейших исследований у них стимулирующего рост растений потенциала. Все отобранные штаммы микроорганизмов законсервированы для хранения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного лабораторного вегетационного эксперимента были выявлены количественные изменения в ризосферных микробных сообществах мутантных культиваров подсолнечника, формируемых под влиянием как сортового генотипа растения, так и техногенного загрязнения почвы. Особенностью подсолнечников стала выраженная стимуляция численности почвенных микроорганизмов всех групп при выращивании растений на техногенно загрязненной почве КМЗ. При этом в ризосфере *H. annuus* cv. r2p2 наблюдалась максимальная численность бактерий и актиномицетов, а в ризосфере *H. annuus* cv. r5n1 – микромицетов. Эти наблюдения дают основание предполагать, что исследованные сорта подсолнечника, эффективно стимулируя рост и активность микрофлоры техногенно загрязненной почвы, могут обеспечивать ее рекультивацию и очистку.

Сорт подсолнечника r2p2 характеризовался большей численностью микроорганизмов, устойчивых к ионам свинца, поэтому он может быть востребован при проведении фиторемедиации почв с повышенной концентрацией свинца.

Более подробное изучение устойчивости выделенных в ходе настоящих исследований бактериальных штаммов к металлам, а также выявление у них признаков, характерных для стимулирующих рост растений ризобактерий, позволит подобрать перспективный инокулянт для улучшения роста растений подсолнечника на загрязненной почве для повышения эффективности фиторемедиации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-29-05257 «Техногенное загрязнение почв токсичными элементами и возможные методы его устранения»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Битюцкий Н. П. Микроэлементы и растения. СПб. : Изд-во С.-Петерб. ун-та, 1999. 230 с.
- Временные методические рекомендации по контролю загрязнения почв : в 2 ч. / под ред. С. Г. Малахова. М. : Гидрометеоиздат, 1984. Ч. 2. 61 с.
- ГН 2.1.7.2041-06. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве : Гигиенические нормативы / Фед. центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. М., 2006. 15 с.
- ГН 2.1.7.2511-09. Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве : Гигиенические нормативы / Фед. центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. М., 2009. 10 с.
- ГОСТ 26483-85. Почвы. Приготовление солевой вытяжки и определение ее pH по методу ЦИНАО. М. : Изд-во стандартов, 1985. 5 с.
- ГОСТ 26488-85. Почвы. Определение нитратов по методу ЦИНАО. М. : Изд-во стандартов, 1985. 7 с.
- ГОСТ 26489-85. Почвы. Определение обменного аммония по методу ЦИНАО. М. : Изд-во стандартов, 1985. 8 с.
- Другов Ю. С., Родио А. А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов : практическое руководство. М. : БИНОМ, 2017. 270 с.
- Колесников С. И., Пономарева С. В., Казеев К. Ш., Вальков В. Ф. Ранжирование химических элементов по степени их экологической опасности для почвы // Докл. РАСХН. 2010. № 1. С. 27 – 29.
- Колесников С. И., Попович А. А., Казеев К. Ш., Вальков В. Ф. Влияние загрязнения фтором, бором, селеном, мышьяком на биологические свойства чернозема обыкновенного // Почвоведение. 2008. № 4. С. 448 – 453.
- Марфенина О. Е. Антропогенная экология почвенных грибов. М. : Медицина для всех, 2005. 196 с.
- ОСТ 4641-76. Методы агрохимических анализов почв. Определение подвижных форм фосфора и калия в почвах по методу Чирикова в модификации ЦИНАО. М., 1976. 14 с.
- ПНД Ф 16.1:2.2.2.2.3:3.64-10. Методика измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв, грунтов, донных отложений, илов, осадков сточных вод, отходов производства и потребления гравиметрическим методом / Фед. центр анализа и оценки техногенного воздействия. М., 2010. 18 с.
- Строганова М. Н., Агаркова М. Г. Городские почвы : опыт изучения и систематики // Почвоведение. 1992. № 7. С. 16 – 24.
- Строганова М. Н., Мяжова А. Д., Прокофьева Т. В. Роль почв в городских экосистемах // Почвоведение. 1997. № 1. С. 96 – 101.
- Практикум по микробиологии / под ред. А. И. Нетрусова. М. : Академия, 2005. 608 с.
- Фокина А. И., Ашихмина Т. Я., Домрачева Л. И., Горностаева Е. А. Тяжелые металлы как фактор изменения метаболизма у микроорганизмов (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 2. С. 5 – 17.
- Чиркин Л. А. Рентгенофлуоресцентный анализ объектов окружающей среды : учеб. пособие. Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2009. 57 с.
- Alaboudi K., Ahmeda B., Brodie G. Phytoremediation of Pb and Cd Contaminated Soils by Using Sunflower (*Helianthus annuus*) Plant // Annals of Agricultural Sciences. 2018. Vol. 63, iss. 1. P. 123 – 127. DOI: 10.1016/j.aos.2018.05.007

