

Оригинальная статья

УДК 579.69:622

<https://doi.org/10.35885/1684-7318-2024-4-385-398>

***PSEUDOMONAS FLUORESCENS*, *BACILLUS MEGATERIUM* И *PSEUDOMONAS PUTIDA* В ВОССТАНОВЛЕНИИ ТЕХНОГЕННО НАРУШЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ КУЗБАССА**

**Л. К. Асякина, Е. Е. Бородина ✉, Н. В. Фотина,
О. А. Неверова, И. С. Милентьева**

*Кемеровский государственный университет
Россия, 650000, г. Кемерово, ул. Красная, д. 6*

Поступила в редакцию 22.09.2023 г., после доработки 31.01.2024 г., принята 04.02.2024 г., опубликована 17.12.2024 г.

Аннотация. Кузбасс – крупнейший регион, специализирующийся на добыче полезных ископаемых. Большинство горных разработок в регионе производится открытым методом, который является наиболее безопасным и эффективным, однако способствует образованию значительного количества техногенно нарушенных почв. Для формирования плодородного слоя почв и растительного покрова рационально совместное использование микроорганизмов в совокупности с растениями. Известно, что микроорганизмы способны интенсифицировать рост растений за счет улучшения их питания, синтеза ростостимулирующих веществ, защиты от фитопатогенов. При этом наибольшие ростостимулирующие свойства отмечены для представителей рода *Pseudomonas* и *Bacillus*. В свою очередь, некоторые растения, в частности житняк гребневидный (*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.), формируют устойчивый травостой и участвуют в образовании поверхностного горизонта почв (дернины). Цель исследования: изучить перспективы совместного использования *Pseudomonas fluorescens* B-4252, *Bacillus megaterium* B-3778, *Pseudomonas putida* B-2950 и житняка гребневидного для повышения плодородия и формирования устойчивого растительного покрова на техногенно нарушенных почвах Кузбасса. Установлено, что изучаемые штаммы способны продуцировать синильную кислоту, фитогормоны, а также осуществлять солонбализацию фосфора и фиксацию азота. При этом штаммы и консорциумы на их основе улучшают рост житняка в лабораторных условиях. Обработка семян данными микроорганизмами способствует повышению всхожести и скорости роста житняка. Так, всхожесть семян при обработке консорциумом № 2 составила 94%, что на 12% больше по сравнению с контролем (без обработки). Средняя длина ростков при данном варианте обработки составила 56 мм, что превышает контрольные показатели на 43%. За счет описанных качеств консорциум может стать эффективным агентом, ускоряющим восстановление техноземов Кузбасса.

Ключевые слова: техноземы, ризобактерии, *Pseudomonas*, *Bacillus*, отвалы, плодородие

✉ Для корреспонденции. Лаборатория фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем Кемеровского государственного университета.

ORCID и e-mail адреса: Асякина Людмила Константиновна: <https://orcid.org/0000-0003-4988-8197>, alk_kem@mail.ru; Бородина Екатерина Евгеньевна: <https://orcid.org/0000-0001-6362-7589>, kborodina1908@gmail.com; Фотина Наталья Вячеславовна: <https://orcid.org/0000-0002-7655-0258>, fotina.natashenka@mail.ru; Неверова Ольга Александровна: <https://orcid.org/0000-0002-0309-5709>, neverova@kemsu.ru; Милентьева Ирина Сергеевна: <https://orcid.org/0000-0002-3536-562X>, irazumnikova@mail.ru.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Распоряжения Правительства Российской Федерации от 11.05.2022 г. № 1144-р, комплексной научно-технической программы полного инновационного цикла «Разработка и внедрение комплекса технологий в областях разведки и добычи твердых полезных ископаемых, обеспечения промышленной безопасности, биоремедиации, создания новых продуктов глубокой переработки из угольного сырья при последовательном снижении экологической нагрузки на окружающую среду и рисков для жизни населения» («Чистый уголь – зеленый Кузбасс»), мероприятие 3.1 «Экополигон мирового уровня технологий рекультивации и ремедиации». При поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-1200 от 28.09.2022 г.).

Соблюдение этических норм. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования. Асякина Л. К., Бородина Е. Е., Фотина Н. В., Неверова О. А., Миленьева И. С. *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus megaterium* и *Pseudomonas putida* в восстановлении техногенно нарушенных территорий Кузбасса // Поволжский экологический журнал. 2024. № 4. С. 385 – 398. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2024-4-385-398>

ВВЕДЕНИЕ

Проблема восстановления техногенно нарушенных почв и сохранения биологического разнообразия остро стоит в Кемеровской области – Кузбассе. В процессе угледобычи происходит перемещение значительного количества почв и загрязнение их токсичными элементами (Drozdova et al., 2021; Osintseva et al., 2022; Atuchin et al., 2023). В связи с этим темпы восстановления растительного покрова и биологического разнообразия на нарушенных территориях остаются низкими (Frolova et al., 2022; Mahar et al., 2016; Podurets, Osintseva, 2021; Kumar et al., 2023). В условиях интенсивной эксплуатации угольных месторождений особое значение приобретают исследования, направленные на разработку новых эффективных способов восстановления биологической продуктивности техногенно нарушенных почв.

