

УДК 579.841.2

А.А. Омирбекова, Т.Д. Мукашева, Р.Ж. Бержанова*, Л.В. Игнатова, М.Т. Каргаева, Р.К. Сыдыкбекова, Н.К. Бектилеуова
 Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан
 *e-mail: ramza05@mail.ru

Выделение и отбор микроорганизмов ризосферы и ризопланы растений по их способности к росту на углеводородах

В статье приведены результаты изучения роста микроорганизмов, выделенных из корневой и прикорневой зон растений, в парах углеводородов, оценена их нефтеокисляющая активность и отобраны активные изоляты.

Ключевые слова: ризосфера, ризоплана, штаммы, растения, численность микроорганизмов,

А.А. Омирбекова, Т.Д. Мұқашева, Р.Ж. Бержанова, Л.В. Игнатова, М.Т. Каргаева, Р.К. Сыдыкбекова, Н.К. Бектилеуова

Выделение и отбор микроорганизмов ризосферы и ризопланы растений по их способности к росту на углеводородах

Өсімдіктердің ризосфера мен ризопланасынан 2200 изолят бөлініп алынды, сонын ішінде өсімдік ризосферасын – 975, ризоплананың – 1225 штамм құрады. Бензин буында және мұнайдың әртүрлі концентрациясы бар қоректік ортада белсенді өсу қабілетімен ерекшеленген изоляттар іріктеліп алынды.

Кілттік сөздер: ризосфера, ризоплана, штамдар, өсімдіктер, микроорганизмдер саны

A.A. Omirbekova, T.D. Mukasheva, R.Zh. Berzhanova, L.V. Ignatova, R.K. Sydykbekova, N.K. Bektileyova
Allocation and selection of microorganisms rizofer and rizoplane of plants on their ability to growth on hydrocarbons

From rizofer and rizoplane of plants were emitted 2200 isolates, of them to a rizofer of plants made - 975, rizoplane – 1225 strains. The active isolates capable to growth in vapors of gasoline and on the medium with oil containing various concentrations are selected.

Key words: rizofer, rizoplane, plants, quantity of microorganisms, stamms

В последние годы особую актуальность приобретают методы, которые основываются на использовании совместного метаболического потенциала микроорганизмов и растений. Одним из способов биоремедиации нефтезагрязненных почв является очистка почв и грунтов путем внесения специальных культур микроорганизмов-нефтедеструкторов (биопрепаратов). Однако, за годы практического использования этой биотехнологии выявился ряд ее недостатков, связанных с вытеснением аборигенной микрофлоры интродуцированными микроорганизмами - деструкторами, высокой стоимостью

процесса обработки загрязненных объектов, а также дополнительные затраты на работы по подготовке загрязненных площадок (внесение минеральных и органических удобрений совместно с биопрепаратом) [1; 2].

Известно, что ризосферные условия являются более стабильными и пригодными для выживания почвенных микроорганизмов, что доказано большой численностью и их распространением. В условиях нефтяного загрязнения, зоны ризосферы и ризопланы являются более подходящими для микроорганизмов. В работе ряда авторов исследован «ризосферный эффект», пониженное

количество микроорганизмов в корневой зоне растений, незагрязненной почвы в сравнении с почвой, загрязненной углеводородами нефти. В этом случае, растение являлось фактором, поддерживающим численность микрофлоры и защищающим микроорганизмы от загрязнителя [3; 4; 5; 6].

Основными же деструкторами углеводов являются именно микроорганизмы, и при этом до сих пор остается неисследованной численность ризосферных микроорганизмов, окисляющих углеводороды нефти, их роль в очищении нефтезагрязненных земель, а также влияние нефтяного загрязнения почвы на ризосферную микрофлору. В мире существует огромный и постоянно растущий интерес к ризосфере в аспекте ее использования для очищения загрязненных земель.

Целью данной работы явилось выделение микроорганизмов из ризосферы и ризопланы растений, выращенных на почве загрязненной нефтью и отбор активных изолятов по их способности к росту на углеводородах.

Материалы и методы

Выделение микроорганизмов – деструкторов нефти из ризосферы растений. Для выращивания растений использовалась почва с месторождения Жанаозен Мангыстауской области. В рабочих условиях оценивалась степень загрязнения почвы нефтью, при недостаточной концентрации нефтяного загрязнения (20 - 30 г нефти/кг почвы), почву искусственно загрязняли до определенной концентрации. Растения выращивали в горшках объемом 5 литров, заполненных нефтезагрязненной почвой, в качестве контроля использовалась нативная почва. В каждый горшок помещали 10 семян одного растения и выращивали в ростовой комнате при условиях – 14 светового периода и 10 часов темного

периода. Продолжительность эксперимента составила 50 дней.

