

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ К НЕФТЯНОМУ ЗАГРЯЗНЕНИЮ С ПОМОЩЬЮ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis*

© 2023 г. З. М. Курамшина^{а, *}, Л. Р. Саттарова^а, И. В. Максимов^б

^а Стерлитамакский филиал Уфимского университета науки и технологий, Стерлитамак, Россия

^б Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра

Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: kuramshina_zilya@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.2023 г.

После доработки 02.04.2023 г.

Принята к публикации 03.04.2023 г.

Изучено влияние обработки семян пшеницы суспензионной культурой клеток эндофитных бактерий штамма *Bacillus subtilis* 26Д и линии *B. subtilis* 26Д^{tn}, отселектированной по толерантности к компонентам сырой нефти, на ростовые и биохимические характеристики растений пшеницы *Triticum aestivum* L. в условиях нефтяного загрязнения почвы. Показано, что инокуляция семян линией *B. subtilis* 26Д^{tn} стимулировала у проростков рост и подавляла развитие окислительного стресса в условиях воздействия на растения нефтяного загрязнения в сравнении с контролем и растениями, инокулированными штаммом *B. subtilis* 26Д. Соответственно, бактерии *B. subtilis* 26Д^{tn} способствовали более успешному росту растений пшеницы на загрязненных нефтью почвах, что может быть использовано для стимуляции роста растений на таких участках, и для возврата ряда из них в хозяйственный оборот.

Ключевые слова: пшеница, эндофитные бактерии *B. subtilis* 26Д, нефть, рост, пероксидаза, каталаза, малоновый диальдегид, пролин, антистрессовый эффект

DOI: 10.31857/S0015330323600286, EDN: CJDSRU

ВВЕДЕНИЕ

В результате добычи, транспортировки и хранения нефти и продуктов ее переработки окружающая среда часто подвергается загрязнению, что является общей экологической проблемой [1–3]. Сырая нефть представляет собой сложную смесь растворимых и нерастворимых в воде углеводородов (алканы, асфальтены, смолы, парафины, фенолы и др.), тяжелых металлов и других токсических соединений. Нефтяное загрязнение почвы как антропогенный поллютант значительно замедляет рост и развитие растений, а при длительном воздействии приводит к их гибели. Ингибирование роста может быть результатом прямого токсического действия нефти на всхожесть семян вследствие проникновения нефти в семена и повреждения зародыша. Углеводородная составляющая нефти, покрывая семена, препятствует поглощению ими воды и кислорода, необходимых для прорастания. Кроме того, при нефтяном загрязнении почвы происходит ингибирование бактериального разложения органического вещества и связанной с этим реминерализации питательных веществ токсичными компонентами, что приводит к изменению соотношения углерод/азот (C/N), дефициту

азота [1, 4] и, как следствие, к ингибированию роста растений, уменьшению их надземной биомассы и многократному снижению продуктивности [1–3].

Компоненты сырой нефти могут проникать в живые растения через их корни и листья, откуда могут транспортироваться в сосудистую систему растений и межклеточные пространства, что приводит к повреждению клеток и тканей [4, 5]. При нефтяном загрязнении происходит пожелтение и отмирание листьев, снижается скорость фотосинтеза и содержание хлорофилла в растениях. Повреждение клеток, возникающее в результате проникновения токсических компонентов нефти, может быть основной причиной ингибирования фотосинтеза, так как углеводороды имеют тенденцию накапливаться в хлоропластах, что объясняет снижение фотосинтетической активности. Скорость фотосинтеза и степень повреждения фотосинтетической системы растений зависят от типа и концентрации нефти [5]. К заметным симптомам, наблюдаемым у растений, произрастающих на загрязненной нефтью почве, относятся также снижение активности ферментов, метаболизирующих крахмал, и снижение содержания общих углеводов, белков и аминокислот [1–4].

Сокращения: ПО – пероксидаза, КАТ – каталаза.

Наиболее опасным нарушением, возникающим в результате воздействия нефти на растения, является окислительный стресс, приводящий к образованию в клетках АФК с высокой окислительной способностью. С одной стороны, углеводороды в растениях уменьшают транспирацию растений, а с другой — нарушают их дыхание, которое в зависимости от вида растения может либо уменьшаться, либо усиливаться [1]. АФК, накапливаясь в растительных тканях, разрушают клеточно-мембранные комплексы, нарушают транспортные процессы и внутриклеточные реакции, тем самым ингибируя ростовую активность. Однако, растения могут использовать АФК и в качестве вторичного мессенджера во многих каскадах передачи сигналов. По этим причинам антиоксидантная система защиты растений играет решающую роль в контроле продолжительности жизни сигналов АФК и предотвращении неконтролируемого окисления [1].

Показано, что при загрязнении окружающей среды нефтью у растений возникают те же эффекты, что и при действии абиотических факторов, в частности, при повышении температуры, засухе, засолении и др. [1]. Как известно, негативные последствия абиотических стрессов, в том числе и нефтяного загрязнения, могут быть успешно преодолены ростостимулирующими бактериями [6, 7]. Большинство таких бактерий обладают способностью улучшать рост и повышать продуктивность культурных растений благодаря активации синтеза в растительных клетках аминокислот и фитогормонов, фиксации азота, а также увеличению доступного количества минеральных веществ [7, 8]. При засухе или солевом стрессе эндофиты растений могут регулировать накопление осмолитов (совместимых растворенных веществ), таких как пролин и сахара, и индуцировать экспрессию связанных со стрессом генов и ферментов для того, чтобы уменьшить окислительное повреждение и позволить растениям противостоять абиотическим стрессам [7–11].