Микробиота почвы выполняет основные функции на начальных этапах сукцессии и почвообразования (Ahirwal et al., 2017; Wang et al., 2021). Поэтому наиболее важным этапом рекультивации считается процесс восстановления микробного сообщества (Qi et al., 2023). Для интенсификации процесса формирования устойчивых микробно-растительных ассоциаций перспективно дополнительное внесение бактерий (в особенности обладающих ростостимулирующими свойствами) на этапе биологической рекультивации. Известно, что ризобактерии способны ускорять рост и развитие растений за счет различных механизмов, включая (Backer et al., 2018; Milentyeva et al., 2022; Asyakina et al., 2023a): повышение доступности и фиксацию биогенных элементов почвы; синтез ростостимулирующих веществ; антагонистическое действие в отношении фитопатогенов.

Согласно литературным данным, наиболее предпочтительными инокулянтами являются бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus*. Они образуют симбиотические связи с растением-хозяином путем выработки полезных для растений вторичных метаболитов и использования корневых экссудатов в качестве источника питания (Ortiz-Castro et al., 2020; Zhang et al., 2020; Zhuang et al., 2021).

К преимуществам применения *Pseudomonas* следует отнести повсеместное распространение, указывающее на высокую адаптивность благодаря молекулярному, экологическому и физиологическому разнообразию (Sah, Singh, 2016; Höfte, 2021). Бактерии, принадлежащие к данному роду, не только обладают высокими ростостимулирующими свойствами, но и принимают активное участие в циклах углерода и азота (Zhang et al., 2020; Zhuang et al., 2021). Среди представителей рода *Pseudomonas* ростостимулирующие свойства особенно выражены у видов *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida* (Ortiz-Castro et al., 2020; Höfte, 2021).

Многие исследования посвящены изучению влияния *Pseudomonas* на культурные растения в условиях сельскохозяйственных почв (Joshi et al., 2019; Joshi, Chitanand, 2020; Rodríguez et al., 2020). При этом роль данных бактерий в процессах повышения плодородия и восстановления растительного покрова техногенно нарушенных почв изучена мало.

Bacillus являются наиболее распространенной группой ризобактерий, составляя до 95% популяций грамположительных бактерий в прикорневой зоне растений (Aloo et al., 2019; Subhasmita et al., 2022). Для коммерческого полевого применения бактерии данного рода являются наиболее перспективными за счет способности к спорообразованию, которая позволяет препаратам на основе данных бактерий сохранять эффективность длительное время без создания специфичных условий хранения (Mendis et al., 2018; Subhasmita et al., 2022). Помимо спорообразования ризобактерии *Bacillus* обладают многими другими важными свойствами, повышающими их устойчивость к окружающей среде. Кроме того, некоторые представители данного вида способны выживать в экстремально бескислородных условиях, что дает конкурентное преимущество перед другими ризобактериями (Aloo et al., 2019).

Перспективным представителем рода *Bacillus* является вид *Bacillus megaterium*. Данный микроорганизм эффективно стимулирует прорастание и рост растений на более поздних этапах развития. Также *Bacillus megaterium* сохраняет жизнеспособность при высокой степени засоления субстрата, что делает его перспективным для интенсификации процессов восстановления растительности в условиях загрязненной и обедненной техногенно нарушенной почвы (Nascimento et al., 2020).

Таким образом, изучение взаимодействия штаммов *Pseudomonas fluorescens* B-4252, *Bacillus megaterium* B-2950 и *Pseudomonas putida* B-3778 с растениями, произрастающими на техногенно нарушенных почвах, является перспективной сферой исследований, направленных на восстановление техногенно нарушенных почв Кузбасса.

Цель работы: оценить перспективы совместного использования *Pseudomonas fluorescens* B-4252, *Bacillus megaterium* B-2950, *Pseudomonas putida* B-3778 и жителя для повышения плодородия и формирования устойчивого растительного покрова на техногенно нарушенных почвах Кузбасса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали бактериальные штаммы *Pseudomonas fluorescens* B-4252, *Bacillus megaterium* B-3778 и *Pseudomonas putida* B-2950. Штаммы получены из коллекции Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция

промышленных микроорганизмов» (БРЦ ВКПМ). Штаммы, используемые в данном исследовании, выделены из сред с высоким техногенным загрязнением. В связи с этим рационально предположить, что они сохраняют эффективность в агрессивных условиях техногенно нарушенных почв Кузбасса.

Апробацию бактериальных штаммов проводили на житняке гребневидном (*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.) (Ива, Россия). Выбор растения обусловлен тем, что дикорастущие злаки (в частности житняк) характеризуются высокой приживаемостью в условиях техногенных грунтов, а также способностью формировать плотный устойчивый травостой и дернину (Kostenkov, Oznobikhin, 2011).

Исследования характеристик бактериальных штаммов. Подготовка культуральной жидкости (КЖ) для изучения способности микроорганизмов синтезировать фитогормоны. Готовили суспензию исследуемых штаммов в 2 мл стерильного физиологического раствора до коэффициента мутности по МакФарланду, равного 0.8 – 1.0 (титр микроорганизмов 1.5×10^8 КОЕ/мл) с помощью денситометра Densichek plus (Sendle, Россия). Далее 1 мл полученной суспензии добавляли в 10 мл среды Лурия-Бертани в модификации Миллера (ЛБ). Культивировали на шейкере-инкубаторе LSI-3016A/LSI-3016R (Daihan Labtech, Южная Корея) в течение 72 ч при температуре $30 \pm 2^\circ\text{C}$ и 100 об/мин. Отделяли культуральную жидкость от клеток с помощью центрифугирования при 8000 об/мин в течение 10 мин. В дальнейшем полученную бесклеточную КЖ использовали для проведения исследований.

