

УДК 579.841.2

А.А. Омирбекова*, Ж.А. Оразбеков, Р.Ж. Бержанова, Т.Д. Мукашева
Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы
*E-mail: anel.83@mail.ru

Отбор активных изолятов из ризосферы и ризопланы растений по их способности к росту на углеводородах

Отобраны активные штаммы – деструкторы углеводородов, выделенные из корневой зоны растений, выращенных в загрязненных нефтью почвах. 20 штаммов, относящихся к различным родам *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Gordonia* и *Bacillus* способны утилизировать нефть и мазут.

Ключевые слова: корневая система, деструктивная активность, нефть, мазут, идентификация.

A.A. Omirbekova, Zh.A. Orazbekov, R.Zh. Berzhanova, T.D. Mukasheva Selection of isolates from rhizosphere and rhizoplane of plants by their ability to growth on hydrocarbons

Active strains – destructors of hydrocarbons isolated from the root zone of plants grown in oil contaminated soil. 20 strains belonging to different *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Gordonia* and *Bacillus* genera are able to utilize oil and fuel oil.

Keywords: root system, destructive activity, crude oil, fuel oil, identification.

А.А. Омирбекова, Ж. А. Оразбеков, Р.Ж. Бержанова, Т.Д. Мукашева Көмірсутекте өсу қабілеті бойынша өсімдік ризосфера және ризопланынан белсенді изоляцияларды сұраптап алу

Мұнаймен ластанған топырақта өсірілген өсімдік жүйесінен "бөлініп" алынған "изоляциялардан" көмірсутек тотықтырушы белсенді деструктор штамдар сұрапталып алынды. Олар: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Gordonia* және *Bacillus* өкілдеріне жатқызылды. Олар мұнай мен мазутты тазартуға қабілетті.

Түйін сөздер: тамыр жүйесі, деструктивтік белсенділік, мұнай, мазут, сәйкестендіру.

Важную роль в детоксикации поллютантов играет ризосфера растений, которая является областью активного развития и жизнедеятельности микроорганизмов. Происходит активная стимуляция жизнедеятельности ризосферных микроорганизмов и соответственно деградация загрязнителя [1]. Высокий процент деструкторов при их сравнительно невысокой численности в почве без растений свидетельствовал о нарушенном состоянии ее микробоценоза, где главная роль отведена организмам, способным противостоять воздействию стрессового фактора. Большая насыщенность ризосферы разнообразными углеродными субстратами, выделяемыми корнями, обеспечивает рост микроорганизмов с более широкими метаболическими возможностями по сравнению с почвой без растений. Появление дополнительного источника углерода в почве без растений при

внесении углеводородного поллютанта стимулирует рост лишь специфической популяции деструкторов. Таким образом, большая микробная плотность и широкий спектр метаболизируемых субстратов в ризосфере могут обеспечивать более активную и полную деградацию поллютанта по сравнению с почвой без растений [2-4].

Целью данной работы явилось изучение деструктивной активности у микроорганизмов, выделенных из корневой зоны растений, выращенные в присутствии углеводородов.

Материал и методы

В работе использовали 220 бактерий, 40 дрожжей и 11 стрептомицетов, выделенных из корневой зоны растений, выращенных в нефтезагрязненной почве. Выделенные культуры

сохранялись методом периодического пересева на среде МПА, сусло агар и КАА, а также под слоем вазелинового масла при $t +4^{\circ}\text{C}$ [5].

В работе применяли стандартные питательные среды фирмы «Himedia» и для выращивания штаммов-деструкторов среда 8E: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 - 1,5$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,7$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,8$; $\text{NaCl} - 0,5$; агар – 20 [6].

Изучение деструктивной активности изолятов. Количественную оценку деструктивной активности проводили в жидкой минеральной среде по остаточному количеству нефти и нефтепродуктов весовым методом на 5 и 10 сутки культивирования [7]. Количество потребленной нефти и нефтепродуктов определяли по формуле: $A = (a_1 - a_2) / a_1 \times 100\%$, где A – количество потребленной нефти в %, a_1 – количество внесенной нефти, a_2 – количество остаточной нефти.