Ashraf M. Y., Ashraf M., Mehmood K., Akhtar J., Hussain F., Arshad M. Phytoremediation of Saline Soils for Sustainable Agricultural Productivity // Plant Adaptation and Phytoremediation / eds. M. Ashraf, M. Ozturk, M. S. A. Ahmad. Dordrecht : Springer, 2010. P. 335 – 355. DOI: 10.1007/978-90-481-9370-7_15

Deng S., Caddell D., Yang J., Dahlen L., Washington L., Coleman-Derr D. Genome Wide Association Study Reveals Plant Loci Controlling Heritability of the Rhizosphere Microbiome // BioRxiv. 2020. P. 1 – 24. DOI: 10.1101/2020.02.21.960377

Dhiman S. S., Zhao X., Li J., Kim D., Kalia V. C., Kim I.-W., Kim J. Y., Lee J.-K. Metal Accumulation by Sunflower (*Helianthus annuus* L.) and the Efficacy of its Biomass in Enzymatic Saccharification // PLoS ONE. 2017. Vol. 12. P. e0175845. DOI: 10.1371/journal.pone.0175845

Govarthanan M., Mythili R., Selvankumar T., Kamala-Kannan S., Kim H. Myco-phytoremediation of Arsenic- and Lead-contaminated Soils by *Helianthus annuus* and Wood Rot Fungi, *Trichoderma* sp. Isolated from Decayed Wood // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018. Vol. 151. P. 279 – 284. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.01.020

Grishko V. N., Syschikova O. V. Streptomyces Communities in Soils Polluted With Heavy Metals // Eurasian Soil Science. 2009. Vol. 42, № 2. P. 217 – 224. DOI: 10.1134/S1064229309020136

Hemida S. K., Omar S. A., Abdel-Mallek A. Y. Microbial Populations and Enzyme Activity in Soil Treated With Heavy Metals // Water, Air, Soil Pollution. 1997. Vol. 95, № 1 – 4. P. 13 – 22.

Joynt J., Bischoff M., Turco R., Konopka A., Nakatsu C. H. Microbial Community Analysis of Soils Contaminated With Lead, Chromium and Petroleum Hydrocarbons // Microbial Ecology. 2006. Vol. 51, № 2. P. 209 – 219.

Kolbas A., Mench M., Herzig R., Nehnevajova E., Bes C. M. Copper Phytoextraction in Tandem With Oilseed Production Using Commercial Cultivars and Mutant Lines of Sunflower // International J. of Phytoremediation. 2011. Vol. 13. P. 55 – 76. DOI: 10.1080/15226514.2011.568536

Kötschau A., Büchel G., Einax J. W., von Tümpling W., Merten D. Sunflower (*Helianthus annuus*) : Phytoextraction Capacity for Heavy Metals on a Mining-influenced Area in Thuringia, Germany // Environmental Earth Sciences. 2014. Vol. 72, iss. 6. P. 2023 – 2031. DOI: 10.1007/s12665-014-3111-2