Анализ способности продуцировать индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) осуществляли в соответствии с методикой J. Kaug с соавторами (Kaug et al., 2022). Для этого смешивали бесклеточную КЖ с реактивом Сальковского в соотношении 1:1 и оставляли на 30 мин. По истечении времени измеряли оптическую плотность на спектрофотометре UV 1800 (Shimadzu, Япония) при длине волны 535 нм. В качестве раствора сравнения использовали питательную среду с реактивом Сальковского в соотношении 1:1. Количество ИУК определяли по калибровочному графику стандартных растворов ИУК концентрации от 5 до 200 мкг/мл.

Анализ способности продуцировать гиббереллиновую кислоту (ГК) осуществляли в соответствии с методикой R. Abdenaceur с соавторами (Abdenaceur et al., 2022). Для этого к 2 мл бесклеточной КЖ добавляли по 280 мкл 10.6% ферроцианида III калия и 1 М раствор цинка уксуснокислого и встряхивали. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 4500 об/мин. Далее 2 мл полученного супернатанта смешивали с 2 мл 30% соляной кислоты. Раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 75 мин и измеряли оптическую плотность при длине волны 254 нм. В качестве раствора сравнения использовали питательную среду с 5% соляной кислотой в соотношении 1:1. Концентрацию ГК определяли по калибровочному графику стандартного раствора ГК в пределах от 1 до 100 мкг/мл.

Анализ способности к фиксации азота осуществляли в соответствии с методикой J. Kaug с соавторами (Kaug et al., 2022). Для этого готовили питательную среду следующего состава, г/л: сахароза – 20.0; калий фосфорнокислый 2-замещенный – 1.0; магний сернокислый – 0.5; натрий хлористый – 0.5; натрий молибденовокислый – 0.005; железо II сернокислое – 0.01; кальций углекислый – 2.0;

агар-агар – 15.0. Суточную культуру наносили на среду с помощью бактериологической петли. Культивировали в течение 4 сут. при температуре $30\pm 2^\circ\text{C}$. Признаками фиксирования азота служило наличие блестящих колоний и/или линий микроорганизмов.

Анализ способности к солибилизации фосфора осуществляли в соответствии с методикой М. R. Swain с соавторами (Swain et al., 2012), расчет количества растворенного фосфора – S. P. Sandilya с соавторами (Sandilya et al., 2018). Для этого 5 мл суспензии микроорганизмов культивировали на 100 мл среды следующего состава, г/л: глюкоза (Химреактивы, Россия) – 20.0; натрий хлористый – 0.2; магний сернокислый – 0.1; марганец сернокислый (Ленреактив, Россия) – 0.01; железо (II) сернокислое – 0.01 г; кальций фосфорнокислый (Ленреактив, Россия) – 5.0. Далее отделяли клетки от культуральной жидкости по методике, описанной ранее.

Оценку способности к биосинтезу HCN осуществляли в соответствии с методикой S. Ogale с соавторами (Ogale et al., 2018). Для этого готовили среду следующего состава, г/л: пептон – 10, мясной экстракт – 11, натрий хлористый – 5, агар-агар – 15, глицин (ЛенРеактив, Россия) – 4.4. Половину чашки Петри засеивали штрихом исследуемого штамма, а вторую половину оставляли чистой. Затем на поверхность питательной среды наносили фильтровальную бумагу, пропитанную 0.5% пикриновой кислотой в 1% растворе натрия углекислого. Запечатанные парафином чашки Петри культивировали при температуре $30\pm 2^\circ\text{C}$ в темном месте в течение 96 ч. Проявление окраски на фильтровальной бумаге от темно-оранжевой до красной указывает на способность к продуцированию HCN.

Конструирование консорциумов. *Анализ биосовместимости по методу лунк* осуществляли в соответствии с методикой А. Н. Иркитовой и соавторов (Irkitova et al., 2012). Для этого бактериальную культуру 1 выращивали на среде ЛБ при $30\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Полученный образец центрифугировали при 7500 об/мин в течение 15 мин для отделения КЖ от клеток. На поверхность чашки Петри с агаризованной средой ЛБ наносили тест-культуру методом газона с помощью шпателя Дригальского. Далее делали лунку диаметром 5 мм и вносили в нее КЖ исследуемой культуры. Культивировали в течение 48 ч при температуре $30\pm 2^\circ\text{C}$. Под положительным влиянием принималось наличие зоны активного роста тест-культуры вокруг лунки, нейтралитет – без выраженной зоны активного роста, ингибирование – зона подавления роста тест-культуры.

Составление консорциумов. В среде ЛБ готовили суспензии чистых культур с использованием денситометра до коэффициента мутности 0.8 – 1.0 по МакФарланду. Культивировали при температуре $30\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 48 ч и 110 об/мин. Затем в пробирки со средой ЛБ вносили 5% от объема суспензий микроорганизмов, входящих в консорциум (количество мл вносимой суспензии микроорганизмов зависит от числа штаммов, присутствующих в консорциуме).

