УДК 579.69:622 || EDN: ZSFSXX
CC BY-NC 4.0
© Н.В. Фотина и соавт.; ФНИ «XXI век»

РАЗРАБОТКА МИКРОБНОГО КОНСОРЦИУМА НА ОСНОВЕ PSEUDOMONAS И ACINETOBACTER ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ ТЕХНОГЕННЫХ ПОЧВ

Н.В. Фотина*, Ю.Р. Серазетдинова, Е.Р. Фасхутдинова, И.С. Милентьева, Л.К. Асякина, Е.А. Жидкова

[1]Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

Эл. почта: fotina.natashenka@mail.ru

Статья поступила в редакцию 07.05.2026; принята к печати 04.08.2026

Техногенно нарушенные грунты угольных отвалов характеризуются низкой биологической активностью, дефицитом питательных веществ и повышенным содержанием тяжёлых металлов, что затрудняет их естественное восстановление. В этих условиях перспективным направлением является применение ростостимулирующих бактерий, способствующих лучшей адаптации растений к неблагоприятным факторам грунтов угольных отвалов. Целью работы являлось выделение и характеристика бактерий из техногенных почв, а также разработка микробных консорциумов для повышения устойчивости растений и ускорения процессов биоремедиации. Из образца техногенно нарушенного грунта, отобранного на территории угольного отвала в Кемеровской области-Кузбассе, выделены 8 штаммов микроорганизмов. Штаммы существенно различались по способности продуцировать метаболиты, восстанавливающие 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (индикатор антиоксидантной активности), и фитогормоны индолил-3-уксусную и гиббереллиновую кислоты. На основании многофакторного ранжирования этих показателей биологической активности отобраны пять наиболее эффективных штаммов. Анализ биосовместимости позволил выявить штаммы, пригодные для совместного культивирования. Ими по результатам видовой идентификации методом секвенирования вариабельных участков 16S-рРНК оказались *Pseudomonas donghuensis* штамм В-14444; *P. donghuensis* штамм В-14445; *Acinetobacter calcoaceticus* штамм В-14440. Оценка биологической активности сконструированных консорциумов показала, что наиболее перспективным является консорциум *P. donghuensis* В-14444, *P. donghuensis* В-14445 и *A. calcoaceticus* В-14440 в соотношении 1:1:2. Полученные результаты подтверждают перспективность использования новых выделенных штаммов и консорциумов на их основе для биоремедиации техногенно нарушенных почв и повышения устойчивости растений к стрессовым факторам.

***Ключевые слова**: биоремедиация, техногенные почвы, ростостимулирующие бактерии, микробные консорциумы, антиоксидантная активность, индолил-3-уксусная кислота, гиббереллиновая кислота.*

DEVELOPMENT OF A MICROBIAL CONSORTIUM BASED ON PSEUDOMONAS AND ACINETOBACTER FOR REMEDIATION OF MAN-MADE SOILS

N.V. Fotina*, Y.R. Serazetdinova, E.R. Faskhutdinova, I.S. Milentyeva, L.K. Asyakina, E.A. Zhidkova

Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

Email: fotina.natashenka@mail.ru

Anthropogenically disturbed soils of coal dumps feature low biological activity, nutrient deficiency, and high heavy metals contents, which hamper their natural recovery. In these conditions, a promising approach is the use of growth-stimulating bacteria that promote plants adaptation to the adverse factors of coal dumps soils. The aim of the present work was to isolate and characterize bacteria from man-made soils, as well as to develop microbial consortia effective in increasing plant resistance and accelerating bioremediation processes. Eight strains of microorganisms were isolated from a sample of disturbed soil taken from a coal dump in the Kemerovo region (Kuzbass). The strains differed significantly in their ability to produce metabolites that reduce 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (an indicator of antioxidant activity) and the phytohormones indole-3-acetic acid and gibberellic acid. Based on a multifactorial ranking of these indicators of biological activity, five of the most effective strains were selected. Using sequencing of the variable 16S rRNA sites, these strains were identified as *Pseudomonas donghuensis* strain B-14444; *P. donghuensis* strain B-14445; and *Acinetobacter calcoaceticus* strain B-14440. Assessing the biological activity of the constructed consortia showed that the most promising is the consortium of *P. donghuensis* B-14444, *P. donghuensis* B-14445, and *A. calcoaceticus* B-14440 at a ratio of 1:1:2. The results confirm the promise of using the newly isolated strains and their consortia for bioremediation of anthropogenically disturbed soil and for improving plant resistance to stress.

***Keywords:** bioremediation, man-made soils, growth-stimulating bacteria, microbial consortia, antioxidant activity, indolyl-3-acetic acid, gibberellic acid.*

Введение

Кемеровская область-Кузбасс, будучи одним из ведущих горнодобывающих центров России (свыше 150 действующих предприятий), характеризуется существенными изменениями структуры землепользования. Масштабная промышленная эксплуатация угольных месторождений сопряжена со значительным изъятием земель из природного цикла и созданием обширных техногенных ландшафтов, таких как карьеры, отвалы вскрышных пород [6]. Указанные антропогенные формы рельефа при отсутствии сформированного почвенно-растительного слоя оказывают негативное влияние на экологическое состояние окружающей среды [19, 32]. Физико-химические свойства техногенных грунтов угольных карьеров – низкая влагоемкость, дефицит биогенных элементов и слабая структурированность – препятствуют естественному возобновлению растительного покрова и снижают интенсивность процессов почвообразования [20]. Отсутствие сформированного растительного покрова выступает фактором интенсификации эрозионных процессов, нарушения гидрологического баланса и потери устойчивости склонов, что обуславливает прогрессирующую деградацию экосистем [22].

В структуре нарушенных ландшафтов особое значение имеют отвалы вскрышных пород и хвостохранилища. Занимая обширные территории, такие техногенные объекты оказывают системное негативное воздействие на биогеоценозы. Они характеризуются минимальной биологической активностью, неблагоприятными физико-химическими параметрами, что снижает интенсивность процессов спонтанной сукцессии и самовосстановления [23].