Родовую идентификацию активных изолятов, выделенных из корневой зоны растений, проводили при изучении культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств, используя общепринятые методы, предложенные в руководствах [8, 9].

Результаты и обсуждение

Идея практического использования углеводородоксилирующих микроорганизмов в процессах очистки нефтезагрязненных почв перспективна, и в этом направлении осуществляются обширные исследования по их выделению, созданию специальных коллекций и изготовлению различных биологических препаратов [10-11]. Для практического использования нефтеоксилирующих микроорганизмов при создании специальных препаратов необходимы активные деструкторы нефти. Ранее были отобраны изоляты, выделенные из ризосферы и ризопланы растений, выращенных в почве, загрязненной нефтью. Эти изоляты показали высокую способность к росту на среде с нефтью, которая проявлялась в виде разрушения нефти на мелкие агрегаты. Из них 166 изолятов было выделено из ризосферы растений и 105 из ризопланы [12].

У всех изолятов изучена деструктивная активность на 10-20 мл/л нефти, процент утилизации нефти составил 61 – 83%. Однако для отбора перспективных культур необходимо оценить деструктивную активность изолятов при содержании нефти в среде выше 10-20 мл/л. Так как, при низком уровне загрязнения биоремедиацию почв можно провести без

интродукции препаратов. При более высоком уровне загрязнения (выше 2 %) углеводородами почве такие деструкторы могут не прижиться к корням растений и не проявить активности. Поэтому оценку деструктивной активности изолятов проводили, выращивая их в средах от 30 до 50 мл/л углеводородов, культивируя на узеньской нефти, а также на труднодеградируемом субстрате как мазут.

Количественная оценка деструктивной активности у отобранных изолятов по отношению к сырой нефти показала, что степень утилизации различна (таблица 1). При исследовании изолятов на способность к деструкции нефти установлено, что из изученных изолятов, максимальная степень утилизации нефти характерна для 6 или 20% изолятов, потребление нефти составило свыше 50 % относительно контроля при содержании нефти в среде 30 мл/л.

Максимальный процент потребления нефти отмечен у изолята R-RP116, выделенного из ризопланы рапса, и составил $53,7 \pm 1,1\%$. У 14 (46,6%) изолятов степень деструкции находилась в пределах от 40 % до 50 %. 10 изолятов (33,3%) разлагали нефть от 20% до 40 %. Слабо утилизировал нефть изолят L-RP05, и степень утилизации составила $23,3 \pm 0,9\%$.

Остальные из проверенных изолятов, проявили слабую деструктивную активность. По-видимому, изоляты, отнесенные различались по характеру роста на нефти и ее утилизации, обладая разными механизмами разложения нефтяных углеводородов.

У всех исследуемых изолятов деструктивная активность была ниже при выращивании их в среде с содержанием нефти 50 мл/л. Отобрано 20 изолятов характеризующиеся высокой деструктивной активностью. Эти изоляты в дальнейшем будут использоваться совместно с растениями для восстановления загрязненных почв при проведении фиторемедиационных мероприятий. Наибольшую активность проявляли 8 изолятов или 26,6 %, вызывающие более 35% убыли нефти. Наибольшая степень потребления нефти в концентрации 50 мл отмечена у изолята L-RP20 и составила $38,1 \pm 1,9\%$, этот же изолят показал активную утилизацию нефти и при 30 мл нефти. Меньшей активностью обладали 24 изолятов (40%), разлагающие от 12 % до 8 % нефти.

При микробиологическом разрушении нефти окисляются преимущественно парафины нефти, в то время как другие фракции (циклопарафины, ароматические углеводороды,

смолы) менее доступны микробным ферментам [13]. Исходя из этого, отобранные изоляты были проверены на способность утилизировать мазут. При выращивании изолятов на средах с мазутом (10 мл/л среды) в качестве единственного источника углерода и энергии и определении их деструктивной активности было показано (таблица 2), что убыль мазута была

ниже в сравнении с потреблением нефти (при определении деструкции нефти в среду вносили 30 мл и 50 мл нефти на 1 литр среды). Это связано с тем, что мазут относится к числу трудноокисляемым фракциям нефти и в состав мазута входят труднодеградируемые смолы и асфальтены, которые труднее подвергаются деструкции, чем легколетучие [14].