Важным фактором эффективности применения ростостимулирующих бактерий является их способность повышать устойчивость растений к токсиканту [2, 5–8]. В связи с этим целью работы являлось изучение влияния эндофитных штаммов бактерий *B. subtilis* 26Д (коллекция ВНИИСХМ, Пушкин-8, г. Санкт-Петербург, №128) и бактерий *B. subtilis* 26Д^Н, обладающих толерантностью к нефти, на устойчивость растений *Triticum aestivum* L. к нефтяному загрязнению почвы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Объектами исследования служили растения пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Омская 35). Эксперименты проводили в лабораторных условиях. Семена перед по-

севом промывали в мыльной воде, стерилизовали 96% этанолом в течение 1 мин, трижды ополаскивали в дистиллированной воде, подсушивали.

В экспериментах использовали бактерии *B. subtilis* штамма 26Д (коллекция ВНИИСХМ, Пушкин-8, г. Санкт-Петербург, №128) и полученные путем селекции на высоких концентрациях нефти линии *B. subtilis* 26Д^Н. Для отбора толерантных к нефтяному загрязнению линии бактерии *B. subtilis* 26Д культивировали на чашках Петри на минеральной среде М9, содержащий градиент концентраций нефти (Царичанское месторождение, г. Оренбург) в чашке Петри от 1 до 100 г/л. Химический состав образца нефти из отмеченного месторождения описан в работе [12]. Для формирования градиента нефти предварительно готовили питательные среды М9 с разной концентрацией нефти (1, 10, 50, 100 г/л), которые после автоклавирования (при +120°C и 1.1 атм) разливали в чашки Петри (диаметр 22 см). Затем, после застывания агаризованной среды, в ламинарном боксе ее разрезали на полоски и раскладывали на чашки Петри таким образом, чтобы среды, содержащие низкие концентрации нефти, были по краям чашки, а среды с более высокими концентрациями располагались внутри (1:10:50:100:50:10:1). Бактерии высаживали первоначально на среду с самой низкой концентрацией нефти (1 г/л). По мере роста колоний наблюдали появление колоний на среде с более высокими концентрациями поллютанта [13]. Со среды, содержащей нефть из расчета 100 мл/л, отбирали колонии бактерий, названные *B. subtilis* 26Д^Н.

Семена обрабатывали в ламинарном боксе 20-часовой культурой бактерий, выращенной на минеральной среде М9 при +37°C. Клетки бактерий отмывали раствором 0.001М KCl. Суспензию клеток доводили до необходимой концентрации (10⁶ кл/мл) по оптической плотности. Расход бактериальной суспензии составлял 20 мкл на 1 г семян. Обработанные семена выдерживали в течение одного часа, затем использовали в экспериментах. Контрольные семена обрабатывали дистиллированной водой. Инокулированные и неинокулированные бактериями семена выращивали в вегетационных сосудах (40 × 20 см) при температуре 18–20°C при искусственной равномерной освещенности (среднесуточный световой интеграл 200–250 мкмоль/(м² с)) и 16-часовом фотопериоде на субстратах, загрязненных разными концентрациями сырой нефти из расчета 1, 10, 50 г в 1 кг почвы. В качестве субстрата для выращивания растений использовали чернозем выщелоченный (верхний гумусовый слой). Контрольные растения высаживали в почву без нефтяного загрязнения. После посева семян пшеницы в почву поливали ее дистиллированной водой. Через 25 сут измеряли ростовые характери-

стики и отбирали надземную часть проростков для биохимического анализа.

Получение экстрактов из растительных тканей. Надземную часть растений промывали в дистиллированной воде, удаляли избыток воды фильтровальной бумагой, взвешивали. Растительный материал гомогенизировали в 0.1 М К-фосфатном буфере pH 6.0 (при определении пероксидазы) или в Трис-содержащем буфере pH 7.8 (при определении каталазы и малонового альдегида) в соотношении навеска (г): экстрагент (мл) — 1 : 10, центрифугировали 10 мин при 3500 g (СМ-50, “Elmi”, Латвия). Надосадочную жидкость центрифугировали еще 10 мин при 8000 g и использовали для определения активности ферментов и уровня малонового диальдегида.

Определение активности ферментов и содержания малонового диальдегида. Активность пероксидазы (ПО) определяли микрометодом в 96-луночных планшетах (“Nunc”, США) по окислению (о-)фенилендиамина в присутствии H_2O_2 [14]. Оптическую плотность измеряли при длине волны 490 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader (“BioRad”, США). Активность ПО выражали в оптических ед./ (мг белка мин), что соответствовало количеству окисленного субстрата, вызывающего увеличение оптической плотности за 1 мин. Активность каталазы (КАТ) определяли в 96-луночных планшетах по методу, основанному на способности H_2O_2 образовывать с солями молибденовой кислоты стойкий окрашенный комплекс [14]. Для этого в лунки планшета к 150 мкл 0.03% раствора H_2O_2 добавляли 20 мкл супернатанта. Контрольная проба содержала 150 мкл воды. Реакцию останавливали добавлением 75 мкл 4% раствора молибдата аммония через 1 мин. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader (“BioRad”, США). Активность каталазы КАТ рассчитывали с использованием калибровочной кривой и выражали в мкмоль H_2O_2 / (мг сырой массы мин). Содержание белка определяли по методу Бредфорд [15].