Оценка влияния бактериальных штаммов на рост житняка в лабораторных условиях. *Подготовку бактериальных изолятов* осуществляли в условиях, прописанных в работе Л. К. Асякиной с соавторами (Asyakina et al., 2023b). Семени в количестве 100 шт. замачивали в течение 30 мин в суспензии микроорганизмов/консорциумов с концентрацией по МакФарланду 2.5. Для посадки семян ис-

пользовали универсальный грунт (ООО «Терра Мастер», Россия). Почву стерилизовали с помощью автоклавирования. Стерильную почву распределяли в емкости по 0.25 кг. Посадку житняка осуществляли по методике, описанной в работе Л. К. Asyakina с соавторами (Asyakina et al., 2023a). Далее на 7 сут. рассчитывали всхожесть семян и измеряли длину побегов.

Все исследования проводили в трехкратной повторности. Полученные значения данных выражали как среднее значение трех измерений со стандартным отклонением. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью одномоментного парного критерия Стьюдента по каждой паре интересов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Анализ статистических данных осуществляли при помощи программного продукта Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика бактериальных штаммов. В ходе работы изучили PGP свойства 3 штаммов микроорганизмов: *P. fluorescens* B-4252, *B. megaterium* B-3778 и *P. putida* B-2950. Анализировали следующие показатели: способность к синтезу фитогормонов, солюбилизация фосфатов, фиксация азота и производство HCN. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика штаммов
Table 1. Characteristics of the strains

Показатель / Indicator	<i>P. fluorescens</i> B-4252	<i>B. megaterium</i> B-3778	<i>P. putida</i> B-2950
Количество ИУК, мкг/мл / Amount of indolyl-3-acetic acid, µg/mL	131.45±6.23	16.72±0.56	71.40±3.45
Количество ГК, мкг/мл / Amount of gibberellic acid, µg/mL	6.43±0.28	82.33±3.03	3.52±0.12
Содержание растворимого фосфора, мг/л / Content of soluble phosphorus, mg/L	437.19±20.45	264.04±12.53	49.83±2.39
Способность фиксировать азот / Ability to fix nitrogen	+	+	+
Способность к биосинтезу HCN / Ability to biosynthesize HCN	+	+	+

Полученные данные свидетельствуют о том, что все изученные штаммы способны продуцировать ростостимулирующие вещества – фитогормоны. Представители рода *Pseudomonas* наиболее активно синтезируют ИУК. Так, *P. fluorescens* B-4252 способен производить 131.45 мкг/мл этого вещества, что значительно выше показателей других изученных штаммов. Это говорит о высокой активности данного штамма и его потенциале в качестве источника ростостимулирующих веществ. Полученный результат согласуется с литературными данными. Так, в исследовании А. Syed с соавторами (Syed et al., 2023) *P. fluorescens* PGPR-7 синтезировал ИУК в количестве 124 мкг/мл за 5 сут.; исследователи С. L. Patten и В. R. Glick (Patten, Glick, 2002) выяснили, что *P. putida* GR12-2 дикого типа продуцирует 68 мкг/мл за 48 ч.

В свою очередь, штамм *B. megaterium* B-3778 продемонстрировал значительно меньшую способность к синтезу ИУК – 16.72 мкг/мл. Однако для данного микроорганизма отмечена высокая способность к продуцированию ГК. *B. megaterium*

В-3778 производил 82.33 мкг/мл этого вещества, в то время как *P. putida* В-2950 и *P. fluorescens* В-4252 синтезировали 3.52 и 6.43 мкг/мл соответственно. Способность ГК выводить из покоя семена за счет регулирования роста зародыша, размягчения слоев эндосперма и мобилизации запасных веществ достоверно подтверждена современными исследованиями. В связи с этим рационально предположить, что обработка растений штаммом *B. megaterium* В-3778 может способствовать лучшей всхожести семян.

Способность представителей рода *Bacillus* и *Pseudomonas* подтверждается другими исследованиями. Например, J. Mishra с соавторами (Mishra et al., 2022) определили, что *P. fluorescens* JM-1 способен продуцировать ГК в количестве 4 мкг/мл за 72 ч; в исследовании A. Gh. Rahal с соавторами (Rahal et al., 2010) выяснено, что *B. megaterium* R44 синтезирует 94 мкг/мл за 4 сут. на среде с глюкозой; P. Verma с соавторами (Verma et al., 2019) изучали штамм *P. putida* IARI-NIAW1-16, который синтезировал 9.8 мкг/мл за 72 ч.

Таким образом, установлено, что способность к синтезу фитогормонов среди изученных штаммов вариабельна. В связи с этим совместное культивирование штаммов при условии их биологической совместимости может являться перспективным, так как позволит обогатить культуральную жидкость сразу двумя фитогормонами. Кроме того, действие ИУК и ГК на растения во многом является однонаправленным.