Таблица 1 – Потребление нефти изолятами, выделенными из ризосферы и ризопланы растений

Изоляты	Растение, место выделения	Убыль нефти, %	
		30 мл/л	50 мл/л
L-RZ08	Люцерна, ризосфера	42,7±1,5	33,1±1,6
L-RZ25	Люцерна, ризосфера	45,9±2,1	36,5±1,6
L-RP18	Люцерна, ризоплана	48,6±1,5	36,1±1,6
L-RP20	Люцерна, ризоплана	51,3±1,2	38,1±1,9
R-RZ36	Рапс, ризосфера	48,1±0,9	37,1±2,1
R-RZ20	Рапс, ризосфера	47,4±1,1	24,1±1,7
R-RP116	Рапс, ризоплана	53,7±1,1	28,1±1,2
R-RP28	Рапс, ризоплана	46,9±0,9	34,3±3,1
R-RP13	Рапс, ризоплана	26,8±2,1	16,1±1,6
T-RZ125	Травосмесь, ризосфера	48,5±1,5	34,7±2,4
T-RZ21	Травосмесь, ризосфера	45,9±1,3	33,1±2,6
T-RP72	Травосмесь, ризоплана	48,1±2,1	34,1±2,5
T-RP12	Травосмесь, ризоплана	46,6±1,4	33,1±2,4
YA- RZ16	Ячмень, ризосфера	51,4±1,1	32,3±1,2
YA- RP05	Ячмень, ризоплана	50,9±1,5	23,3±1,6
YA- RP24	Ячмень, ризоплана	33,9±1,3	13,1±2,6
YA- RZ32	Ячмень, ризосфера	47,1±3,1	28,1±2,5
T-RP18	Травосмесь, ризоплана	39,9±1,9	29,5±3,1
L-RP05	Люцерна, ризоплана	23,3±0,9	21,9±1,9
T-RZ06	Травосмесь, ризосфера	48,4±2,1	22,3±1,2
контроль		7,4±0,9	3,1±0,19

В результате исследования способности отобранных изолятов к деструкции мазута установлено, что активным деструктором данного нефтепродукта являются 4 изолята R-RZ20, T-RZ125, T-RP72 и YA- RZ32 – процент убыли мазута была выше 38 % и составила от 38,5±2,2% и 39,7±1,8% на 10 – е сутки культивирования соответственно. Также активными деструкторами мазута являются три изолята (15 %) для которых характерна деструкция от 37 % мазута. У этих же изолятов отмечена активная утилизация мазута и на десятые сутки. У 11 (55 %) изолятов была отмечена убыль мазута от 25 % до 35 %. Так, для изолята R-RZ20 степень деструкции составила 33,3±1,0% и 39,7±1,8% на 5 и 10 сутки эксперимента. Для 2 изолятов отмечена низкая степень разрушения мазута ниже 25 %, а самая низкая утилизация мазута была у изолята R-

RP13 на 14,8±1,1 % и 16,1±0,8 % относительно контроля на 5 и 10 сутки эксперимента. Необходимо отметить, что те изоляты которые оценены как деструкторы нефти, проявили способность и к утилизации мазута (таблица 2).

Выделенные изоляты различались по степени утилизации нефтяных углеводов. Степень потребления мазута была в пределах от 14,8±1,1 до 52,5±2,4 %, а количество потребленной нефти составило от 52,1±0,9 % при концентрации 30, а при высоком содержании нефти 50 мл степень утилизации равнялась – 37,5±3,1 %.

На основании морфологических, культуральных и биохимических признаков бактерий была проведена первичная идентификация отобранных штаммов согласно определителю бактерий Берджи. Большинство бактериальных культур имели палочковидную форму клеток,

некоторые изоляты образовывали эндоспоры (рисунок 1).