Эффективность восстановления техногенно измененных земель во многом определяется созданием качественного почвенного слоя, способного поддерживать минеральное питание флоры и обеспечивать стабильный режим влагозадержания. Таким образом, объективная оценка качества техногенных почв и понимание механизмов их формирования являются фундаментальными условиями для разработки программ рекультивации. Согласно современным исследованиям, для вовлечения подобных территорий в хозяйственный или природный оборот нужен комплексный подход, в структуре которого важное значение приобретают биологические методы, направленные на активизацию природных процессов восстановления [2].

В структуре биологической стадии рекультивации актуализируется применение биоремедиации – специализированной технологии восстановления почвенного покрова, основывающейся на применении микроорганизмов. Благодаря высокой метаболической пластичности, микроорганизмы способны использовать широкий спектр веществ в качестве источника энергии и углерода, адаптируясь к экстремальным условиям техногенных ландшафтов [21]. В ходе ферментативных реакций микробные сообщества трансформируют токсичные соединения в безопасные продукты, такие как вода и углекислый газ, которые затем включаются в природные биогеохимические циклы [10].

Помимо детоксикации среды, микроорганизмы выполняют ряд ключевых экосистемных функций, необходимых для формирования почвы. Они участвуют в разложении органических остатков и синтезе гумусовых веществ, способствуют накоплению доступных форм азота, фосфора и других элементов питания, а также выделяют органические кислоты и полисахариды, улучшающие структуру техногенной почвы и ее влагоудерживающую способность [13]. Микроорганизмы играют важную роль в процессе биовыветривания горных пород, при котором микробные метаболиты ускоряют разрушение минеральной матрицы и высвобождение питательных элементов [12].

Особое значение имеет взаимодействие микроорганизмов с растениями. В ризосфере формируются сложные симбиотические системы, в которых микроорганизмы стимулируют рост растений, повышают их устойчивость к неблагоприятным условиям и способствуют успешной колонизации техногенных субстратов [26]. К таким микроорганизмам относятся ростостимулирующие бактерии, способствующие развитию растений, микоризные грибы и азотфиксирующие бактерии. Они способны синтезировать фитогормоны, повышать доступность элементов питания, защищать растения от стрессов и патогенов, что существенно увеличивает приживаемость растительности на отвалах [14].

Для практической реализации биоремедиации применяются как специально подобранные консорциумы микроорганизмов, так и аборигенная микрофлора, естественно сформированная в условиях техногенных субстратов. Последняя обладает существенным преимуществом, поскольку адаптирована к экстремальным условиям среды и способна эффективно функционировать без дополнительной акклиматизации [17]. Совместное взаимодействие различных групп микроорганизмов в составе консорциумов повышает устойчивость биосистем к неблагоприятным факторам и ускоряет восстановительные процессы [7].

Таким образом, для регионов с интенсивной горнодобывающей нагрузкой, к которым относится Кузбасс, применение микробных технологий рассматривается как одно из наиболее перспективных направлений рекультивации. Микроорганизмы играют фундаментальную роль на начальных стадиях почвообразования: они способствуют накоплению органического вещества, улучшению структуры субстрата и формированию благоприятных условий для последующего развития растительного покрова.

Цель исследования – конструирование микробных консорциумов на основе аборигенных штаммов техногенно нарушенных грунтов Кузбасса для улучшения роста растений на биологическом этапе рекультивации.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись бактерии, выделенные из образцов техногенно нарушенного грунта, отобранного на территории угольного отвала в Кемеровской области-Кузбассе (рис. 1). Отбор осуществляли в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-2017 «Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа».

Для выделения бактерий в стерильной ступке растирали 1 г отобранного образца и вносили в пробирку с 5 мл стерильной дистиллированной воды. Пробирку инкубировали в шейкере-инкубаторе LSI-3016R («Daihan Labtech», Южная Корея) в течение 1,5 ч при температуре 25–30 °С. Далее осуществляли посев 5 мл полученной суспензии в 50 мл мясопептонного бульона следующего состава, г/л: мясной экстракт («Pronadisa Conda», Испания) – 11,0; пептон («ЛенРеактив», Россия) – 10,0; натрий хлористый («ЛенРеактив», Россия) – 5,0. Культивирование проводили при температуре 25–30 °С в течение 18–24 ч. Из культуральной жидкости осуществляли пересев разведением 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12} глубинным способом в чашки Петри на среду следующего состава, г/л: мясной экстракт – 11,0; пептон – 10,0; натрий хлористый – 5,0; мальтоза («HiMedia Laboratories», Индия) – 5,0; аммоний сернокислый («ЛенРеактив», Россия) – 3,0; натрий лимоннокислый («ЛенРеактив», Россия) – 3,0; магний сернокислый («ChemExpress», Россия) – 0,5; калий фосфорнокислый однозамещенный («ChemExpress», Россия) – 0,4; кальций хлористый («Компонент реактив», Россия) – 0,2; марганец сернокислый («Химлабприбор», Россия) – 0,1; железо II сернокислое («ChemExpress», Россия) – 0,01; цинк сернокислый («ЛенРеактив», Россия) – 0,005; медь сернокислая («ЛенРеактив», Россия) – 0,001; агар-агар («ЛенРеактив», Россия) – 20,0 [3]. Культивировали при 28–30 °С в течение 18–24 ч. Затем для получения чистых культур осуществляли серию пересевов методом истощающего штриха на среду мясопептонный агар следующего состава, г/л: мясной экстракт – 11,0; пептон – 10,0; натрий хлористый – 5,0; агар-агар – 15.