Растения (10 экз. и более) подкапывают лопатой и после извлечения их из почвы стряхивают с корней непрочно удерживающуюся на них почву и оставляют почву, прочно связанную с корнями [7]. Навеску корней с почвой (5~10 г) помещают в колбу со 100 мл стерильной воды. Суспензию обрабатывают на микроизмельчителе тканей. Посев проводят обычным способом. После посева корни вынимают из колбы, слегка подсушивают между листами фильтровальной бумаги и взвешивают. По разности массы корней с почвой и отмытых корней узнают массу ризосферной почвы, взятой для анализа. Расчет количества микроорганизмов ведут на 1 г почвы. Зная ее влажность, можно произвести пересчет количества микроорганизмов на 1 г воздушно-сухой и абсолютно сухой почвы. Корни, стерильно отделенные от растения, в течение 5 мин отмывают от ризосферной почвы в колбе со 100 мл стерильной воды путем перемещения ее на качалке (180 об/мин). Затем отмытые корни крючком вынимают из колбы, помещают в стерильную чашку Петри, разрезают на куски в 5~10 мл длиной и после перемешивания отбирают среднюю навеску в 0,5~1 г. Берут не менее трех навесок. Каждую навеску помещают в 100 мл стерильной воды и обрабатывают на микроизмельчителе тканей РТ-2 в течение 5 мин. После минутного отстаивания суспензии готовят разведения и производят посев.

Проводили изучение роста микроорганизмов в парах углеводов. Сравнивали степень роста микроорганизмов на опытных чашках и контрольных чашках (минеральная среда с глюкозой). Анализ проводился по пяти бальной шкале.

Качественная оценка нефтеокисляющей способности микроорганизмов. Оценка роста изолятов производилась в жидкой

минеральной среде, в которую в качестве единственного источника углерода и энергии добавляли 30 и 50 мл/л нефти. Качественные изменения роста оценивались по изменению цвета нефти, по степени и характеру разрушения нефтяной пленки и помутнению среды на 5 и 10 сутки роста. Интенсивность роста оценивалась по изменению нефтяной пленки по пятибалльной шкале.

Способность к росту нефтеокисляющих микроорганизмов на нефтепродуктах также судили по росту в жидкой минеральной среде с добавлением нефтяных углеводородов в качестве единственного источника углерода и энергии.

Результаты и их обсуждение

Ранее было установлено, что как в ризосфере, так и ризоплане, численность углеводородокисляющих микроорганизмов, увеличенная под влиянием поллютанта, поддерживается на высоком уровне. Структура сообществ микроорганизмов характеризуется устойчивостью и меньше подвержена изменениям под влиянием загрязнителя, чем в почве без растений. Кроме того, в ризоплане растений, выращенных в загрязненной почве, численность нефтеокисляющих микроорганизмов выше, чем в почве без растений [8].

Так, из ризосферы и ризопланы растений были выделены 2200 изолятов, из ризосферы растений - 975, ризопланы - 1225. В дальнейших исследованиях проводили отбор активных изолятов по их способности к росту на различных углеводородах нефти.

Критерием отбора изолятов являлись различия морфологических признаков колонии. Из 1350 выделенных изолятов, 60 % приходится на долю бактерий. Из 500 выделенных дрожжей, 67% составляют микрофлору ризопланы. Количество актинобактерий в ризосфере и ризоплане равнялось 353 и 173 изолята соответственно.

Из полученных данных установлено, что из ризопланы растений отобрано больше микроорганизмов. Их можно распределить в следующем порядке: бактерии > дрожжи > актинобактерии. Так, например, для травосмеси группы выделенных микроорганизмов можно расположить в следующем порядке: бактерии – 140 > дрожжи – 26 > актинобактерии – 20.

В таблице 1 представлены обобщенные данные по количеству изолятов и по распределению групп микроорганизмов, выделенных из корневой зоны различных растений. Стоит отметить, что больше изолятов было выделено у травосмеси – 522 из 2200, а наименьшее количество изолятов отобрано из корневой системы рапса.