Среди активных деструкторов нефти и мазута большинство изолятов относились к грам-

положительных бактериям. Из 20 культур только 7 – оксидазоотрицательные, остальные 13 – оксидазоположительные.

Таблица 2 – Потребление мазута изолятами, выделенными из ризосферы и ризопланы растений

Изоляты	Растения	Убыль мазута, %	
		сутки	
		5	10
L-RZ08	Люцерна, ризосфера	22,5±1,2	31,2±1,8
L-RZ25	Люцерна, ризосфера	21,7±1,5	30,8±1,9
L-RP18	Люцерна, ризоплана	24,5±1,2	32,5±1,8
L-RP20	Люцерна, ризоплана	28,5±1,2	37,2±2,4
R-RZ36	Рапс, ризосфера	25,1±0,7	31,4±2,3
R-RZ20	Рапс, ризосфера	33,3±1,0	39,7±1,8
R-RP116	Рапс, ризоплана	31,4±1,0	34,8±1,7
R-RP28	Рапс, ризоплана	32,6±0,7	37,3±2,1
R-RP13	Рапс, ризоплана	14,8±1,1	16,1±0,8
T-RZ125	Травосмесь, ризосфера	23,4±1,2	38,6±2,5
T-RZ21	Травосмесь, ризосфера	23,7±1,2	30,2±2,8
T-RP72	Травосмесь, ризоплана	35,3±1,1	38,2±2,8
T-RP12	Травосмесь, ризоплана	31,3±1,1	37,1±2,8
YA- RZ16	Ячмень, ризосфера	30,8±1,2	32,5±2,1
YA- RP05	Ячмень, ризоплана	27,6±1,2	35,3±2,2
YA- RP24	Ячмень, ризоплана	23,2±1,0	31,7±2,2
YA- RZ32	Ячмень, ризосфера	32,1±2,1	38,5±2,2
T-RP18	Травосмесь, ризоплана	27,6±1,4	32,5±2,3
L-RP05	Люцерна, ризоплана	18,3±0,5	24,8±1,7
T-RZ06	Травосмесь, ризосфера	25,3±1,1	31,2±1,4
контроль		4,9±0,5	3,3±0,2

Установлено, что все активные изоляты отнесены к бактериям и представлены следующими родами: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Gordonia* и *Bacillus*.

Таким образом, отобраны изоляты, выделенные из ризосферы и ризопланы растений, способные утилизировать нефть и тяжелые нефтепродукты. Изоляты различались по степени утилизации нефтяных углеводородов. Степень потребления мазута была в пределах

от 16,1±0,8 до 39,7±1,8%, а количество потребленной нефти составило от 52,1±0,9 % при концентрации 30 мл, а при высоком содержании нефти 50 мл степень утилизации равнялась – 37,5±3,1 %. Среди выделенных активных изолятов были идентифицированы представители 5 родов микроорганизмов: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Gordonia* *Bacillus*.

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 Турковская О.В., Муратова А.Ю. Биодegradация органических поллютантов в корневой зоне растений // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциированных микроорганизмов с растениями. – М.: Наука, 2005. – С. 180-208.
- 3 Muratova A., Golubev S., Wittenmayer L., Dmitrieva T., Bondarenkova A., Hirche F., Merbach W., Turkovskaya O. Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench // *Environ. Experim. Bot.* – 2009. – № 3, Vol. 66. – P. 514-521
- 4 Муратова А.Ю., Голубев С.Н., Мербах В., Турковская О.В. Биохимические и физиологические особенности