Содержание малонового диальдегида (МДА) измеряли, используя метод Costa с соавт. [16], основанный на образовании окрашенного комплекса между МДА и тиобарбитуровой кислотой при нагревании. Измерение оптической плотности окрашенных растворов проводили на спектрофотометре Unicо 2800 (“United products and Instruments”, США) при длине волны 532 нм.

Определение содержания свободного пролина. Экстракцию и определение свободного пролина проводили по модифицированной методике Г.Н. Шихалеевой с соавт. [17], используя кислый нингидриновый реактив, приготовленный без нагревания: 1.25 г нингидрина (“Acros organics”, Бельгия) растворяли в 30 мл ледяной уксусной

кислоты и 20 мл 6 М раствора H_3PO_4 . Навеску свежей листовой пластины (200 мг) заливали 20 мл кипящей дистиллированной воды и выдерживали 10 мин на водяной бане при температуре 100°C. Затем в пробирку добавляли 2 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл нингидринового реактива и 2 мл приготовленного экстракта. Пробы инкубировали 20 мин на водяной бане при температуре 100°C, после чего быстро охлаждали до комнатной температуры на льду. Измеряли оптическую плотность продуктов реакции при длине волны 520 нм. Содержание пролина рассчитывали с помощью калибровочной кривой, используя в качестве стандарта пролин компании “Sigma” (США) [17].

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных программ пакета Microsoft Office, данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Достоверность различий между средними определяли по критерию Стьюдента при уровне значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние нефти на рост растений. Выявлено, что нефтяное загрязнение почвы приводило к ингибированию роста проростков пшеницы, который положительно зависел от концентрации нефти. Чем выше была концентрация нефти в почве, тем выше был токсический эффект. Так, у неинкулированных бактериями растений пшеницы длина надземной части при росте их в почве, загрязненной нефтью 1, 10, 50 г/кг была меньше на 7.3, 10.4 и 18.7%, соответственно, по сравнению с растениями, выросшими без нефти (табл. 1).

При отсутствии стресс-фактора инокуляция семян суспензией клеток штамма *B. subtilis* 26Д, а также линии *B. subtilis* 26Д^{тн}, толерантной к нефти, способствовала усилению ростовых характеристик проростков пшеницы на 10.0 и 14.9%, соответственно, по сравнению с неинкулированными растениями. Эти данные подтверждают ранее полученные результаты, где была обнаружена стимулирующая рост растений активность этого штамма бактерий *B. subtilis* 26Д [18].

Интересные результаты получены при анализе влияния бактерий на формирование стресс-толерантности растений пшеницы в отношении нефтяного загрязнения почвы. В условиях имитации нефтяного загрязнения у обработанных бактериями *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 26Д^{тн} растений длина надземной части была больше, чем у необработанных растений при концентрациях нефти 1, 10, 50 г/кг на 15.3, 12.4, 14.5% и на 18.7, 18.2, 26.4%, соответственно.

Таблица 1. Влияние обработки семян суспензией клеток *B. subtilis* на морфометрические показатели растений пшеницы сорта Омская 35 при разной концентрации нефти в почве

Концентрация нефти, г/кг почвы	Вариант инокуляции		
	Без инокуляции	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. subtilis</i> 26Д ⁺ ^н
Длина надземной части, см			
0	28.8 ± 2.0	31.7 ± 2.7	33.1 ± 1.5
1	26.7 ± 2.6	30.8 ± 1.4*	31.7 ± 1.9*
10	25.8 ± 1.7	29.0 ± 1.1*	30.5 ± 2.5*
50	23.4 ± 2.1	26.8 ± 2.0*	29.6 ± 2.0*
Длина корней, см			
0	6.6 ± 0.4	7.1 ± 0.5*	7.6 ± 0.7*
1	6.8 ± 0.6	8.2 ± 0.1*	8.9 ± 0.1*
10	5.3 ± 0.4	6.0 ± 0.1*	8.3 ± 0.2*
50	3.5 ± 0.1	5.1 ± 0.1*	6.2 ± 0.1*

Примечание. * Различия между показателями инокулированных и неинокулированных бактериями растений достоверны при $P \leq 0.05$.

Загрязнение почвы нефтью в концентрации 1 г/кг стимулировало рост корней как инокулированных, так и неинокулированных проростков пшеницы на фоне ингибирования роста надземной части. Высокий уровень нефтяного загрязнения (10 или 50 г нефти на кг почвы) приводил к ингибированию длины корней необработанных бактериями растений на 19.7 и 46.9%, соответственно, в сравнении с растениями, выросшими в почве без нефти. Анализ длины корней, находящихся в непосредственном контакте с загрязненной почвой, показал, что инокуляция семян бактериями снижала токсический эффект поллютанта.