Leff J. W., Lynch R. C., Kane N. C., Fierer N. Plant Domestication and the Assembly of Bacterial and Fungal Communities Associated With Strains of the Common Sunflower, *Helianthus annuus* // New Phytologist. 2017. Vol. 214. P. 412 – 423. DOI: 10.1111/nph.14323

Lenart-Boroń A., Boroń P. The Effect of Industrial Heavy Metal Pollution on Microbial Abundance and Diversity in Soils – A Review // Environmental Risk Assessment of Soil Contamination Soil / ed. M. C. Hernandez-Soriano. Rijeka : InTech, 2014. P. 759 – 783. DOI: 10.5772/57406

Mench M., Dellise M., Bes C. M., Marchand L., Kolbas A., Le Coustumer Ph., Oustrière N. Phytomanagement and Remediation of Cu-contaminated Soils by High Yielding Crops at a Former Wood Preservation Site : Sunflower Biomass and Ionome // Frontiers in Ecology and Evolution. 2018. Vol. 6. Article 123. DOI: 10.3389/fevo.2018.00123

Mortvedt J. J. Heavy Metal Contaminants in Inorganic and Organic Fertilizers // Fertilizers and Environment / ed. C. Rodriguez-Barrueco. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1996. P. 5 – 11.

Nehnevajova E., Herzig R., Bourigault C'E., Bangerter S., Schwitzgubel J.-P. Stability of Enhanced Yield and Metal Uptake by Sunflower Mutants for Improved Phytoremediation // International J. of Phytoremediation. 2009. Vol. 11. P. 329 – 346. DOI: 10.1080/15226510802565394

Rizwan M., Ali S., Rizvi H., Rinklebe J., Tsang D. C. W., Meers E., Ok Y. S., Ishaque W. Phytomanagement of Heavy Metals in Contaminate Soils Using Sunflower – A Review // Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 2016. Vol. 46. P. 1498 – 1528. DOI: 10.1080/10643389.2016.1248199

Schlemper T. R., Leite M. F. A., Luccheta A. R., Shimels M., Bouwmeester H. J., van Veen J. A., Kuramae E. E. Rhizobacterial Community Structure Differences Among Sorghum Cultivars in

Different Growth Stages and Soils // FEMS Microbiology Ecology. 2017. Vol. 93, № 8. P. 1 – 11. DOI: 10.1093/femsec/fix096

Schlemper T. R., van Veen J. A., Kuramae E. E. Co-variation of Bacterial and Fungal Communities in Different Sorghum Cultivars and Growth Stages is Soil Dependent // Microbial Ecology. 2018. Vol. 76, iss. 1. P. 205 – 214. DOI: 10.1007/s00248-017-1108-6

Shirokikh I. G., Solov'eva E. S., Ashikhmina T. Y. Actinomycete Complexes in Soils of Industrial and Residential Zones in the City of Kirov // Eurasian Soil Science. 2014. Vol. 47, № 2. P. 89 – 95. DOI: 10.1134/S1064229313100062

Singh A., Prasad M. Reduction of Heavy Metal Load in Food Chain : Technology Assessment // Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 2011. Vol. 10, № 3. P. 199 – 214. DOI: 10.1007/s11157-011-9241-z

Tejeda-Agredano M. C., Gallego S., Vila J., Grifoll M., Ortega-Calvo J. J., Cantos M. Influence of the Sunflower Rhizosphere on the Biodegradation of PAHs in Soil // Soil Biology and Biochemistry. 2013. Vol. 57. P. 830 – 840. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.08.008

Terekhova V. A., Shitikov V. K., Ivanova A. E., Kydralieva K. A. Assessment of the Ecological Risk of Technogenic Soil Pollution on the Basis of the Statistical Distribution of the Occurrence of Micromycete Species // Russian J. Ecology. 2017. Vol. 48, № 5. P. 417 – 424. DOI: 10.1134/S1067413617050125

Zhang X., Ma M., Zhenzhen W.U., Zhang Z., Gao R., Shi L. Effects of *Helianthus annuus* Varieties on rhizosphere Soil Enzyme Activities and Microbial Community Functional Diversity of Saline-alkali Land in Xinjiang // Acta Ecologica Sinica. 2017. Vol. 37, iss. 5. P. 1659 – 1666. DOI: 10.5846/stxb201510172095