Изученные микроорганизмы обладали рядом других ростостимулирующих свойств. Результаты исследований показали, что они способны к солюбилизации фосфора (содержание растворимого фосфора в питательной среде от 49.83 до 431.19 мг/л), фиксации азота и производству HCN. Полученные данные согласуются с литературными источниками. Так, в исследовании M. Sepehri и B. Khatabi (Sepehri, Khatabi, 2021) *P. fluorescens* B3 солюбилизировал фосфор в количестве 373 мг/л за 72 ч; в работе K. Bhatt и D. K. Maheshwari (Bhatt, Maheshwari, 2020) *B. megaterium* CDK25 – 281 мг/л за 48 ч; *P. putida* IARI-NIAW1-16 в исследовании P. Verma с соавторами (Verma et al., 2019) – 54 мг/л за 72 ч. В других исследованиях подтверждается, что данные микроорганизмы обладают способностью к фиксации азота (Li et al., 2017; Efe, 2020; Wu et al., 2022) и продуцированию HCN (Li et al., 2017; Abd El-Rahman et al., 2019; Sepehri, Khatabi, 2021).

Конструирование консорциумов. Анализ биосовместимости исследуемых штаммов необходим для конструирования бактериальных консорциумов. По полученным данным установили, что анализируемые штаммы оказывали положительное влияние на рост друг друга. За исключением *P. fluorescens* В-4252 и *B. megaterium* В-3778, во взаимном влиянии которых наблюдали нейтралитет. В соответствии с результатами биосовместимости сконструировали 4 варианта консорциумов, в состав которых вошли *P. fluorescens* В-4252, *B. megaterium* В-3778, *P. putida* В-2950: соотношение микроорганизмов: 1:1:1 соответственно; соотношение микроорганизмов: 2:1:1 соответственно; соотношение микроорганизмов: 1:2:1 соответственно; соотношение микроорганизмов: 1:1:2 соответственно.

Влияние бактерий на рост житняка и показатели грунта. Данные о влиянии исследуемых штаммов на ростовые показатели житняка в лабораторных условиях представлены на рисунке и в табл. 2.



a / a

б / б

Влияние консорциума на рост *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.: *a* – без обработки, *б* – с обработкой консорциумом № 2

Figure. The consortium's influence on the growth of *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.: *a* – without treatment; *b* – treatment with consortium No. 2

являются статистически значимыми) и консорциума № 1 – 18%.

При анализе результатов, представленных в табл. 2, можно сделать вывод, что обработка суспензией микроорганизмов и консорциумов способствует увеличению всхожести семян и средней длины ростков. Так, при использовании *P. fluorescens* B-4252 всхожесть составила 87%, консорциума № 2 – 94%, что на 15 и 22% соответственно больше по сравнению с контролем, общая всхожесть которого составляет 72%. Наименьший прирост показателя общей всхожести наблюдается при поливе суспензией микроорганизма *P. putida* B-2950 – на 11% больше по сравнению с контролем (однако эти данные не являются статистически значимыми) и консорциума № 1 – 18%.

Таблица 2. Влияние бактерий и консорциумов на рост *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.

Table 2. Influence of the bacteria and their consortia on the growth of *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.

Показатель / Indicator	Общая всхожесть, % / Total germination, %	Средняя длина ростков, мм / Average length of sprouts, mm
Без обработки (контроль) / Without processing (control)	72±3	39±2
Обработка <i>P. fluorescens</i> B-4252 / Treatment with <i>P. fluorescens</i> B-4252	87±3* $T_{ст} = 3.54, p = 0.04$	46±1* $T_{ст} = 3.13, p = 0.001$
Обработка <i>B. megaterium</i> B-3778 / Treatment with <i>B. megaterium</i> B-3778	84±4 $T_{ст} = 2.40, p = 0.09$	43±1 $T_{ст} = 1.79, p = 0.17$
Обработка <i>P. putida</i> B-2950 / Treatment with <i>P. putida</i> B-2950	83±4 $T_{ст} = 2.20, p = 0.12$	44±2 $T_{ст} = 1.77, p = 0.18$
Обработка консорциумом № 1 / Treatment with consortium No. 1	89±4 $T_{ст} = 3.40, p = 0.04$	46±1* $T_{ст} = 3.13, p = 0.05$
Обработка консорциумом № 2 / Treatment with consortium No. 2	94±5 $T_{ст} = 3.77, p = 0.03$	56±3* $T_{ст} = 4.71, p = 0.02$
Обработка консорциумом № 3 / Treatment with consortium No. 3	91±4 $T_{ст} = 3.80, p = 0.03$	50±2* $T_{ст} = 3.89, p = 0.03$
Обработка консорциумом № 4 / Treatment with consortium No. 4	90±3 $T_{ст} = 3.60, p = 0.04$	51±2* $T_{ст} = 4.24, p = 0.02$

Примечание. * – Наблюдаемые различия статистически значимы (уровень значимости $p < 0.05$).

Note. * The observed differences are statistically significant (significance level $p < 0.05$).

Средняя длина ростков при обработке штаммом *P. fluorescens* B-4252 увеличилась на 7 мм по сравнению с контролем (39 мм) и консорциумом № 2 – на 17 мм. Наименьшее увеличение средней длины ростков наблюдается в случае примене-

ния консорциума № 3 – 11 мм. При обработке микроорганизмами *B. megaterium* В-3778 и *P. putida* В-2950 статистически значимых различий в средней длине ростков в сравнении с контролем не обнаружено. Таким образом, наибольшее положительное влияние на семена житняка оказал консорциум № 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследований микроорганизмы *P. fluorescens* В-4252, *B. megaterium* В-3778, *P. putida* В-2950 обладали свойствами PGP-ризобактерий, а именно: продуцировали индолил-3-уксусную кислоту (17 – 131 мкг/мл), гиббереллиновую кислоту (3.5 – 82.5 мкг/мл), обладали способностью к солюбилизации фосфора, фиксации азота и синтезу HCN.