При отсутствии нефти в почве у растений пшеницы, обработанных бактериями исходного штамма *B. subtilis* 26Д, длина корней была больше, чем у необработанных, на 7.5%, а при обработке семян линией *B. subtilis* 26Д⁺^н — на 15.1%. У растений, обработанных суспензией клеток штамма *B. subtilis* 26Д и линией *B. subtilis* 26Д⁺^н, длина корней проростков при концентрациях нефти 1, 10, 50 г/кг почвы была больше на 20.5, 13.2, 45.7% и 30.8, 56.6, 77.1%, соответственно, в сравнении с необработанными растениями, выросшими при тех же условиях.

Таким образом, отселектированная на толерантность к нефти линия бактерий *B. subtilis* 26Д⁺^н формировала у растений пшеницы более высокий уровень устойчивости к загрязнению почвы нефтью в сравнении с исходным штаммом *B. subtilis* 26Д.

Влияние нефтяного загрязнения почвы на активность про-/антиоксидантных ферментов и уровень МДА в растениях пшеницы. При имитации нефтяного загрязнения почвы активность КАТ в проростках пшеницы, обработанных бактериями, достоверно не отличалась от показателей неиноку-

лированных растений. В то же время, активность ПО в тканях побегов растений, обработанных эндифитом *B. subtilis* 26Д и растущих при отсутствии стресс-фактора, была выше на 4%. Интересно, что активность ПО в растениях, инокулированных линией бактерий *B. subtilis* 26Д⁺^н, достоверно не отличалась от этого показателя у контрольных растений (табл. 2).

У растений, неинокулированных бактериями, при росте в почве с нефтью наблюдали повышение активности ПО. Так, при концентрациях нефти 1, 10, 50 г/кг почвы активность ПО в надземной части растений была выше на 2.0, 9.5 и 11.5%, соответственно, по сравнению с растениями, растущими без нефти, что предполагает стрессовое воздействие поллютанта на растения. У растений, обработанных *B. subtilis* 26Д и растущих в почве с нефтью, активность пероксидазы была ниже или не отличалась от неинокулированных растений, растущих без токсиканта. У растений, обработанных линией бактерий *B. subtilis* 26Д⁺^н, активность пероксидазы при низких концентрациях нефти была выше, а при высоких — ниже, чем у неинокулированных растений, растущих без нефти (табл. 2).

Накопление МДА в тканях растений является одним из маркерных показателей развития стрессового воздействия [18, 19]. Как и следовало ожидать, при нефтяном загрязнении почвы в тканях проростков пшеницы уровень МДА повышался как в необработанных, так и в инокулированных бактериями растениях по сравнению с такими показателями в нормальных условиях. Вместе с тем, содержание МДА в побегах растений при нефтяном загрязнении (50 г/кг почвы), инокулированных *B. subtilis* 26Д и линией бактерий *B. subtilis* 26Д⁺^н, было, соответственно, на 16.7 и 43.5% ниже, чем у

Таблица 2. Влияние обработки семян суспензией клеток *B. subtilis* на активность каталазы и пероксидазы, содержание МДА в надземной части пшеницы в условиях нефтяного загрязнения почвы

Вариант инокуляции	Активность каталазы, мкМ H_2O_2 /(мг сырой массы мин)	Активность пероксидазы, оптических ед./ (мг белка мин)	Содержание МДА, мкмоль/г сырого веса
Без нефти (0 г/кг почвы)			
Без инокуляции	350.0 ± 29.1	25.2 ± 0.8	17.4 ± 0.4
<i>B. subtilis</i> 26Д	335.3 ± 14.5*	26.2 ± 0.9	20.9 ± 0.5*
<i>B. subtilis</i> 26Д ⁺	335.3 ± 13.5*	25.2 ± 0.6	22.5 ± 0.6*
Нефть (1 г/кг почвы)			
Без инокуляции	335.3 ± 11.2	27.2 ± 0.3	20.0 ± 0.6
<i>B. subtilis</i> 26Д	350.0 ± 28.0*	26.6 ± 0.6	25.8 ± 0.8*
<i>B. subtilis</i> 26Д ⁺	335.3 ± 10.6	26.8 ± 0.2	23.5 ± 0.7*
Нефть (10 г/кг почвы)			
Контроль	335.3 ± 10.2	27.4 ± 0.3	29.0 ± 0.9
<i>B. subtilis</i> 26Д	350.0 ± 20.1*	25.7 ± 0.5*	36.4 ± 1.0*
<i>B. subtilis</i> 26Д ⁺	335.3 ± 10.4	25.3 ± 0.6*	25.4 ± 0.8*
Нефть (50 г/кг почвы)			
Без инокуляции	350.0 ± 20.1	27.9 ± 1.1	51.9 ± 1.3
<i>B. subtilis</i> 26Д	320.7 ± 13.1*	25.5 ± 1.0*	43.2 ± 1.1*
<i>B. subtilis</i> 26Д ⁺	320.7 ± 12.2*	23.6 ± 0.8*	29.3 ± 0.7*

Примечание. * Различия между показателями инокулированных и неинокулированных бактериями растений достоверны при $P \leq 0.05$.

неинокулированных растений при той же концентрации нефти. Пониженное содержание МДА в тканях растений, инокулированных эндофитами, по сравнению с неинокулированными эндофитом опытными растениями предполагает снижение стрессового воздействия на растения с участием бактериальных клеток.