**Comparative Study of the Rhizospheric Microflora of Sunflower Cultivars
Helianthus annuus (Asteraceae, Magnoliopsida)
Grown on Soils with Anthropogenic Polyelemental Anomalies**

Anna Yu. Muratova¹, <https://orcid.org/0000-0003-1927-918X>; muratova_a@ibppm.ru
Nadezhda A. Zelenova², <https://orcid.org/0000-0002-8647-7517>; n.a.zelenova98@yandex.ru
Irina Yu. Sungurtseva¹, <https://orcid.org/0000-0001-5079-2657>; airinmind@yandex.ru
Svetlana V. Gorelova³, <https://orcid.org/0000-0003-4922-5684>; salix35@gmail.com
Alexander P. Kolbas⁴, <https://orcid.org/0000-0003-4722-2930>; kolbas77@mail.ru
Yekaterina V. Pleshakova^{2✉}, <https://orcid.org/0000-0003-3836-0258>; plekat@yandex.ru

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences
13 Prospect Entuziastov, Saratov 410049, Russia

² Saratov State University
83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

³ Tula State University
92 Prospect Lenina, Tula 300012, Russia

⁴ Brest State A. S. Pushkin University
21 Kosmonavtov Boulevard, Brest 224016, Republic of Belarus

Received 11 August 2020, revised 12 October 2020, accepted 27 October 2020

Muratova A. Yu., Zelenova N. A., Sungurtseva I. Yu., Gorelova S. V., Kolbas A. P., Pleshakova Y. V. Comparative Study of the Rhizospheric Microflora of Sunflower Cultivars *Helianthus annuus* (Asteraceae, Magnoliopsida) Grown on Soils with Anthropogenic Polyelemental Anomalies. *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2020, no. 4, pp. 442–458 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2020-4-442-458>

Abstract. In a laboratory pot experiment, two mutant cultivars of sunflower (*Helianthus annuus* cv. r2p2 and *Helianthus annuus* cv. r5n1) were grown on soils with anthropogenic polyelemental anomalies and on a background control soil, and a comparative analysis of their rhizospheric microflora was carried out. The numbers of soil bacteria, actinomycetes and micromycetes, as well as the numbers of rhizospheric microorganisms resistant to Zn²⁺, Pb²⁺, and Cu²⁺ ions were estimated in the rhizosphere of sunflower cultivars. Quantitative changes in the sunflower rhizospheric microbocenoses, formed under the influence of both the plant genotype and technogenic soil pollution, were revealed. A pronounced stimulation of the rhizospheric microorganisms of all groups studied was found when plants were cultivated on the technogenically contaminated soil from PJSC Kosogorsk Metallurgical Plant. In this case, cultivar differences were observed, namely: the maximal number of bacteria and actinomycetes was revealed in the rhizosphere of *H. annuus* cv. r2p2, whilst the maximal number of micromycetes was revealed in the rhizosphere of *H. annuus* cv. r5n1. An increased number of microorganisms resistant to lead ions was revealed in the rhizosphere of *H. annuus* cv. r2p2. The observed changes in the structure of rhizospheric microbial communities of the sunflower cultivars manifested in the stimulation of the growth and activity of soil microflora can be in demand for phytoremediation of technogenically contaminated soil.

Keywords: technogenic pollution, heavy metals, phytoremediation, sunflower, rhizospheric microorganisms.

DOI: <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2020-4-442-458>

Acknowledgments: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 19-29-05257 “Technogenic pollution of soils with toxic elements and possible methods of its elimination”).

REFERENCES

Bitjuckij N. P. *Mikroelementy i rasteniia* [Trace Elements and Plants]. Saint Petersburg, Izdatel'stvo Sankt-Peterburgskogo universiteta, 1999. 230 p. (in Russian).

Vremennye metodicheskie rekomendacii po kontrolju zagrjaznenija pochv. Pod red. S. G. Malahova [S. G. Malakhov, ed. Temporary Guidelines for the Control of Soil Pollution]. Moscow, Gidrometeoizdat Publ., 1984, part 2. 61 p. (in Russian).