Определение способности штаммов продуцировать метаболиты, восстанавливающие 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (далее DPPH). Для этого готовили суспензию исследуемой чистой культуры в 3 мл стерильного физиологического раствора до коэффициента мутности по МакФарланду, равного 0,8–1,0 (титр микроорганизмов $1{,}5\times10^{8}$ КОЕ/мл), определяемого с помощью денситометра Densichek plus (Sendle, Россия). Далее 1 мл полученной суспензии вносили в 10 мл мясопептонного бульона с добавлением 0,3 г/л L-триптофана («Химмед», Россия). Культивировали на шейкере-инкубаторе в течение 48 ч при температуре 25–30 °С и 110 об/мин. Отделяли культуральную жидкость от клеток с помощью центрифугирования при 8000 об/мин в течение 10 мин. Далее бесклеточную культуральную жидкость и реактив DPPH (кон-



Рис. 1. Территория угольного отвала для отбора образцов грунта (Кемеровская область)

центрация DPPH в 0,079 г/л в 96 % этаноле) смешивали в соотношении 1:3 и оставляли на 30 минут в темном месте. Оптическую плотность определяли при длине волны 517 нм на спектрофотометре UV 1800 («Shimadzu», Япония). В качестве контроля использовали культуральную жидкость с 95% спиртом ($К_1$), питательную среду с реактивом DPPH ($К_2$) и питательную среду с 95% спиртом ($К_3$) в соотношении 1:3 [9]. Степень восстановления DPPH рассчитывали по формуле 1.

$$X=1-\frac{(ОП_{об}-ОП_{К1})}{(ОП_{К2}-ОП_{К3})}\times 100 \quad (1)$$

где: X – степень восстановления DPPH, %; $ОП_{об}$ – оптическая плотность образца; $ОП_{К1}$ – оптическая плотность $К_1$; $ОП_{К2}$ – оптическая плотность $К_2$; $ОП_{К3}$ – оптическая плотность $К_3$; 100 % – пересчет на проценты.

Для определения количества синтезируемой индолил-3-уксусной кислоты готовили бесклеточную культуральную жидкость чистой культуры по методике, указанной в анализе антиоксидантной активности. К 1 мл бесклеточной культуральной жидкости добавляли 1 мл реактива Сальковского. Спустя 30 мин измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 535 нм. Количество синтезируемой индолил-3-уксусной кислоты определяли по калибровочному графику стандартного раствора индолил-3-уксусной кислоты («Диа-М», Россия) в пределах от 50 до 200 мкг/мл [11].

Для определения количества синтезируемой гиббереллиновой кислоты к 2 мл бесклеточной культуральной жидкости, полученной по методике в анализе антиоксидантной активности, добавляли по 280 мкл 1 М ацетата цинка («ЛенРеактив», Россия) и 10,6% раствора ферроцианида III калия («ЛенРеактив», Россия), энергично встряхивали. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 4500 об/мин. Получившийся супернатант смешивали с 30% соляной кислотой в соотношение 1:1 и выдерживали 75 минут. Оптическую плотность измеряли по отношению к 5% соляной кислоте на спектрофотометре при длине волны 254 нм [4].

Для оценки показателей биологической активности выделенных штаммов микроорганизмов осуществляли их ранжирование (табл. 1).

Для изучения биосовместимости чистые культуры выращивали на мясопептонном бульоне при температуре 28–30 °С в течение 48 ч. После культивирования культуральную жидкость центрифугировали в течение 10 мин. при 8000 об/мин. На мясопептонный бульон в чашках Петри наносили тест-культуру, в лунки диаметром 4 мм вносили супернатант и культивировали при температуре 25–30 °С в течение 24 ч. В данном исследовании каждый штамм изучался и в качестве тест-культуры, и в качестве вносимого в лунки супернатанта. Штаммы считались биосовместимыми при отсутствии зоны ингибирования роста тест-культуры вокруг лунки [1].

Молекулярно-генетическая идентификация отобранных бактериальных штаммов выполнена сотрудниками Национального биоресурсного центра – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» (НБЦ ВКПМ) на договорной основе в рамках оказания платных услуг. Идентификация проводилась на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена, кодирующего 16S рРНК. Исследуемые культуры предварительно рассевали до получения изолированных колоний, после чего накапливали биомассу и выделяли геномную ДНК. Фрагмент гена 16S рРНК амплифицировали методом полимеразной цепной реакции с использованием универсальных праймеров 8f (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′) и 926r (5′-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3′). Амплификацию осуществляли в следующем температурно-временном режиме: начальная денатурация при 95 °С в течение 3 мин; 35 циклов, включавших денатурацию при 95 °С – 30 с, отжиг праймеров при 57 °С – 30 с и элонгацию при 72 °С – 1,5 мин; заключительная элонгация при 72 °С – 5 мин. Наличие и размер полученных ампликонов контролировали методом электрофореза в 1% агарозном геле при напряжённости электрического поля 5 В/см. Полученные ампликоны секвенировали на автоматическом секвенаторе AE3000. Первичную таксономическую идентификацию штаммов проводили путем сопоставления полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями, представленными в базе данных GenBank, с использованием алгоритма

Табл. 1

Ранжирование сравнительных показателей биологической активности микроорганизмов

Факторы	Последовательность рангов				
	5	4	3	2	1
Степень восстановления DPPH, %	80,0–70,1	70,0–60,1	60,0–50,1	50,1–25,1	25,0–0
ИУК, мкг/мл	200,0–180,0	179,9–130,0	129,9–90,0	89,9–55,0	54,9–0
ГК, мкг/мл	800,0–600,0	599,9–450,0	449,9–350,0	349,9–250,0	249,9–0

BLAST. Штамм относили к соответствующему виду при уровне идентичности последовательностей не менее 97% [5].

Для получения консорциумов готовили суспензии чистых культур на мясопептонном бульоне с использованием денситометра Densichek plus (Sendle, Россия) до коэффициента мутности 0,8–1,0 по МакФарланду (титр микроорганизмов $1{,}5\times10^8$ КОЕ/мл). Культивировали при температуре 28±2 °С в течение 48 ч и 110 об/мин. Затем в пробирки со средой мясопептонный бульон вносили 5% от объема питательной среды суспензий микроорганизмов, входящих в консорциум (количество вносимой суспензии микроорганизмов зависит от количества и соотношения штаммов в консорциуме) [1].

Антиоксидантную активность, количество синтезируемых индолил-3-уксусной и гиббереллиновой кислот в консорциумах определяли по методикам, описанным выше.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Полученные значения выражали как среднее трех измерений со стандартным отклонением. Использовали Microsoft Office Excel 2007. Применяли дисперсионный анализ с апостериорным критерием Шеффе.