Влияние нефтяного загрязнения почвы на уровень пролина в проростках. Известно, что пролин является одной из важных аминокислот, накопление которой сопровождается процессом адаптации растений к стрессовому фактору [19, 20]. Соответственно, как видно из таблицы 3, содержание пролина в проростках растений пшеницы, инокулированных клетками *B. subtilis* штамма 26Д или линией бактерий *B. subtilis* 26Д⁺, было больше в сравнении с неинокулированными проростками (табл. 3). В условиях нефтяного загрязнения содержание пролина в тканях растений увеличивалось по мере возрастания концентрации поллютанта в почве (табл. 3). У необработанных бактериями растений при концентрации нефти 1, 10, 50 г/кг почвы содержание пролина повышалось на 33.0, 53.7, 80.5%, соответственно, по сравнению с растениями, растущими без нефти. У обработанных клетками *B. subtilis* 26Д растений уровень пролина повышался так же, как и у неинокулированных, однако показатели пролина при концентрации нефти 1, 10, 50 г/кг почвы были выше у

инокулированных растений на 46.8, 76.6, 63.0%, соответственно, чем у неинокулированных при тех же условиях. У растений, обработанных линией бактерий *B. subtilis* 26Д⁺, уровень пролина повышался, и при концентрациях нефти в почве 1, 10, 50 г/кг был выше на 40.7, 83.9, 87.0%, соответственно, в сравнении с неинокулированными растениями при тех же условиях.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, небольшие концентрации нефтепродуктов в почве не оказывают сильного негативного влияния на растения [1, 21–27]. Например, при низкой концентрации сырой нефти в почве (1 г/кг) наблюдали даже стимуляцию роста корней как у растений, инокулированных бактериями *B. subtilis* штамма 26Д, так и у растений, инокулированных бактериями штамма *B. subtilis* 26Д⁺. Предполагается, что такой стимулирующий эффект на растения низких концентраций нефтепродуктов, отмеченный нами в этой работе и рядом исследователей [1, 21–27], может быть связан с деградацией углеводов бактериями и высвобождением питательных веществ из нефти.

Содержание нефтепродуктов более 1 кг/м² может привести к гибели растений [21–27]. Полагают, что такой эффект обусловлен анаэробными, гидрофобными условиями, создаваемыми загрязня-

Таблица 3. Влияние обработки семян суспензией клеток *B. subtilis* на содержание пролина (мкмоль/г сырой массы) в тканях надземной части растений пшеницы при разной концентрации нефти в почве

Концентрация нефти, г/кг почвы	Содержание пролина, мкмоль/г сырой массы		
	Без инокуляции	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. subtilis</i> 26Д ⁺
0	30.3 ± 2.3	51.2 ± 3.0*	53.0 ± 2.9*
1	40.3 ± 3.2	59.2 ± 2.7*	56.7 ± 2.6*
10	46.6 ± 2.4	82.3 ± 3.1*	85.7 ± 2.9*
50	54.7 ± 2.9	89.2 ± 2.9*	102.3 ± 3.2*

Примечание. * Различия между показателями инокулированных и неинокулированных бактериями растений достоверны при $P \leq 0.05$.

ющими веществами. Сильное загрязнение почвы нефтепродуктами может привести к обширной деградации растительного покрова вплоть до его полного исчезновения [21–29]. Поверхностное загрязнение почвы не только ограничивает или ухудшает условия роста растений, но и снижает ценность, технологическую и пищевую пригодность урожая растений [21–25]. Действительно, и в нашей работе мы наблюдали подавление ростовых характеристик растений пшеницы на почвах, загрязненных сырой нефтью.

В связи с формированием адаптивных свойств растений к активно меняющимся условиям окружающей среды, в том числе и антропогенного характера, в последние десятилетия большое внимание стали уделять роли микроорганизмов, формирующих с растениями симбиотические и эндофитные взаимоотношения. Эти растительно-микробные ассоциации благоприятны для обоих партнеров и способствуют экологическому балансу между ними. Использование бактерий, способных стимулировать рост растений и разлагать углеводороды нефти, имеет важные преимущества для растений в таких неблагоприятных условиях [24]. Эндофиты, как известно, обитают в тканях растений без какого-либо заметного вредного воздействия на своего хозяина, и многочисленные исследования доказывают их фитоадаптивный потенциал [18, 19, 24, 29]. Вследствие способности стимулировать ростовые показатели растений, они способствуют лучшей адаптации хозяина к стрессовым факторам среды обитания; облегчают доступность азота, фосфора и железа; вырабатывают фитогормоны и индуцируют защитный потенциал растений [18, 19, 24, 27, 29]. Обнаружено, что эндофиты могут непосредственно повышать толерантность растений к загрязняющим веществам, вырабатывая ферменты и биосурфактанты, а также другие метаболиты, деградирующие и/или снижающие токсический эффект поллютантов. Так, многие бактерии, в том числе и эндофиты, способны разлагать органические компоненты сырой нефти и нефтепродуктов, например, дизельного топлива —

н-гексадекан, фенантрен, флуорен, нафталин, тринитротолуол [3–7, 21–24, 30–33].

Наиболее важным механизмом стимулирования роста растений эндофитными бактериями, в том числе и *B. subtilis*, является продукция ауксинов, цитокининов [34], а также дезаминазы аминокислот пропан-1-карбоновой кислоты (АСС-дезаминазы) [25–27]. Применение таких продуцирующих биологически активные соединения штаммов может способствовать улучшению пролиферации и удлинению корней, что имеет решающее значение во время фиторемедиации, а также для роста и развития важных с экономической точки зрения сельскохозяйственных культур [2–4, 6, 7].