- взаимодействия *Sinorhizobium meliloti* и *Sorghum bicolor* в присутствии фенантрена // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 3. – С. 347–354.
- 5 Практикум по микробиологии / под ред. А.Н. Нетрусова. – М.: Academia, 2005. – С.597.
 - 6 Raymond R.L. Degradation of the hydrocarbons by pure strains // Development industrial microbiology. – 1961. – Vol. 2. – P. 23 – 32.
 - 7 Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – 448 с.
 - 8 Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: МГУ, 1991. – С. 59-75.
 - 9 Определитель бактерий Берджи: В 2 т. / Под ред. Дж.Хоулга, Н Крига, П.Смита, С.Ульямса.-М.: Мир, 1997, 456 p.
 - 10 Dua M., Singh A., Sethunathan N., Johri A.K. Biotechnology and bioremediation: Successes and limitations / Dua M., Singh A., Sethunathan N., Johri A.K. // Appl. Microbiol. and Biotechnol. – 2002. – 59, № 2-3. – С. 143-152
 - 11 Шигаева М.Х., Мукашева Т.Д. Биотехнологические подходы в очистке нефтезагрязненной окружающей среды // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2007. – № 1 (31). – С. 35-42.
 - 12 Togzhan Mukasheva, Lyudmila Ignatova, Ramza Berzhanova, Raihan Sydykbekova, Anel Omirbekova, Makpal Kargaeva Isolation of microorganisms – destructors of oil hydrocarbons from rhizosphere and rhizoplane of plants // 5th Congress Of European Microbiologists FEMS, Leipzig, Germany, July 21-25, 2013.
 - 13 Jingchun Tang. Bioremediation of petroleum polluted soil by combination of ryegrass with effective microorganisms // Journal of Environmental Technology and Engineering. – 2010. – № 3 (2). – P. 80-86.
 - 14 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.

References

- 1 Ronald M. Atlas and Terry C. Hazen Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in US History // Environmental Science Technology. - 2011 . - № 45 , P. 6709-6715.
- 2 Turkovskaya O., A. Muratov Biodegradation of organic pollutants in the root zone of plants // Molecular basis of relationships of microorganisms associated with plants. - Moscow: Nauka, 2005 . Pp. 180-208 .
- 3 Muratova A., Golubev S., Wittenmayer L., Dmitrieva T., Bondarenkova A., Hirche F., Merbach W., Turkovskaya O. Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench // Environ. Experim. Bot. - 2009 . - № 3 , Vol. 66 . - P. 514-521
- 4 A. Muratov , S. Golubev , Merbah V., OV Turkovskaya Biochemical and physiological features of the interaction *Sinorhizobium meliloti* and *Sorghum bicolor* in the presence of phenanthrene // Microbiology . - 2009 . - Т. 78 , № 3 . - S. 347-354 .
- 5 Workshop on Microbiology / under. Ed. AN Netrusov . - Moscow : Academia, 2005 . - S.597 .
- 6 Raymond R.L. Degradation of the hydrocarbons by pure strains // Development industrial microbiology. - 1961 . - Vol. 2 . - P. 23 - 32.
- 7 JJ Lurie Analytical chemistry of industrial wastewater. - Moscow: Khimiya , 1984 . - 448 .
- 8 DG Zvyagintsev Methods of Soil Microbiology and Biochemistry . - Moscow: MGU, 1991 . - Pp. 59 - 75 .
- 9 Keys to bacteria Bergey : In 2 t / Ed. Dzh.Houlga H Krieg , P. Smith , S.Ulyamsa. -M . : World , 1997, 456 p .
- 10 Dua M., Singh A., Sethunathan N., Johri A.K. Biotechnology and bioremediation: Successes and limitations / Dua M., Singh A., Sethunathan N., Johri AK // Appl. Microbiol. and Biotechnol. - 2002 . - 59 , № 2-3. - S. 143-152
- 11 Shigaeva MH, Mukasheva TD Biotechnological approaches in cleaning oil-contaminated environment // Bulletin Treasury . Biology Series . - 2007 . - № 1 (31) . -С . 35-42 .
- 12 Togzhan Mukasheva, Lyudmila Ignatova, Ramza Berzhanova, Raihan Sydykbekova, Anel Omirbekova, Makpal Kargaeva Isolation of microorganisms - destructors of oil hydrocarbons from rhizosphere and rhizoplane of plants // 5th Congress Of European Microbiologists FEMS, Leipzig, Germany, July 21-25, 2013 .
- 13 Jingchun Tang. Bioremediation of petroleum polluted soil by combination of ryegrass with effective microorganisms // Journal of Environmental Technology and Engineering. - 2010 . - № 3 (2) . - P. 80-86.
- 14 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.