Результаты и обсуждение

Из образцов техногенно нарушенного грунта выделено восемь бактериальных штаммов. С целью отбора наиболее перспективных культур проведена сравнительная оценка их способности продуцировать метаболиты, восстанавливающие DPPH, и фитогормоны. Результаты, а также ранжирование показателей представлены в табл. 2.

Сравнительно высокая способность продуцировать метаболиты, восстанавливающие DPPH, отмечена у 5 исследуемых штаммов: № 8, 2, 7, 5, 3. Данный показатель позволяет сравнивать штаммы по способности продуцировать потенциально антиоксидантные соединения, однако не является прямым доказательством нейтрализации ими активных форм кислорода или защиты растений от окислительного стресса. Вместе с тем продуцирование таких метаболитов может иметь значение для адаптации растений к техногенной нагрузке и требует дальнейшего изучения. Токсическое действие тяжёлых металлов в почвах угольных отвалов имеет комплексный характер и реализуется посредством различных механизмов, одним из которых является усиленное образование активных форм кислорода в растительных клетках [13]. Воздействие свинца, кобальта, цинка и кадмия также может приводить к нарушению синтеза ДНК и белков, ингибированию активности ферментов, дисбалансу минерального питания, изменению морфологии растений и развитию хлороза [31, 33].

Микроорганизмы, продуцирующие метаболиты, способные восстанавливать DPPH, а значит и нейтрализовать АФК, могут повышать приживаемость растений на угольных отвалах. Так, в работе M. Neshat и соавт. [27] показано, что активные формы кислорода вызывают накопление пероксида водорода в клетках растений. Инокуляция штаммами *Enterobacter* sp. S16-3 и *Pseudomonas* sp. C16-2O приводила к снижению уровня перекисного окисления липидов мембран.

В исследовании J. Mesa-Marín и соавт. [25] инокуляция *Spartina maritima* консорциумом ростостимулирующих бактерий привела к снижению активности антиоксидантных ферментов и интенсивности корневого дыхания *in vivo*. Исследователи предположили, что наблюдаемые изменения могут быть связаны со снижением затрат углерода на дыхание и ослаблением стрессовой нагрузки на растения. По мнению авторов, улучшение углеродного баланса способствовало увеличению корневой биомассы и аккумуляции тяжёлых металлов.

Табл. 2

Результаты оценки биологической активности и ранжирования выделенных штаммов

№ штамма	Степень восстановления DPPH		Индолил-3-уксусная кислота		Гиббереллиновая кислота		Среднее значение ранга
	%	Ранг	мкг/мл	Ранг	мкг/мл	Ранг	
№ 1	$53{,}5^{а}\pm1{,}6$	3	$61{,}5^{а}\pm3{,}2$	1	$518{,}3^{аб}\pm20{,}1$	4	2,7
№ 2	$76{,}7^{б}\pm2{,}2$	5	$153{,}1^{б}\pm6{,}6$	4	$459{,}2^{а}\pm18{,}0$	4	4,3
№ 3	$64{,}0^{в}\pm2{,}4$	4	$110{,}9^{в}\pm5{,}0$	3	$485{,}5^{аб}\pm19{,}4$	4	3,7
№ 4	$54{,}7^{г}\pm1{,}8$	3	$134{,}5^{б}\pm5{,}3$	4	$648{,}0^{в}\pm25{,}9$	5	4,0
№ 5	$67{,}4^{в}\pm2{,}6$	4	$58{,}7^{а}\pm2{,}3$	2	$38{,}5^{г}\pm1{,}5$	1	2,3
№ 6	$24{,}4^{д}\pm1{,}1$	1	$52{,}3^{а}\pm1{,}9$	1	$31{,}0^{г}\pm1{,}2$	1	1,0
№ 7	$75{,}6^{б}\pm2{,}5$	5	$192{,}3^{г}\pm7{,}6$	5	$532{,}5^{б}\pm21{,}3$	4	4,7
№ 8	$78{,}0^{б}\pm2{,}9$	5	$178{,}6^{г}\pm7{,}1$	4	$784{,}4^{д}\pm31{,}3$	5	4,7

Примечание: Различия в буквенных индексах, расположенных справа от значений, показывают достоверность различий между штаммами (в пределах одного исследуемого параметра), рассчитанную методом дисперсионного анализа с апостериорным критерием Шеффе. При отсутствии достоверных различий буквенный индекс одинаков.

В этом контексте штаммы, выделенные в рамках настоящего исследования, демонстрируют потенциал для применения в технологиях фиторемедиации и биорекультивации техногенно нарушенных территорий, благодаря антиоксидантной активности.

Одним из способов взаимодействия бактерий с растениями является продуцирование фитогормона, в частности, индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Наибольшей активностью в этом отношении обладали штаммы № 7, 8, 2.

Полученные данные согласуются с результатами исследования M. Kuffner и соавт. [18], где показано, что изоляты из ризосферы ивы, относящиеся к родам *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Streptomyces* и *Agromyces*, способны синтезировать ИУК. Изоляты, выделенные из *Salix caprea* L., также повышали накопление цинка и кадмия в растительных тканях. Аналогично, штаммы *Rhizobium* sp., выделенные M. Pešić и др. [28], продуцировали индолил-3-уксусную кислоту, стимулируя рост *Trifolium pratense* L., увеличивая сухую массу побегов и содержание азота, а также способствуя большему накоплению никеля в корнях.

В исследованиях Q. Song и соавт. [30] установлено, что инокуляция *Pinus sylvestris var. mongolica* L. штаммами *P. mandelii*, *Serratia plymuthica* и *P. koreensis*, продуцирующими индолил-3-уксусную кислоту, приводило к увеличению роста саженцев.

Гиббереллиновая кислота также является фитогормоном, контролирующим важные аспекты роста растений, такие как прорастание семян, рост в длину и цветение [29]. В настоящем исследовании наибольшая способность продуцировать гиббереллиновую кислоту отмечено у штаммов № 8, 4, 7, 1.