Обработка консорциумами, составленными на основании данных микроорганизмов, повышала всхожесть семян житняка, а также способствовала увеличению средней длины побегов. При этом наиболее эффективен консорциум № 2.

Таким образом, полученные результаты позволят в дальнейшем разработать микробное удобрение комплексного действия для интенсификации процессов восстановления растительного покрова в условиях техногенных территорий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Abd El-Rahman A., Shaheen H., Abd-El-Aziz R., Ibrahim D. Influence of hydrogen cyanide-producing rhizobacteria in controlling the crown gall and root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 2019, vol. 29, article no. 41. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0143-7>
- Abdenaceur R., Farida B. T., Mourad D., Rima H., Zahia O., Fatma S. H. Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth. *International Microbiology*, 2022, vol. 25, iss. 4, pp. 817–829. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00263-8>
- Ahirwal J., Maiti S. K., Singh A. K. Changes in ecosystem carbon pool and soil CO₂ flux following post-mine reclamation in dry tropical environment, India. *Science of The Total Environment*, 2017, vol. 583, pp. 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.043>
- Aloo B. N., Makumba B. A., Mbega E. R. The potential of *Bacilli rhizobacteria* for sustainable crop production and environmental sustainability. *Microbiological Research*, 2019, vol. 219, pp. 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.011>
- Asyakina L. K., Vorob'eva E. E., Proskuryakova L. A., Zharko M. Yu. Evaluating extremophilic microorganisms in industrial regions. *Foods and Raw Materials*, 2023a, vol. 11, iss. 1, pp. 162–171. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-556>
- Asyakina L. K., Serazetdinova Yu. R., Frolova A. S., Fotina N. V., Neverova O. A., Petrov A. N. Antagonistic activity of extremophilic bacteria against phytopathogens in agricultural crops. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2023b, vol. 53, no. 3, pp. 565–575. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2457>
- Atuchin V. V., Asyakina L. K., Serazetdinova Y. R., Frolova A. S., Velichkovich N. S., Prosekov A. Y. Microorganisms for bioremediation of soils contaminated with heavy metals. *Microorganisms*, 2023, vol. 11, iss. 3, article no. 864. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040864>
- Backer R., Rokem J. S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian S., Smith D. L. Plant growth-promoting Rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 2018, vol. 9, article no. 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>

- Bhatt K., Maheshwari D. K. *Bacillus megaterium* strain CDK25, a novel plant growth promoting bacterium enhances proximate chemical and nutritional composition of *Capsicum annuum* L. *Frontiers in Plant Science*, 2020, vol. 11, article no. 1147. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01147>
- Drozhdova M. Yu., Pozdnyakova A. V., Osintseva M. A., Burova N. V., Minina V. I. The microorganism-plant system for remediation of soil exposed to coal mining. *Foods and Raw Materials*, 2021, vol. 9, iss. 2, pp. 406–418. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-2-406-418>
- Efe D. Potential plant growth-promoting bacteria with heavy metal resistance. *Current Microbiology*, 2020, vol. 77, iss. 12, pp. 3861–3868. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02208-8>
- Frolova A. S., Pereverzeva M. K., Asyakina L. K., Golubtsova Yu. V., Osintseva M. A. Enzymatic activity of technogenic surface formations of Kuzbass. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka*, 2022, vol. 23, no. 4, pp. 538–547 (in Russian). <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2022.23.4.538-547>
- Höfte M. The use of *Pseudomonas* spp. as bacterial biocontrol agents to control plant disease. In: *Microbial Bioprotectants for Plant Disease Management*. Cambridge, Burleigh Dodds Science Publ., 2021, pp. 2–74. <https://doi.org/10.19103/AS.2021.0093.11>
- Irkutova A. N., Kagan Ja. R., Sokolova G. G. Comparative analysis of the methods to define antagonistic activity of lactic bacteria. *Izvestiya of Altai State University*, 2012, no. 3, pp. 41–44 (in Russian).
- Joshi A., Chitanand M. Complete genome sequence of plant growth promoting *Pseudomonas aeruginosa* AJ D 2 an isolate from monocropic cotton rhizosphere. *Genomics*, 2020, vol. 112, article no. 1318. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.07.022>
- Joshi D., Chandra R., Suyal D. C., Kumar S., Goel R. Impacts of bioinoculants *Pseudomonas jessenii* MP1 and *Rhodococcus qingshengii* S10107 on Chickpea (*Cicer arietinum* L.) yield and soil nitrogen status. *Pedosphere*, 2019, vol. 29, iss. 3, pp. 388–399. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60807-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60807-6)
- Kaur J., Mudgal G., Chand K., Singh G. B., Perveen K., Bukhari N. A., Debnath S., Mohan T. C., Charukesi R., Singh G. An exopolysaccharide-producing novel *Agrobacterium pusense* strain JAS1 isolated from snake plant enhances plant growth and soil water retention. *Scientific Reports*, 2022, vol. 12, iss. 1, article no. 21330. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25225-y>
- Kostenkov N. M., Oznobikhin V. I. Environmental aspects of soil recultivation in the Sakhalin project pipeline systems. *Bulliten KrasSAU*, 2011, no. 10, pp. 23–28 (in Russian).
- Kumar A., Das S. K., Nainegali L., Reddy K. R. Phytostabilization of coalmine overburden waste rock dump slopes: Current status, challenges, and perspectives. *Bulletin of Engineering Geology and the Environment*, 2023, vol. 82, article no. 130. <https://doi.org/10.1007/s10064-023-03159-7>
- Li H. B., Singh R. K., Singh P., Song Q. Q., Xing Y. X., Yang L. T., Li Y. R. Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 2017, vol. 8, article no. 1268. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01268>
- Mahar A., Wang P., Ali A., Awasthi M. K., Lahori A. H., Wang Q., Li R., Zhang Z. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, vol. 126, pp. 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.023>
- Mendis H. C., Thomas V. P., Schwientek P., Salamzade R., Chien J.-T., Waidyarathne P., Kloepper J., de La Fuente L. Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. *PLoS ONE*, 2018, vol. 13, iss. 2, article no. e0193119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193119>
- Milentyeva I. S., Fotina N. V., Zharko M. Yu., Proskuryakova L. A. Microbial treatment and oxidative stress in agricultural plants. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2022, vol. 52, no. 4, pp. 750–761 (in Russian). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-4-2403>