Следует отметить, что исходный штамм *B. subtilis* 26Д и толерантная к сырой нефти линия бактерии *B. subtilis* 26Д⁺ проявляли антистрессовый эффект на рост растений. При этом более высокие показатели роста в условиях нефтяного загрязнения были у растений, инокулированных бактериями *B. subtilis* 26Д⁺, чем при инокуляции исходным штаммом. Как отмечено выше, загрязнение почвы нефтепродуктами приводило к подавлению роста растений пшеницы. Вместе с тем, бактерии способствовали лучшему состоянию ростовых показателей инокулированных растений в сравнении с неинокулированными. Вероятно, приобретенная в результате роста бактерий на среде с нефтепродуктами толерантность способствовала тому, что такая линия оказалась способна лучше стимулировать определенные ростовые характеристики растений в условиях нефтяного загрязнения.

Известно, что стрессовые факторы приводят к накоплению АФК, вызывающих окислительный стресс, связанный с воздействием на молекулярные и клеточные структуры супероксид-анион радикала, гидроксильного радикала, синглетного кислорода, перекиси водорода и других соединений. Активация таких ферментов про-/антиоксидантной системы как пероксидаза и каталаза в условиях развития стрессового фактора способствует уменьшению степени окислительного повреждения [1, 3, 27, 29]. Вместе с тем, заметного

изменения активности КАТ в условиях нефтяного загрязнения не наблюдали в тканях растений пшеницы, как неинокулированных бактериями, так и инокулированных. В то же время, активность ПО в растениях пшеницы, как было сказано выше, повышалась с ростом концентрации нефти только у неинокулированных бактериями растений. У инокулированных бактериями штамма *B. subtilis* 26Д растений этот показатель, так же как и каталаза, практически не изменялся, за исключением растений, которые росли при низких концентрациях нефти. Известно также, что при действии слабой и средней степени абиотических стрессов активность антиоксидантных систем повышается, а при дальнейшем увеличении силы стресса наблюдается уменьшение активности защитных ферментов [19–21, 24].

Содержание МДА, являющегося конечным продуктом перекисного окисления липидов клеточных мембран и одним из важных признаков их повреждения при действии стресса, в отсутствие инокуляции семян увеличивалось в тканях побегов растений с повышением концентрации нефти в почве. При этом инокуляция семян этих растений клетками как бактерий *B. subtilis*, так устойчивыми к нефти бактериями способствовала снижению уровня МДА в сравнении с необработанными растениями, подвергнутыми действию стресса. У растений, обработанных линией бактерий *B. subtilis* 26Д^н, уровень МДА был значительно ниже, чем у растений, обработанных обычным штаммом.

Известно, что пролин участвует в стабилизации белков, мембран и субклеточных структур при действии стрессов и может служить фактором уменьшения уровня АФК, что позволяет растениям противостоять различным негативным факторам [19, 20]. Наши исследования показали, что под влиянием бактерий накопление пролина в инокулированных растениях происходило больше, чем у неинокулированных. Обработка семян растений линией бактерий *B. subtilis* 26Д^н увеличивала уровень пролина в тканях побегов почти в два раза в сравнении с вариантом инокуляции семян обычным диким штаммом.

Ризосферные микроорганизмы, ассоциированные с растениями и улучшающие их рост, синтезируют ряд внеклеточных метаболитов, в том числе биосурфактантов, представляющих собой биоразлагаемые, нетоксичные и не накапливающиеся в окружающей среде поверхностно-активные соединения [30–34]. За счет выработки таких соединений бактерии характеризуются способностью снижать токсичность почвы, удаляя (деградируя или сорбируя) загрязняющие вещества. Биосурфактанты повышают биодоступность гидрофобных органических соединений, что делает их хорошим средством для очистки окружающей среды и восстановления ее экологической состав-

ляющей. Они могут эмульгировать жидкие загрязнители неводной фазы или повышать их растворимость. Эти особенности способствуют выносу загрязняющих веществ из твердой фазы и позволяют микроорганизмам, адсорбированным на почвенных частицах, получить доступ к молекуле поллютанта [30–34]. Бактерии штамма *B. subtilis* 26Д, как известно [32], вырабатывают сурфактин, который наиболее эффективно снижает поверхностное натяжение жидкостей даже в неблагоприятных экстремальных условиях [35]. Доказано, что *B. subtilis* 26Д является источником двух изоформ сурфактина (с длинами жирнокислотных цепей C13 и C15) [32], с чем, вероятно и была связана повышенная толерантность растений, инокулированных этим штаммом, к произрастанию на почвах, загрязненных сырой нефтью. Можно полагать, что способность эндофитных штаммов бактерий продуцировать биосурфактанты, повышающие биодоступность гидрофобных компонентов в почве и их дальнейшую биodeградацию [30–34], является одним из важных факторов, позволяющих формировать толерантность растений к нефтяному загрязнению почвы.

Следует также отметить, что сурфактин воспринимается растением как элиситор и стимулирует защитные механизмы растений, индуцируя экспрессию различных генов, кодирующих противомикробные соединения, регуляторы окислительного стресса и ферменты, участвующие в передаче защитных сигналов [33, 36, 37]. Сурфактин, продуцируемый эндофитными штаммами, вероятно, способствует росту растений и косвенно стимулирует иммунитет растений, повышая устойчивость растений-хозяев к стрессовому фактору.