Таким образом, выделенные штаммы представляют интерес в качестве перспективных кандидатов для разработки микробных биопрепаратов, обеспечивая комплексный эффект за счет синтеза фитогормонов и высокой антиоксидантной активности.

Интегральная оценка, основанная на среднем значении рангов, позволила провести сравнительный анализ общей биологической активности штаммов. По результатам ранжирования показателей биологической активности для дальнейших исследований отобрали 5 перспективных штаммов микроорганизмов, для которых средний балл оказался в диапазоне от 3,7 до 4,7: № 7 (4,7), № 8 (4,7), № 2 (4,3), № 4 (4,0), № 3 (3,7).

Антагонистические взаимодействия между микроорганизмами, проявляющиеся в подавлении роста и/или метаболической активности других штаммов, ограничивают разработку комбинированных микробных препаратов и могут снижать их практическую эффективность. В связи с этим при формировании консорциумов была проведена оценка биосовместимости указанных штаммов (табл. 3).

Изучение биосовместимости штаммов позволяет конструировать консорциумы таким образом, чтобы входящие в их состав изоляты не оказывали взаимного отрицательного влияния. По результатам испытаний биосовместимости для дальнейшего составления консорциумов отобраны три штамма (№ 2, 4 и 7).

Молекулярно-генетическая идентификация показала, что штамм № 2 представляет собой *P. donghuensis*, в коллекции присвоен номер В-14444, штамм № 4 – *P. donghuensis* (номер В-14445), штамм № 7 – *Acinetobacter calcoaceticus* (номер В-14440).

Табл. 3

Биосовместимость штаммов микроорганизмов с наибольшими средними баллами биологической активности

№ штамма	№ 2	№ 3	№ 4	№ 7	№8
№ 2		–	+	+	–
№ 3	–		–	–	+
№ 4	+	+		+	–
№ 7	+	–	+		–
№ 8	–	–	–	–	

Примечание: «+» – отсутствие взаимного ингибирования роста исследуемых штаммов (штаммы биосовместимы), а знак «–» – наличие ингибирования роста одного из штаммов (отсутствие биосовместимости).

Табл. 4

Составы бактериальных консорциумов

Штамм	**К1**	**К2**	**К3**	**К4**	**К5**	**К6**	**К7**
Pseudomonas donghuensis В-14444	1	2	1	1	3	1	1
Pseudomonas donghuensis В-14445	1	1	2	1	1	3	1
Acinetobacter calcoaceticus В-14440	1	1	1	2	1	1	3

На основе биологически совместимых штаммов были формированы 7 микробных консорциумов. Микробный консорциум, как правило, обладает более выраженным ростостимулирующим эффектом по сравнению с отдельными микроорганизмами [8]. Как отмечают X. Liu и др. [24], отдельные штаммы часто имеют ограничения по функциям, тогда как в консорциуме разнообразие и функциональная комплементарность участвующих микроорганизмов формирует более устойчивый эффект инокуляции, а также нивелирует недостатки монокультур. Соотношение штаммов в сконструированных микробных консорциумах представлено в табл. 4.

Далее консорциумы исследовали по показателям биологической активности (антиоксидантная активности, способность продуцировать восстановите-

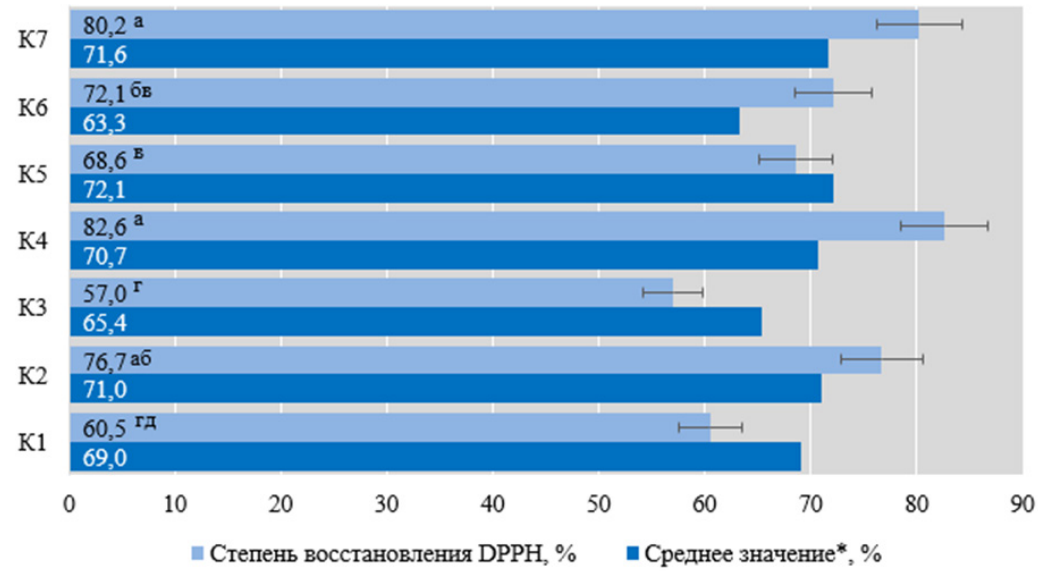


Рис. 2. Способность консорциумов синтезировать восстановители DPPH
Примечание: * – средняя оценка активности по микроорганизмам, входящим в консорциум.
Различия в буквенных индексах, расположенных справа от значений, показывают достоверность различий между растениями (в пределах одного исследуемого параметра), рассчитанную методом дисперсионного анализа с апостериорным критерием Шеффе. При отсутствии достоверных различий буквенный индекс одинаков.