Mishra J., Mishra I., Arora N. K. 2,4-Diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens* JM-1 for management of ear rot disease caused by *Fusarium moniliforme* in *Zea mays* L. *3 Biotech*, 2022, vol. 12, iss. 6, article no. 138. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03201-7>

Nascimento F. X., Hernández A. G., Glick B. R., Rossi M. J. Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. *Biotechnology Reports*, 2020, vol. 25, article no. e00406. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00406>

Ogale S., Yadav K. S., Navale S. Screening of endophytic bacteria from the pharmacologically important medicinal plant *Gloriosa superba* for their multiple plant growth promoting properties. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 2018, vol. 7, iss. 1, pp. 208–214.

Ortiz-Castro R., Campos-García J., López-Bucio J. *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* influence arabidopsis root system architecture through an auxin response mediated by bioactive cyclodipeptides. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2020, vol. 39, iss. 1, pp. 254–265. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09979-w>

Osintseva M. A., Melentyeva I. S., Golubtsova Yu. V. Physico-chemical analysis of the soil cover of technogenically disturbed territories of Kuzbass. *Sustainable Development of Mountain Territories*, 2022, vol. 14, no. 2, pp. 252–262 (in Russian). <https://doi.org/10.21177/1998-4502-2022-14-2-252-262>

Patten C. L., Glick B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, vol. 68, iss. 8, pp. 3795–3801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>

Podurets O. I., Osintseva M. A. Ecological aspect of the development of soil-forming processes at the post-technogenic stage. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, vol. 937, article no. 022008. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/937/2/022008>

Qi L., Sun S., Gao K., Ren W., Liu Y., Chen Z., Yuan X. Effect of reclamation years on soil physical, chemical, bacterial, and fungal community compositions in an open-pit coal mine dump in grassland area of Inner Mongolia, China. *Land Degradation & Development*, 2023, vol. 34, iss. 12, pp. 3568–3580. <https://doi.org/10.1002/ldr.4703>

Rahal A. Gh., Zaghoul R. A., Neweigy N. A., Hanafy E. A., El-Meihy R. M. Effect of carbon source and precursors on the production of plant growth regulators by *Azotobacter chroococcum* (R19) and *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* (R44). *Egyptian Journal of Microbiology*, 2010, vol. 13, special iss., pp. 45–61.

Rodríguez M., Torres M., Blanco L., Béjar V., Sampedro I., Llamas I. Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Scientific Reports*, 2020, vol. 10, article no. 4121. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61084-1>

Sah S., Singh R. Phylogenetical coherence of *Pseudomonas* in unexplored soils of Himalayan region. *3 Biotech*, 2016, vol. 6, article no. 170. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0493-8>

Sandilya S. P., Bhuyan P. M., Gogoi D. K., Kardong D. Phosphorus solubilization and plant growth promotion ability of rhizobacteria of *R. communis* L growing in Assam, India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences*, 2018, vol. 88, iss. 3, pp. 959–966. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0833-9>

Sepehri M., Khatabi B. Combination of siderophore-producing bacteria and piriformospora indica provides an efficient approach to improve cadmium tolerance in alfalfa. *Microbial Ecology*, 2021, vol. 81, iss. 3, pp. 717–730. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01629-z>

Subhasmita M., Radheshyam Y., Wusirika R. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, vol. 132, iss. 5, pp. 3543–3562. <https://doi.org/10.1111/jam.15480>

Swain M. R., Laxminarayana K., Ray R. C. Phosphorus solubilization by thermotolerant *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. *Agricultural Research*, 2012, vol. 1, iss. 3, pp. 273–279. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0022-x>

Syed A., Elgorban A. M., Bahkali A. H., Eswaramoorthy R., Iqbal R. K., Danish S. Metal-tolerant and siderophore producing *Pseudomonas fluorescence* and *Trichoderma* spp. improved the growth, biochemical features and yield attributes of chickpea by lowering Cd uptake. *Scientific Reports*, 2023, vol. 13, iss. 1, article no. 4471. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31330-3>