Первичный скрининг активных изолятов, выделенных из ризосферы и ризопланы растений проводили, по их способности к росту в парах углеводородов. В частности, проводилась оценка роста изолятов в парах бензина. Известно, что бензин относится к легким углеводородам и оказывает токсичное действие на численность микроорганизмов в почве [9]. Токсичное действие бензина на активность почвенных микроорганизмов обусловлено его химическим составом. Низкомолекулярные предельные углеводороды с короткой цепью, составляющие большую часть топлива, легко проникают через клеточные мембраны организмов и в результате дезорганизуют их [10]. Из таблицы 2 видно, что 16,5 % изолятов показали интенсивный рост на среде с бензином. У рапса и травосмеси количество нерастущих изолятов в парах бензина колебалось в пределах от 8,8% до 15% соответственно. 32,5% изолятов не росли в парах бензина. Вероятно, что на эти изоляты бензин оказал токсическое действие, задерживая их рост. 30 % изолятов слабо росли в парах бензина. У травосмеси свыше 35% изолятов плохо росли на среде в парах бензина. В итоге из ризосферы растений было отобрано 166

изолятов, которые показали интенсивный рост в парах углеводорода (таблица 3).

Обобщив полученные данные по оценке роста изолятов в парах бензина, было отобрано 404 изолята. Из них 166 изолятов были выделены из ризосферы и 238 изолятов из ризопланы растений. Среди отобранных изолятов проводилась дальнейшая оценка их способности к росту на среде с

нефтью с целью отбора активных изолятов. Из таблицы 4 видно, что 45 изолятов ризосферы растений показали разрушение нефти на мелкие частицы, 19 изолятов принадлежали ризосфере травосмеси, 11 – люцерны, 13 – рапса и 12 изолятов были изолированы из ризосферы ячменя. Из 166 изолятов – 45 изолятов не вызвали никаких изменений в разрушении нефти.

Таблица 1 – Количественное распределение изолятов, выделенных из ризосферы и ризопланы растений

Растение	Ризосфера			Итого
	бактерии	дрожжи	актинобактерии	
Люцерна	135	61	43	239
Рапс	102	39	50	191
Травосмесь	190	51	45	286
Ячмень	171	41	42	259
Всего	598	297	180	975
	Ризоплана			Итого
Люцерна	222	87	40	
Рапс	125	41	41	207
Травосмесь	250	94	42	386
Ячмень	155	78	50	283
Всего	752	300	100	1225

Таблица 2 – Оценка роста изолятов ризосферы на их способность к росту в парах бензина

Растение	Количество изолятов	Количество изолятов									
		Интенсивный		Хороший		Средний		Слабый		Нет роста	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Люцерна	239	35	14,6	28	11,7	48	20,1	54	22,5	64	26,8
Рапс	191	28	14,6	32	16,7	42	21,9	33	17,2	56	29,3
Травосмесь	286	48	16,7	38	13,2	50	17,5	84	29,3	66	23,0
Ячмень	259	35	13,5	42	16,2	42	16,2	62	23,9	78	30,1

Таблица 3 – Оценка роста изолятов ризопланы по их способности к росту в парах бензина

Растение	Общее количество изолятов	Количество изолятов									
		Интенсивный		Хороший		Средний		Слабый		Нет роста	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Люцерна	349	23	7	36	10,0	58	17	85	24	147	42
Рапс	207	39	19	28	14,0	36	17,0	40	19,0	64	31,0
Травосмесь	386	15	4	33	9,0	55	14,0	102	26	139	36
Ячмень	283	28	10,0	14	5,0	11	4,0	103	36,0	100	35,0

Таблица 4 – Количество культур ризосферы, способных расти на различных концентрациях нефти

Шкала оценок	Растение															
	люцерна				рапс				травосмесь				ячмень			
	концентрация нефти, мл/л															
	30		50		30		50		30		50		30		50	
	количество культур															
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%

Продолжение таблицы 4

5	11	31	8	23	13	46	9	32	19	40	15	31	12	34	8	23
4	5	14	7	20	5	18	6	21	10	21	9	19	7	20	8	23
3	4	11	6	17	5	18	7	25	11	23	10	21	5	14	4	11
2	6	17	6	17	4	14	7	25	5	10	9	19	6	17	8	23
1	9		8		8		6		3		5		5		7	

Примечание: 5 – разрушение нефти на мелкие частицы; сильное помутнение 4 – разрушение нефти на мелкие зернышки; хорошее помутнение 3 – разрушение нефти на хлопья; среднее помутнение 2 – образование комков; слабое помутнение 1 – изменений нет.