GN 2.1.7.2041-06. *Predel'no dopustimye koncentracii (PDK) himicheskikh veshchestv v pochve: Gigienicheskie normativy* [GN 2.1.7.2041-06. Maximum Permissible Concentrations (MPC) of Chemicals in the Soil: Hygienic Standards]. Moscow, Federal'nyj centr gigeny i jepidemiologii Rospotrebnadzora Publ., 2006. 15 p. (in Russian).

GN 2.1.7.2511-09. *Orientirovochno dopustimye koncentracii (ODK) himicheskikh veshchestv v pochve: Gigienicheskie normativy* [GN 2.1.7.2511-09. Approximate permissible concentrations (APC) of chemicals in the soil: Hygienic standards]. Moscow, Federal'nyj centr gigeny i jepidemiologii Rospotrebnadzora Publ., 2009. 10 p. (in Russian).

GOST 26483-85. *Soils. Preparation of Salt Extract and Determination of its pH by CINAO Method*. Moscow, Izdatel'stvo standartov, 1985. 5 p. (in Russian).

GOST 26488-85. *Soils. Determination of Nitrates by CINAO Method*. Moscow, Izdatel'stvo standartov, 1985. 7 p. (in Russian).

GOST 26489-85. *Soils. Determination of Exchangeable Ammonium by CINAO Method*. Moscow, Izdatel'stvo standartov, 1985. 8 p. (in Russian).

Drugov Ju. S., Rodin A. A. *Ekologicheskie analizy pri razlivah nefiti i nefteproduktov, prakticheskoe rukovodstvo* [Environmental Analyzes for Oil and Oil Products Spills, a Practical Guide]. Moscow, BINOM Publ., 2017. 270 p. (in Russian).

Kolesnikov S. I., Ponomareva S. V., Kazeev K. Sh., Valkov V. F. Ranking of Chemical Elements According to the Degree of Their Ecological danger to the Soil. *Reports of the Russian Agricultural Academy of Sciences*, 2010, no. 1, pp. 27–29 (in Russian).

Kolesnikov S. I., Popovich A. A., Kazeev K. Sh., Val'kov V. F. The Influence of Fluorine, Boron, Selenium, and Arsenic Pollution on the Biological Properties of Ordinary Chernozems. *Eurasian Soil Science*, 2008, vol. 41, no. 4, pp. 400–404.

Marfenina O. E. *Antropogennaja jekologija pochvennyh gribov* [Anthropogenic Ecology of Soil Fungi]. Moscow, Medicina dlja vseh Publ., 2005. 196 p. (in Russian).

OST 4641-76. *Methods for Agrochemical Soil Analysis. Determination of Mobile Forms of Phosphorus and Potassium in Soils by Chirikov Method Modified by CINAO*. Moscow, 1976. 14 p. (in Russian).

PND F 16.1:2.2:2.3:3.64-10. *Metodika izmerenij massovoj doli nefteproduktov v probah pochv, gruntov, donnyh otlozhenij, ilov, osadkov stochnykh vod, othodov proizvodstva i potreblenija gravimetricheskim metodom* [PND F 16.1:2.2:2.3:3.64-10. Methods for Measuring the Mass Fraction of Petroleum Products in Samples of Soils, Grounds, Bottom Sediments, Silts, Sewage Sludge, Production and Consumption Waste by the Gravimetric Method]. Moscow, Federal'nyi tsentr analiza i otsenki tekhnogennogo vozdeistviia Publ., 2010. 18 p. (in Russian).

Stroganova M. N., Agarkova M. G. Urban Soils: Learning Experience and Systematics. *Eurasian Soil Science*, 1992, no. 7, pp. 16–24 (in Russian).

Stroganova M. N., Myagkova A. D., Prokof'eva T. V. The Role of Soils in Urban Ecosystems. *Eurasian Soil Science*, 1997, vol. 30, no. 1, pp. 82–86.