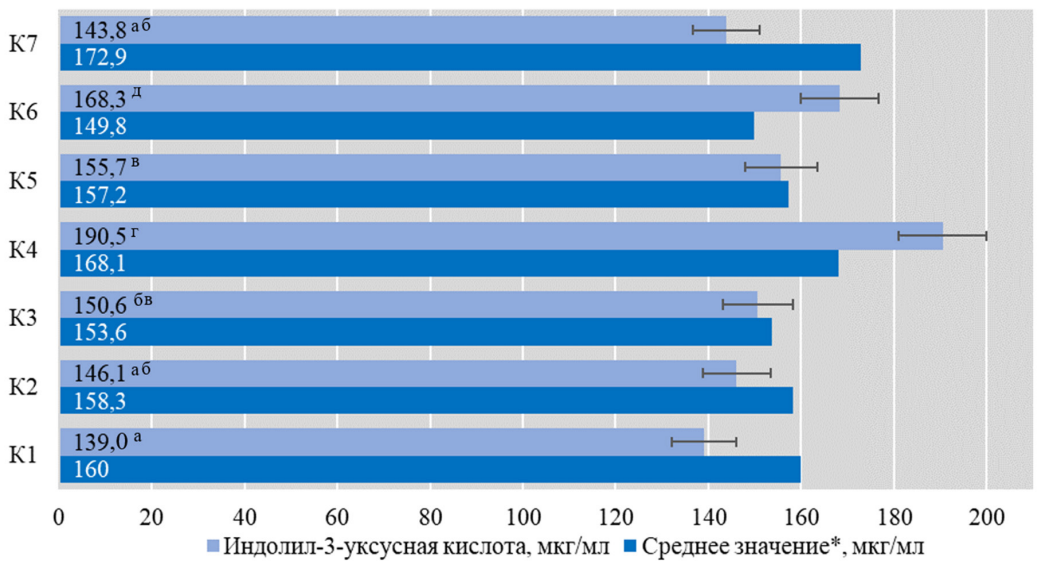


Рис. 3. Продуцирование индолил-3-уксусной кислоты консорциумом
Примечание: см. рис. 2.

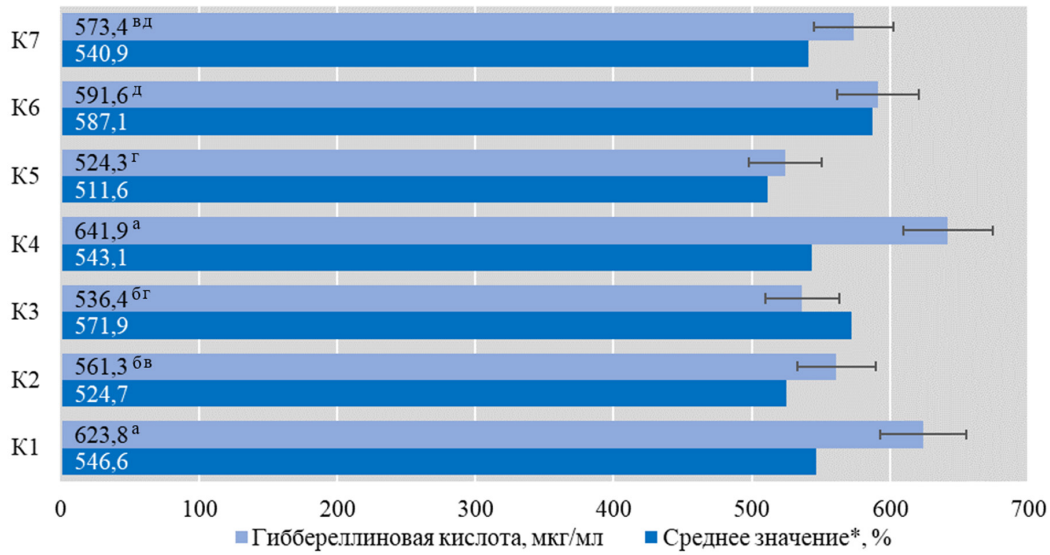


Рис. 4. Продуцирование гиббереллиновой кислоты консорциума
Примечание: см. рис. 2.

ли DPPH и индолил-3-уксусную и гиббереллиновую кислоты). Для сравнительной оценки эффективности учтены средние значения показателей биологической активности штаммов, входящих в консорциумы, в соответствии с соотношением бактерий. Результаты приведены на рис. 2–4.

Установлено, что наибольшей способностью продуцировать метаболиты, восстанавливающие DPPH, обладали три консорциума микроорганизмов: К4, К7 и К2. Степень восстановления DPPH у данных консорциумов выше, чем усредненные показатели у отдельных микроорганизмов, входящих в их состав. При этом наибольшая разница отмечена для К4 (больше на 11,9%).

Консорциумы К4 и К6 синтезировали большее количество индолил-3-уксусной кислоты как в сравнении с другими исследуемыми консорциумами, так и в сравнении со средним содержанием в культуральной жидкости отдельных микроорганизмов, входящих в их состав. Наибольшую разницу между количеством индолил-3-уксусной кислоты в консорциуме и средним содержанием в культуральной жидкости отдельно взятых микроорганизмов, входящих в их состав, показал консорциум К4 (больше на 22,4 мкг/мл).

Консорциумы К1 и К4 синтезировали большое количество гиббереллиновой кислоты в сравнении с другими консорциумами и усредненными показателями отдельных микроорганизмов, входящих в их состав. Наибольшую разницу между количеством синтезируемой гиббереллиновой кислоты и средним показателем отдельно взятых микроорганизмов, входящих в состав консорциума, показал консорциум К4 (больше на 98,8 мкг/мл).

Таким образом, наибольшей биологической эффективностью обладал консорциум К4, включающий штаммы *P. donghuensis* В-14444, *P.donghuensis* В-14445 и *A. calcoaceticus* В-14440 в соотношении 1:1:2, что свидетельствует о синергетическом эффекте взаимодействия микроорганизмов. Более высокая эффективность бактериальных консорциумов по сравнению с монокультурами может быть обусловлена комплементарностью метаболических функций микроорганизмов и снижением конкуренции за ресурсы [16].

Заключение

В работе представлены результаты выделения и определения биологических характеристик микроорганизмов, полученных из техногенно нарушенных грунтов угольных разрезов Кузбасса. Определены штаммы, обладающие наибольшей способностью, в сравнении с другими, продуцировать восстановители DPPH и фитогормоны.