Загрязнение почв сырой нефтью, кроме негативного токсического воздействия на растения, вызывает развитие различных абиотических стрессовых факторов (осмотический, солевой, анаэробный, окислительный и др.) [1]. Ранее было показано, что эндофитные бактерии *B. subtilis* 26Д способны оказывать протекторный эффект на растения при различных видах таких стрессов [19, 20, 29]. Соответственно, повышение устойчивости растений к нефтяному загрязнению почвы при помощи эндофитного штамма *B. subtilis* 26Д и, в особенности, толерантности к нефти линии *B. subtilis* 26Д^н может быть обусловлено их комплексной биологической активностью.

Таким образом, наши исследования показали, что почва, загрязненная нефтепродуктами, фитотоксична для растений пшеницы. Инокуляция семян растений линией *B. subtilis* 26Д снижает развитие окислительного стресса в условиях воздействия на растения нефтяного загрязнения и способствует стимуляции роста растений. Протекторный эффект эндофитного штамма *B. subtilis* 26Д^н по отношению к растениям пшеницы при

действию на них сырой нефти может быть повышен путем проведения “ускоренной селекции бактерий” на толерантность к поллютантам, поступающим при нефтяном загрязнении. Эти свойства эндوفитного штамма *B. subtilis* 26Д⁺ могут обеспечить многообещающие перспективы для их применения в качестве потенциальных агентов для биоремедиации окружающей среды, загрязненной углеводородами. Кроме того, способность биосурфактанта стимулировать рост растений может быть использована для стимуляции роста растений на участках, загрязненных углеводородами, и для возврата ряда из них в хозяйственный оборот.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Odukoya J., Lambert R., Sakrabani R. Understanding the impacts of crude oil and its induced abiotic stresses on agrifood production: A review // *Horticulturae*. 2019. V. 5. Art. 47. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5020047>
2. Alotaibi F., St-Arnaud M., Hijri M. In-depth characterization of plant growth promotion potentials of selected alkanes-degrading plant growth-promoting bacterial isolates // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Art. 863702. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.863702>
3. Kanwal M., Ullah H., Gulzar A., Sadiq T., Gul Z., Ullah M., Sarfraz M., Aslam M.A., Khan N.N., Batool T., Maqsood S., Nawaz A. Biodegradation of petroleum hydrocarbons and the factors effecting rate of biodegradation // *Am. J. Biomed. Sci. Res.* 2022. V. 16. P. 6 <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2022.16.002182>
4. Da Silva Correa H., Blum C.T., Galvão F., Maraho L.T. Effects of oil contamination on plant growth and development: a review // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2022. V. 29. P. 43501. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19939-9>
5. Arellano P., Tansey K., Balzter H., Tellkamp M. Plant family-specific impacts of petroleum pollution on biodiversity and leaf chlorophyll content in the amazon rainforest of Ecuador // *PLoS ONE*. 2017. V. 12. Art. e0169867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169867>
6. Lumactud R., Shen S.Y., Lau M., Fulthorpe R. Bacterial endophytes isolated from plants in natural oil seep soils with chronic hydrocarbon contamination / *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 755. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00755>
7. Pawlik M., Płociniczak T., Thijs S., Pintelon I., Vangronsveld J., Piotrowska-Seget Z. Comparison of two inoculation methods of endophytic bacteria to enhance phytodegradation efficacy of an aged petroleum hydrocarbons polluted soil // *Agronomy*. 2020. V. 10. Art. 1196. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081196>
8. Hwang H.-H., Chien P.-L., Huang F.-C., Yeh P.-H., Hung S.-H.W., Deng W.-L., Huang C.-C. A plant endophytic bacterium *Priestia megaterium* StrainBP-R2 isolated from the halophyte *Bolboschoenus planiculmis* enhances plant growth under salt and drought stresses // *Microorganisms*. 2022. V. 10. Art. 2047. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102047>
9. Ha-Tran D.M., Nguyen T.T.M., Hung S.H., Huang E., Huang C.C. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: A review // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 2. Art. 3154. <https://doi.org/10.3390/ijms22063154>
10. Mohammadipanah F., Zamanzadeh M. Bacterial mechanisms promoting the tolerance to drought stress in plants // *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms* / Eds. H. Singh et al. Springer: Singapore. 2019. P. 185. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_10
11. Fadji A.E., Babalola O.O. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. Art. 467. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00467>
12. Захарченко М.В., Люшин М.М., Мустафина Э.А. Соединения металлов в нефтях месторождений Оренбуржья // *Нефтегазохимия*. 2016. Т. 1. С. 61.
13. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.
14. Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Roles of ethylene and cytokinins in development of defense responses in *Triticum aestivum* plants infected with *Septoria nodorum* // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 609. <https://doi.org/10.1134/S1021443716050150>
15. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
16. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons // *Plant Sci.* 2002. V. 162. P. 939.
17. Шихалеева Г.Н., Будняк А.К., Шихалеев И.И., Иващенко О.Л. Модифицированная методика определения пролина в растительных объектах // *Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: біологія*. 2014. Т. 21. С. 168.
18. Курамшина З.М., Хайруллин Р.М., Смирнова Ю.В. Сортовая отзывчивость *Triticum aestivum* L. на инокуляцию клетками эндوفитных штаммов *Bacillus subtilis* // *Российская сельскохозяйственная наука*. 2019. Т. 6. С. 3. <https://doi.org/10.31857/S2500-2627201963-6>
19. Kuramshina Z.M., Khairullin R.M. Endophytic strains of *Bacillus subtilis* promote drought resistance of plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2023. V. 70 (45). P. 259. <https://doi.org/10.1134/S1021443722603172>
20. Kuramshina Z.M., Khairullin R.M. Improving salt stress tolerance of *Triticum aestivum* L. with endophytic strains of *Bacillus subtilis* // *Russ. J. Plant Physiol.* 2023. V. 70 (53). P. 293. <https://doi.org/10.1134/S1021443722603068>
21. Ziółkowska A., Wyszowski M. Toxicity of petroleum substances to microorganisms and plants // *Ecol. Chem. Eng. S.* 2010. V. 17. P. 73.