Praktikum po mikrobiologii. Pod red. A. I. Netrusova [A. I. Netrusov, ed. Workshop in Microbiology]. Moscow, Akademiya Publ., 2005. 608 p. (in Russian).

Fokina A. I., Ashikhmina T. Ya., Domracheva L. I., Gornostaeva E. A. Heavy Metals as a Factor of Metabolism Change in Microorganisms (Review). *Theoretical and Applied Ecology*, 2015, no. 2, pp. 5–17 (in Russian).

Chirkin L. A. *Rentgenofluorescentnyj analiz ob#ektov okruzhajushhej sredy: Uchebnoe posobie* [X-ray Fluorescence Analysis of Environmental Objects: Textbook. Allowance]. Vladimir, Izdatel'stvo Vladimirsogo gosudarstvennogo universiteta, 2009. 57 p. (in Russian).

Alaboudi K., Ahmeda B., Brodie G. Phytoremediation of Pb and Cd Contaminated Soils by Using Sunflower (*Helianthus annuus*) Plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 2018, vol. 63, iss. 1, pp. 123–127. DOI: 10.1016/j.aos.2018.05.007

Ashraf M. Y., Ashraf M., Mehmood K., Akhtar J., Hussain F., Arshad M. Phytoremediation of Saline Soils for Sustainable Agricultural Productivity. In: M. Ashraf, M. Ozturk, M. S. A. Ahmad, eds. *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Dordrecht, Springer, 2010, pp. 335–355. DOI: 10.1007/978-90-481-9370-7_15

Deng S., Caddell D., Yang J., Dahlen L., Washington L., Coleman-Derr D. Genome Wide Association Study Reveals Plant Loci Controlling Heritability of the Rhizosphere Microbiome. *BioRxiv*, 2020, pp. 1–24. DOI: 10.1101/2020.02.21.960377

Dhiman S. S., Zhao X., Li J., Kim D., Kalia V. C., Kim I.-W., Kim J. Y., Lee J.-K. Metal Accumulation by Sunflower (*Helianthus annuus* L.) and the Efficacy of its Biomass in Enzymatic Saccharification. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, pp. e0175845. DOI: 10.1371/journal.pone.0175845

Govarthanan M., Mythili R., Selvankumar T., Kamala-Kannan S., Kim H. Myco-phytoremediation of Arsenic- and Lead-contaminated Soils by *Helianthus annuus* and Wood Rot Fungi, *Trichoderma* sp. Isolated from Decayed Wood. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, vol. 151, pp. 279–284. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.01.020

Grishko V. N., Syshchikova O. V. Streptomyces Communities in Soils Polluted With Heavy Metals. *Eurasian Soil Science*, 2009, vol. 42, no. 2, pp. 217–224. DOI: 10.1134/S1064229309020136

Hemida S. K., Omar S. A., Abdel-Mallek A. Y. Microbial Populations and Enzyme Activity in Soil Treated With Heavy Metals. *Water, Air, Soil Pollution*, 1997, vol. 95, no. 1–4, pp. 13–22.

Joynt J., Bischoff M., Turco R., Konopka A., Nakatsu C. H. Microbial Community Analysis of Soils Contaminated With Lead, Chromium and Petroleum Hydrocarbons. *Microbial Ecology*, 2006, vol. 51, no. 2, pp. 209–219.

Kolbas A., Mench M., Herzog R., Nehnevajova E., Bes C. M. Copper Phytoextraction in Tandem With Oilseed Production Using Commercial Cultivars and Mutant Lines of Sunflower. *International J. of Phytoremediation*, 2011, vol. 13, pp. 55–76. DOI: 10.1080/15226514.2011.568536

Kötschau A., Büchel G., Einax J. W., von Tümpling W., Merten D. Sunflower (*Helianthus annuus*): Phytoextraction Capacity for Heavy Metals on a Mining-influenced Area in Thuringia, Germany. *Environmental Earth Sciences*, 2014, vol. 72, iss. 6, pp. 2023–2031. DOI: 10.1007/s12665-014-3111-2