Для разработки консорциумов изучена биосовместимость наиболее биологически активных штаммов микроорганизмов, по результатам чего отобраны 3 штамма микроорганизмов, в последствии идентифицированных как *P. donghuensis* штамм В-14444, *P. donghuensis* В-14445 и *A. calcoaceticus* В-14440.

Показано, что формирование микробных консорциумов приводит к усилению биологической активности по сравнению с монокультурами, что может быть обусловлено синергетическим взаимодействием микроорганизмов и комплементарностью их метаболических функций. В составе консорциумов отмечено увеличение синтеза фитогормонов и антиоксидантной

активности. Наиболее перспективным признан консорциум К4, включающий *P. donghuensis* В-14444, *P. donghuensis* В-14445 и *A. calcoaceticus* В-14440 в соотношении 1:1:2, у которого найдены наибольшие, в сравнении с другими сочетаниями, антиоксидантная активность и синтез фитогормонов.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования идентифицированных штаммов и консорциумов на их основе для биоремедиации техногенно нарушенных почв, а также для повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам. На следующих этапах исследования планируется осуществить комплексную оценку (всхожесть, развитие корневой и надземной части, накопление биомассы) ростостимулирующих свойств консорциумов на модельных растениях-рекультивантах.

Благодарность: *Работа ведется 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 финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-1200 от 28.09.2022 г.).*

ЛИТЕРАТУРА

Список русскоязычной литературы

1. Асякина ЛК, Бородина ЕЕ, Фотина НВ, Неверова ОА, Милентьева ИС. *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus megaterium* и *Pseudomonas putida* в восстановлении техногенно нарушенных территорий Кузбасса. Поволжский экологический журнал. 2024;(4):385-98. https://doi.org/10.35885/1684-7318-2024-4-385-398.
2. Асякина ЛК, Дышлюк ЛС, Просеков АЮ. Мировой опыт в области рекультивации посттехногенных ландшафтов. Техника и технология пищевых производств. 2021;51(4):805-18. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-4-805-818.
3. Асякина ЛК, Фотина НВ, Безъязыкова МВ, Милентьева ИС, Федорова АМ, Позднякова АВ, Просеков АЮ. Пат. 2819915 «Способ выделения бактерий из грунта угольных отвалов для биологической рекультивации», 28.05.2024. Заяв. 2023125626, опубл. 06.10.2023.
4. Бородина ЕЕ, Гордиенко АВ, Плешивцев ИИ, Фотина НВ, Федорова АМ, Мартиросян ВВ. Биологический потенциал бактериального штамма рода Pantoea в защите от биотического стресса и стимуляции роста зерновых культур. Техника и технология пищевых производств. 2025;55(4):710-22. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-4-2606.
5. Дышлюк ЛС, Агафонова СВ, Казимирченко ОВ. Молекулярно-генетическая идентификация изолятов бактерий – продуцентов ксиланаз. Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Естественные и медицинские науки. 2024;(4)123-34. https://doi.org/10.5922/vestniknat-2024-4-9.
6. Осинцева МА, Бурова НВ. Использование плодородного слоя почвы для рекультивации. Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2024;(1):17-25.
7. Фасхутдинова ЕР, Осинцева МА, Неверова ОА. Перспективы использования микробиома почв угольных отвалов с целью ремедиации антропогенно нарушенных экосистем. Техника и технология пищевых производств. 2021;51(4):883-904. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-4-883-904.

Общий список литературы/References

1. Asyakina LK, Borodina EE, Fotina NV, Neverova OA, Milentyeva IS. [*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas putida* in the restoration of anthropogenically disturbed territories of the Kuzbass]. Povolzhskiy Ekologicheskiy Zhurnal. 2024;(4):385-98. https://doi.org/10.35885/1684-7318-2024-4-385-398. (In Russ.).
2. Asyakina LK, Dyshlyuk LS, Prosekov AYu. [Reclamation of post-technological landscapes: International experience]. Food processing: techniques and technology. 2021;51(4):805-18. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-4-805-818. (In Russ.).
3. Asyakina LK, Fotina NV, Bezyazykova MV, Milentyeva IS, Fedorova AM, Pozdnyakova AV, Prosekov AYu. [Pat. 2819915 «A method for isolating bacteria from coal waste soil for biological reclamation», 28.05.2024]. Applic. 2023125626, publ. 06.10.2023. (In Russ.).
4. Borodina EE, Gordienko AV, Pleshivtsev II, Fotina NV, Fedorova AM, Martirosyan VV. [New Pantoea strain as antistress agent and growth stimula-