Verma P., Yadav A. N., Khannam K. S., Mishra S., Kumar S., Saxena A. K., Suman A. Appraisal of diversity and functional attributes of thermotolerant wheat associated bacteria from the peninsular zone of India. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019, vol. 26, iss. 7, pp. 1882–1895. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.042>

Wang K., Bi Y., Cao Y., Peng S., Christie P., Ma S., Zhang J., Xie L. Shifts in composition and function of soil fungal communities and edaphic properties during the reclamation chronosequence of an open-cast coal mining dump. *Science of The Total Environment*, 2021, vol. 767, article no. 144465. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144465>

Wu Y., Xiao S., Qi J., Gong Y., Li K. *Pseudomonas fluorescens* BsEB-1: An endophytic bacterium isolated from the root of *Bletilla striata* that can promote its growth. *Plant Signaling & Behavior*, 2022, vol. 17, no. 1, article no. 2100626. <https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2100626>

Zhang L., Chen W., Jiang Q., Fei Z., Xiao M. Genome analysis of plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* JD37 and insights from comparison of genomics with three *Pseudomonas* strains. *Microbiological Research*, 2020, vol. 237, article no. 126483. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126483>

Zhuang L., Li Y., Wang Z., Yu Y., Zhang N., Yang C., Zeng Q., Wang Q. Synthetic community with six *Pseudomonas* strains screened from garlic rhizosphere microbiome promotes plant growth. *Microbial Biotechnology*, 2021, vol. 14, iss. 2, pp. 488–502. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13640>

***Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus megaterium*, and *Pseudomonas putida*
in the restoration of technogenically disturbed territories of the Kuzbass**

L. K. Asyakina, E. E. Borodina , N. V. Fotina,
O. A. Neverova, I. S. Milentyeva

Kemerovo State University
6 Krasnaya St., Kemerovo 650000, Russia

Received: September 22, 2023 / revised: January 31, 2024 / accepted: February 4, 2024 / published: December 17, 2024

Abstract. The Kuznetsk Basin (Kuzbass) is the largest Russian region specializing in mining. Most mining operations in the region are carried out by the open method, which is the safest and most effective, but contributes to the formation of a significant amount of technogenically disturbed land. To form a fertile soil layer and vegetation cover, it is rational to use microorganisms together with plants. Microorganisms are known to be able to intensify plant growth by improving their nutrition, synthesis of growth-stimulating substances, and protection from phytopathogens. The greatest growth-stimulating properties were noted for representatives of the genera *Pseudomonas* and *Bacillus*. In turn, some plants, in particular the granary (*Agropyron cristatum* L.), form stable herbage and participate in the formation of the surface horizon of soils (sod). The purpose of the work was to study the prospects for the joint use of *Pseudomonas fluorescens* B-4252, *Bacillus megaterium* B-3778, *Pseudomonas putida* B-2950, and granary to increase fertility and form a stable vegetation cover in the technogenically disturbed territories of the Kuznetsk Basin. It has been established that the studied strains are capable of producing prussic acid, phytohormones, as well as phosphorus solubilization and nitrogen fixation. These strains and consortia based thereon improve the growth of the granary in laboratory conditions. Seed treatment with the above microorganisms contributes to an increase in germination and the growth rate of the granary. E.g., the germination of seeds during processing by consortium No. 2 was 94%, which was 12% more compared to the control (without treatment). The average length of the sprouts in this treatment option was 56 mm, which was more than 17 mm for the control. Due to the described qualities, the consortium could become an effective agent to accelerate the restoration of the Kuzbass technozems.

Keywords: technozems, rhizobacteria, *Pseudomonas*, *Bacillus*, dumps, fertility

Funding. The work is carried out within the framework of the Decree of the Government of the Russian Federation dated 05/11/2022 No. 1144-r, a comprehensive scientific and technical program of a full innovation cycle “Development and implementation of a complex of technologies in the fields of exploration and extraction of solid minerals, industrial safety, bioremediation, creation of new products of deep processing from coal raw materials with a consistent reduction of the environmental burden on the environment and risks to the life of the population” (“Clean coal – green Kuzbass”), event 3.1 “Ecopolygon of world-class technologies of reclamation and remediation”. With the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2022-1200 dated 09/28/2022).

 **Corresponding author.** Laboratory of Phytoremediation of Technogenically Disturbed Ecosystems of the Kemerovo State University.

ORCID and e-mail addresses: Lyudmila K. Asyakina: <https://orcid.org/0000-0003-4988-8197>, alk_kem@mail.ru; Ekaterina E. Borodina: <https://orcid.org/0000-0001-6362-7589>, kborodina1908@gmail.com; Natalya V. Fotina: <https://orcid.org/0000-0002-7655-0258>, fotina.natashenka@mail.ru; Olga A. Neverova: <https://orcid.org/0000-0002-0309-5709>, neverova@kemsu.ru; Irina S. Milentyeva: <https://orcid.org/0000-0002-3536-562X>, irazumnikova@mail.ru.

Л. К. Асякина, Е. Е. Бородина, Н. В. Фотина и др.

Ethics approval and consent to participate: This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

For citation: Asyakina L. K., Borodina E. E., Fotina N. V., Neverova O. A., Milentyeva I. S. *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus megaterium*, and *Pseudomonas putida* in the restoration of technogenically disturbed territories of the Kuzbass. *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2024, no. 4, pp. 385–398 (in Russian). <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2024-4-385-398>