Leff J. W., Lynch R. C., Kane N. C., Fierer N. Plant Domestication and the Assembly of Bacterial and Fungal Communities Associated With Strains of the Common Sunflower, *Helianthus annuus*. *New Phytologist*, 2017, vol. 214, pp. 412–423. DOI: 10.1111/nph.14323

Lenart-Boroń A., Boroń P. The Effect of Industrial Heavy Metal Pollution on Microbial Abundance and Diversity in Soils – A Review. In: M. C. Hernandez-Soriano, ed. *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination Soil*. Rijeka, InTech, 2014, pp. 759–783. DOI: 10.5772/57406

Mench M., Dellisse M., Bes C. M., Marchand L., Kolbas A., Le Coustumer Ph., Oustrière N. Phytomanagement and Remediation of Cu-contaminated Soils by High Yielding Crops at a Former Wood Preservation Site: Sunflower Biomass and Ionome. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2018, vol. 6, Article 123. DOI: 10.3389/fevo.2018.00123

Mortvedt J. J. Heavy Metal Contaminants in Inorganic and Organic Fertilizers. In: C. Rodriguez-Barrueco, ed. *Fertilizers and Environment*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1996, pp. 5–11.

Nehnevajova E., Herzig R., Bourigault C'E., Bangerter S., Schwitzguebel J.-P. Stability of Enhanced Yield and Metal Uptake by Sunflower Mutants for Improved Phytoremediation. *International J. of Phytoremediation*, 2009, vol. 11, pp. 329–346. DOI: 10.1080/15226510802565394

Rizwan M., Ali S., Rizvi H., Rinklebe J., Tsang D. C. W., Meers E., Ok Y. S., Ishaque W. Phytomanagement of Heavy Metals in Contaminate Soils Using Sunflower – A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2016, vol. 46, pp. 1498–1528. DOI: 10.1080/10643389.2016.1248199

Schlemper T. R., Leite M. F. A., Luccheta A. R., Shimels M., Bouwmeester H. J., van Veen J. A., Kuramae E. E. Rhizobacterial Community Structure Differences Among Sorghum Cultivars in Different Growth Stages and Soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, vol. 93, no. 8, pp. 1–11. DOI: 10.1093/femsec/fix096

Schlemper T. R., van Veen J. A., Kuramae E. E. Co-variation of Bacterial and Fungal Communities in Different Sorghum Cultivars and Growth Stages is Soil Dependent. *Microbial Ecology*, 2018, vol. 76, iss. 1, pp. 205–214. DOI: 10.1007/s00248-017-1108-6

Shirokikh I. G., Solov'eva E. S., Ashikhmina T. Y. Actinomycete Complexes in Soils of Industrial and Residential Zones in the City of Kirov. *Eurasian Soil Science*, 2014, vol. 47, no. 2, pp. 89–95. DOI: 10.1134/S1064229313100062

Singh A., Prasad M. Reduction of Heavy Metal Load in Food Chain: Technology Assessment. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2011, vol. 10, no. 3, pp. 199–214. DOI: 10.1007/s11157-011-9241-z

Tejeda-Agredano M. C., Gallego S., Vila J., Grifoll M., Ortega-Calvo J. J., Cantos M. Influence of the Sunflower Rhizosphere on the Biodegradation of PAHs in Soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, vol. 57, pp. 830–840. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.08.008

Terekhova V. A., Shitikov V. K., Ivanova A. E., Kydraliev K. A. Assessment of the Ecological Risk of Technogenic Soil Pollution on the Basis of the Statistical Distribution of the Occurrence of Micromycete Species. *Russian J. Ecology*, 2017, vol. 48, no. 5, pp. 417–424. DOI: 10.1134/S1067413617050125

Zhang X., Ma M., Zhenzhen W.U., Zhang Z., Gao R., Shi L. Effects of *Helianthus annuus* Varieties on rhizosphere Soil Enzyme Activities and Microbial Community Functional Diversity of Saline-alkali Land in Xinjiang. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, vol. 37, iss. 5, pp. 1659–1666. DOI: 10.5846/stxb201510172095