22. da Silva Correa H., Blum C.T., Galvão F., Maranhão L.T. Effects of oil contamination on plant growth and development: a review // Environ. Sci. Pollut. Res. 2022. V. 29. Art. 43501.
<https://doi.org/10.1007/s11356-022-19939-9>
23. Hidalgo K.J., Sierra-Garcia I.N., Dellagnezze B.M., de Oliveira V.M. Metagenomic insights into the mechanisms for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the oil supply chain // Front. Microbiol. 2020. V. 11 Art. 561506.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561506>
24. Pawlik M., Cania B., Thijs S., Vangronsveld J., Piotrowska-Seget Z. Hydrocarbon degradation potential and plant growth-promoting activity of culturable endophytic bacteria of *Lotus corniculatus* and *Oenothera biennis* from a long-term polluted site // Environ. Sci. Pollut. Res. 2017. V. 24. P. 19640.
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-9496-1>
25. Antoszewski M., Mierek-Adamska A., Dąbrowska G.B. The Importance of microorganisms for sustainable agriculture-a review // Metabolites. 2022. V. 12. Art. 1100.
<https://doi.org/10.3390/metabo12111100>
26. Mitter E. R.K., Kataoka R., de Freitas J. R., Germida J.J. Potential use of endophytic root bacteria and host plants to degrade hydrocarbons // Int. J. Phytoremediation. 2019. V. 21. Art. 9.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1583637>
27. Liu Y., Morelli M., Koskimäki J.J., Qin S., Zhu Y.-H., Zhang X.X. Editorial: Role of endophytic bacteria in improving plant stress resistance // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. Art. 1106701.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1106701>
28. Gkorezis P., Daghighi M., Franzetti A., Van Hamme J.D., Sillen W., Vangronsveld J. The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 1836.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01836>
29. Kuramshina Z.M., Smirnova Y.V., Khairullin R.M. Increasing *Triticum aestivum* tolerance to cadmium stress through endophytic strains of *Bacillus subtilis* // Russ. J. Plant. Physiol. 2016. V. 63. P. 636.
<https://doi.org/10.1134/S1021443716050083>
30. Marchut-Mikolajczyk O., Drożdżyński P., Pietrzyk I D., Antczak T. Biosurfactant production and hydrocarbon degradation activity of endophytic bacteria isolated from *Chelidonium majus* L. // Microb. Cell Fact. 2018. V. 17. Art. 171.
<https://doi.org/10.1186/s12934-018-1017-5>
31. Peele A., Vekateswarulu T.C. Tammineedi J., Kanumuri L. Ravuru B.K., Dirisala V.R., Kodali V.P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution - a review // Petroleum. 2018. V. 4. P. 241.
32. Черепанова Е.А., Галютдинов И.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. Выделение и идентификация липопептидов штамма *Bacillus subtilis* 26Д // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. С. 496.
<https://doi.org/10.31857/S0555109921050032>
33. Maksimov I.V., Singh B.P., Cherepanova E.A. Burkhanova G.F., Khairullin R.M. Prospects and applications of lipopeptide-producing bacteria for plant protection (Review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. P. 15.
<https://doi.org/10.1134/S0003683820010135>
34. Sorokan A., Veselova S., Benkovskaya G., Maksimov I. Endophytic strain *Bacillus subtilis* 26D increases levels of phytohormones and repairs growth of potato plants after colorado potato beetle damage // Plants. 2021. V. 10. Art. 923.
<https://doi.org/10.3390/plants10050923>
35. Нафикова А.Р., Сурина О.Б., Хайруллин Р.М., Максимов И.В. Влияние метаболитов штаммов 26Д и 11ВМ бактерии *Bacillus subtilis* на рост проростков и каллусов пшеницы // Агрохимия. 2018. Т. 5. С. 39.
<https://doi.org/10.7868/s000218811805006x>
36. Le Mire G., Siah A., Brisset M.-N., Gaucher M., Deleu M., Jijakli M.H. Surfactin protects wheat against *Zymoseptoria tritici* and activates both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent defense responses // Agriculture. 2018. V. 8. Art. 11.
<https://doi.org/10.3390/agriculture8010011>
37. Pršić J., Ongena M. Elicitors of plant immunity triggered by beneficial bacteria // Front. Plant Sci. 2022. V. 11. Art. 594530.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.594530>