tor in grain growing]. Food processing: techniques and technology. 2025;55(4):710-22. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-4-2606. (In Russ.).
5. Dyshlyuk LS, Agafonova SV, Kazimirchenko OV. [Molecular genetic identification of bacterial isolates – xylanase producers]. Vestnik of Immanuel Kant Baltic Federal University. Series: Natural and Medical Sciences. 2024;(4)123-34. https://doi.org/10.5922/vestniknat-2024-4-9. (In Russ.).
6. Osintseva MA, Burova NV. [Fertile soil layer use for reclamation]. Bulliten KrasSAU. 2024;(1):18-25. (In Russ.).
7. Faskhutdinova ER, Osintseva MA, Neverova OA. [Prospects of using soil microbiome of mine tips for remediation of anthropogenically disturbed ecosystems]. Food processing: techniques and technology. 2021;51(4):883-904. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-4-883-904. (In Russ.).
8. Abou Jaoudé R, Luziatelli F, Ficca AG, Ruzzi M. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria synthetic consortium on growth, yield, and metabolic profile of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown under suboptimal nutrient regime. Horticulturae. 2025;11(1):64. https://doi.org/10.3390/horticulturae11010064.
9. Ashry NM, Alaidaroos BA, Mohamed SA, Badr OAM, El-Saadony MT, Esmael A. Utilization of drought-tolerant bacterial strains isolated from harsh soils as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Saudi J Biol Sci. 2022;29(3):1760-9. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.054.
10. Ayilara MS, Babalola OO. Bioremediation of environmental wastes: the role of microorganisms. Front Agronomy. 2023;5:1183691. https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1183691.
11. Chaiharn M, Lumyong S. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. Curr Microbiol. 2011;62:173-81. https://doi.org/10.1007/s00284-010-9674-6.
12. Chen J, Li F, Zhao X, Wang Y, Zhang L, Yan L, Yu L. Change in composition and potential functional genes of microbial communities on carbonatite rinds with different weathering times. Front Microbiol. 2022;13:1024672. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1024672.
13. Das D, Riamei M, Paul P, Singh N, Ingti B, Sarkar RD, Rose R, Sharma PL, Paul S. Understanding the role of soil microorganisms in alleviating hydric and edaphic stress towards sustainable agriculture. Discover Soil. 2025;2(1):47. https://doi.org/10.1007/s44378-025-00076-x.
14. Gupta R, Khan F, Alqahtani FM, Hashem M, Ahmad F. Plant growth–promoting rhizobacteria (PGPR) assisted bioremediation of heavy metal toxicity. App Biochem Biotechnol. 2024;196(5):2928-56. https://doi.org/10.1007/s12010-023-04545-3.
15. Hassan MK, McInroy JA, Kloepper JW. The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: a review. Agriculture. 2019;9:142. https://doi.org/10.3390/agriculture9070142.
16. Joshi N, Raval B, Jha CK. The art of amalgamation: advancing crop productivity with PGPR consortia solutions. Curr Agricult Res J. 2025;13(1). https://doi.org/10.12944/CARJ.13.1.02.
17. Kekana IKJ, Kgopa PM, Munjonji L. Bioremediation of non-essential toxic elements using indigenous microbes in soil following irrigation with treated wastewater. App Sci. 2025;15:2299. https://doi.org/10.3390/app15052299.
18. Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, Gorfer M, Sessitsc A. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. Plant Soil. 2008;304(1):35-44. https://doi.org/10.1007/s11104-007-9517-9.
19. Kuznetsova IV, Timofeeva SS. Green technologies in land recultivation for coal mining enterprises. IOP Conf. Ser.: Earth. Environ. Sci. 2020;408:012075. https://doi.org/10.1088/1755-1315/408/1/012075.
20. Li D, Yin N, Xu R, Wang L, Zhang Z, Li K. Sludge amendment accelerating reclamation process of reconstructed mining substrates. Sci. Rep. 2021;11:2905. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81703-9.
21. Li H, Cui X, Sun Y, Zheng P, Wang L, Shi X. Advances in microbial remediation of heavy metal-contaminated soils: mechanisms, synergistic technologies, field applications and future perspectives. Toxics. 2025;13:1069. https://doi.org/10.3390/toxics13121069.
22. Li Y, Zhao H, Liu J, Chaonan C, Yuxuan G. A framework for selecting and assessing soil quality indicators for sustainable soil management in waste dumps. Sci Rep. 2024;14(1):8491. https://doi.org/10.1038/s41598-024-58930-x.
23. Lim B-S, Kim A-R, Seol J, Oh W-S, An J-H, Lim C-H, Lee C-S. Effects of soil amelioration and vegetation introduction on the restoration of abandoned coal mine spoils in South Korea. Forests. 2022;13:483. https://doi.org/10.3390/f13030483.
24. Liu X, Mei S, Salles JF. Inoculated microbial consortia perform better than single strains in living soil: A meta-analysis. App Soil

Ecol. 2023;190:105011. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.105011.
25. Mesa-Marín J, Del-Saz NF, Rodríguez-Llorente ID, Redondo-Gómez S, Pajuelo E, Ribas-Carbó M, Mateos-Naranjo E. PGPR reduce root respiration and oxidative stress enhancing *Spartina maritima* root growth and heavy metal rhizoaccumulation. Front Plant Sci. 2018;9:1500. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01500.
26. Mmotla K, Sibanyoni NR, Allie F, Sitole L, Mafuna T, Mashabela MD, Mhlongo MI. Exploring the intricacies of plant growth promoting rhizobacteria interactions: an omics review. Ann Microbiol. 2025;75(1):5. https://doi.org/10.1186/s13213-025-01793-y.
27. Neshat M, Abbasi A, Hosseinzadeh A, Sarikhani MR, Dadashi CD, Rasoulnia A. Plant growth promoting bacteria (PGPR) induce antioxidant tolerance against salinity stress through biochemical and physiological mechanisms. Physiol Mol Biol Plants. 2022;28(2):347-61. https://doi.org/10.1007/s12298-022-01128-0.
28. Pešić M, Jojević ST, Sikirić B, Mrvić V, Delić D, Koković N, Stajković-Srbinović O. Plant growth-promoting native rhizobia isolated from red clover (*Trifolium pratense* L.) nodules: potential for metal-phytostabilization. BMC Microbiol. 2025;25(1):787. https://doi.org/10.1186/s12866-025-04424-3.
29. Schwechheimer C. Understanding gibberellic acid signaling–are we there yet? Curr Opin Plant Biol. 2008;11(1):9-15. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.10.011.
30. Song Q, Song X, Deng X, Luo J, Wang J, Min K, Song R. Effects of plant growth promoting rhizobacteria microbial on the growth, rhizosphere soil properties, and bacterial community of *Pinus sylvestris* var. mongolica seedlings. Scand J Forest Res. 2021;36(4):249-62. https://doi.org/10.1080/02827581.2021.1917649.
31. Taamalli M, Ghabriche R, Amari T, Mnasri M, Zolla L, Lutts S, Abdely C, Ghnaya T. Comparative study of Cd tolerance and accumulation potential between *Cakile maritima* L.(halophyte) and *Brassica juncea* L. Ecol Engin. 2014;71:623-7. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.08.013.
32. Tripathi N, Singh RS, Chaulya SK, Hills CD. Recovery of damaged mine spoil: an ecological & geotechnical perspective. J Soils Sediments. 2025;25:3439-59. https://doi.org/10.1007/s11368-025-04170-z.
33. Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. Environ Sci Pollut Res. 2016;23(9):8244-59. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x.