При сравнении нефтеокисляющей активности изолятов при концентрации нефти в среде 50 мл и 30 мл, углеводородокисляющая активность изолятов снижалась при выращивании в среде с 50 мл нефти. Так, при содержании нефти 30 мл, количество изолятов, выделенных из ризосферы ячменя с интенсивной нефтеокисляющей

активностью было в 1,5 раза выше, чем при содержании 50 мл/л нефти в среде.

Проведена оценка нефтеокисляющей активности изолятов, выделенных из ризопланы растений (таблица 5). По результатам качественных изменений нефти было отобрано 46 изолятов, показавших интенсивное изменение нефти. Визуально было заметно, что нефть распадается на мелкие частицы.

Таблица 5 – Количество культур ризопланы, способных расти на различных концентрациях нефти

Шкала оценок	Растение															
	люцерна				рапс				травосмесь				ячмень			
	концентрация нефти, мл/л															
	30		50		30		50		30		50		30		50	
	количество культур															
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
5	12	52,0	3	13,0	9	23,1	3	8	13	87	10	67	12	43	8	29
4	2	9,0	4	17,1	4	17	4	10	1	7	2	13	4	14	6	21
3	4	17,0	6	26,0	12	31,1	10	26	1	7	2	13	6	21	4	14
2	2	9,0	4	17,0	14	36	10	26	0	0	1	7	3	11	6	21
1	3	13	6	26,0	0	0	12	31	0	0	0	0	3	11	4	14

Примечание: 5 – разрушение нефти на мелкие частицы; сильное помутнение 4 – разрушение нефти на мелкие зернышки; хорошее помутнение 3 – разрушение нефти на хлопья; среднее помутнение 2 – образование комков; слабое помутнение 1 – изменений нет.

Таким образом, из результатов, полученных экспериментов, было выделено 2200 изолятов, из них 975 изолятов - из ризосферы растений, а 1225 изолятов составляли ризоплану растений. Из них отобрано 251 изолятов, выделенных из

корневой и прикорневой зон растений. Отобранные изоляты показали высокую способность к росту на среде с нефтью, которая проявлялась в виде разрушения нефти на мелкие агрегаты.

Литература

- 1 Ronald M. Atlas and Terry C. Hazen Oil biodegradation and bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History // *Environmental Science Technology*. - 2011. - №45. - P. 6709–6715.
- 2 Ming Nie, Yijing Wang, Jiayi Yu, Ming Xiao, Lifen Jiang, Ji Yang Understanding plant-microbe interactions for phytoremediation of petroleum-polluted soil // *PLoS One*. - 2011. - № 6. – P. 215-223
- 3 Muratova A. Yu., Dmitrieva T.V., Panchenko L.V., Turkovskaya O.V. Phytoremediation of oil-sludge contaminated soil // *International Journal of Phytoremediation*. – 2008. - № 10. – P. 486–502.
- 4 Dominguez-Rosado, E. Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: I. Enhanced microbial activities from laboratory and growth chamber studies / E. Dominguez-Rosado, J. Pichtel, M. Coughlin // *Environmental Engineering Science*. – 2004. – Vol. 21, № 2. – P. 157-168.
- 5 Турковская О.В., Муратова А.Ю., Хюбнер Т., Кушк П. Изучение эффективности использования люцерны и тростника для фиторемедиации загрязненного углеводородами грунта // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2003. – Т. 39, № 6. – С. 681- 688.
- 6 Плешакова Е.В., Дубровская Е.В., Турковская О.В. Приемы стимуляции аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры // *Биотехнология*. – 2005. - № 1. - С. 42-50.
- 7 Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: МГУ, 1976. - С. 56 – 124.
- 8 Омирбекова А., Мукашева Т.Д., Бержанова Р.Ж., Сыдыкбекова Р.К., Игнатова Л.В., Бектилеуова Н.К., Карагаева М.Т., Сартаева А.А. Эколого-функциональные реакции, ассоциированных с растениями ризосферных микробных сообществ в почве загрязненной нефтяными углеводородами // *Вестник. Серия биологическая*. 3/2(59), 2013. С. 530-533.
- 9 Edwin-Wosu N.L. Impact of soil diesel oil pollution on seed germination of Alfalfa // *Environmental Science and Technology*. – 2004. - № 5. – P. 56-60.
- 10 Барышникова Л.М., Грищенко В.Г., Аринбасаров М.У., Шкидченко А.Н., Воронин А.М. биodeградация нефтепродуктов штаммами-деструкторами и их ассоциациями в жидкой среде // *Прикладная биохимия и микробиология*. - 2001. - Т 37, № 5. - С.542-548.