

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 65, Number 312 (2015), 105 – 109

**MICROBIAL INOCULATION OF PLANTS
BY RHIZOSPHERE MICROORGANISMS-DESTRUCTORS OF OIL
IN MODEL SYSTEMS**

**A. A. Omirbekova, T. D. Mukasheva, R. Zh. Berzhanova, R. K. Sydykbekova,
L. V. Ignatova, N. K. Bektyleuova, M. T. Kargaeva, M. H. Shigaeva**

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: ramza.berzhanova@kaznu.kz

Keywords: gnotobiotic system, alfalfa, bacteria, inoculation, biometrical parameters.

Abstract. A sufficient number of destructive contaminant microorganisms in association with the plant which provides the reduction of pollutants in the environment are one of the important conditions for the successful application of rhizoremediation. Using the techniques of plant inoculation withoil destructing strains is an effective way to increase plant tolerance to pollutants and contributes to the effectiveness and acceleration of rhizoremediation. Thus, the study of the nature of the interactions between microorganisms and the root zone of the plants contaminated with petroleum hydrocarbons in model systems have shown the detection of strains identifiedas *Gordonia terrae* L-RP18 and *Rhodococcuserythropolis* L-RP20 after the .inoculation of alfalfa with microorganisms. After estimating the number of microorganisms in the rhizosphere and rhizoplane it has been shown that the number of microorganisms on the surface of the roots was higher comparing to the rhizosphere, which may be associated with the release of exudates by plants that stimulate microbial activity. Analysis of biometric indicators showed that the length of the shoots was 30% higher than in control samples without bacteria. The best protective effect on the plants was observed in systems containing strains.

УДК 633.311:579.64

**МИКРОБНАЯ ИНОКУЛЯЦИЯ РАСТЕНИЙ
РИЗОСФЕРНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ-ДЕСТРУКТОРАМИ
НЕФТИ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ**

**А. А. Омирбекова, Т. Д. Мукашева, Р. Ж. Бержанова, Р. К. Сыдыкбекова,
Л. В. Игнатова, Н. К. Бектилеуова, М. Х. Шигаева**

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: гнотобиотическая система, люцерна, бактерии, инокуляция, биометрические характеристики.

Аннотация. Одним из важных условий успешного применения ризоремедиации является достаточное количество разрушающих загрязнитель микроорганизмов в ассоциации с растением обеспечивающих снижение уровня поллютанта в среде. Использование приемов инокуляции растений штаммами-деструкторами нефти представляется эффективным способом повышения толерантности растения к загрязнителю и способствует повышению результативности и ускорению ризоремедиации. Так, при изучении характера взаимодействия интродуцированных микроорганизмов с корневой зоной растений загрязненных углеводородами нефти в модельных системах показало, что на корнях растений люцерны выявлены инокулированные штаммы *Gordoniaterre* L-RP18 и *Rhodococcuserythropolis* L-RP20. При оценке численности микроорганизмов в ризоплане и ризосфере было показано, что численность микроорганизмов на поверхности корней была выше по сравнению с ризосферой, что может быть связано с выделением экссудатов растениями, что стимулирует микробную активность. Анализ биометрических показателей показал, что длина побегов была на 30% выше, чем в контрольных образцах без бактерий. Наилучший защитный эффект на растения наблюдался в системах, содержащие штаммы внесенных микроорганизмов.

Одним из основных условий успешного применения фиторемедиации является хорошая приживаемость и развитие используемых растений и связанное с этим достаточное количество разрушающих загрязнитель микроорганизмов, которые в ассоциации с растением обеспечивают снижение уровня поллютанта в среде. Использование приемов инокуляции растений штаммами-деструкторами загрязнителя представляется эффективным способом повышения толерантности растения к загрязнителю - токсиканту и способствует повышению результативности и ускорению фиторемедиации, особенно на начальных ее этапах [1, 2].

Инокуляция растений активными штаммами-деструкторами способствует снижению поллютантного стресса. Улучшение роста растений в загрязненном грунте может происходить как за счет снижения его фитотоксичности в результате микробной деградации поллютанта, так и за счет стимулирующей рост растений активности штаммов-инокулянтов.

Микроорганизмы-инокулянты влияют на продукцию корневых выделений самим своим присутствием в среде, разлагая вещества, выделяемые корнями, а также посредством своих метаболитов и ферментов увеличивают проницаемость клеточных мембран, вызывая тем самым усиление экссудации.

Целью работы явилось изучение характера взаимодействия интродуцированных микроорганизмов с корневой зоной растений в модельных системах загрязненными углеводородами нефти.

Материалы и методика исследования

В качестве объекта исследования использовалась люцерна, которая показала устойчивость к различным концентрациям нефти [3]. Для инокуляции растений применяли активные штаммы-деструкторы углеводородов, выделенные из ризосферы и ризопланы растений, толерантные к нефти: *Gordoniaterreae* T-RP 18 и *Rhodococcuserythropolis* L-RP20 [4]. Для определения численности микроорганизмов ризосферы и ризопланы растений использовали мясопептонный агар (МПА) – стандартная питательная среда в виде порошка (HIMEDIA).

Изучение характера взаимодействия интродуцированных микроорганизмов в модельных системах, загрязненных углеводородами нефти. Для модельного эксперимента были использована закрытая система, представляющая собой гнотобиотическую модель [5], состоящую из стерильного песка, стерильных семян люцерны, стерильная нефти и различных комбинаций исследуемых микроорганизмов.

Выращивание растений проводили в маджентах (Magenta vessel, фирма "Sigma") содержащей 150 г песка, нефть вносили в концентрации 2%. Семена люцерны стерилизовали 10 % раствором гипохлорита натрия. Микроорганизмы вносили непосредственно в песок в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/ г песка, а затем помещали в мадженты стерильные проростки растений [7]. Для обеспечения минерального питания растений использовали среду Мурасиге-Скуга.

Через 7 дней эксперимента оценивались следующие параметры: численность микроорганизмов в корневой зоне растений; морфологические показатели растений.

Результаты и обсуждение

При подборе микробно-растительных ассоциаций для наиболее эффективной биодеградации нефти необходимо изучать и учитывать взаимодействие бактерий-деструкторов друг с другом и растениями, с целью избежать нежелательных явлений, которые могут негативно сказываться как на микробно-растительных ассоциациях, так и на самом процессе ремедиации загрязненных территорий в целом [6].

Ранее изкорневой системы люцерны, выращенной в присутствии нефти были выделены и охарактеризованы бактерии-деструкторы нефти и нефтепродуктов, однако взаимодействие этих микроорганизмов с ризосферой растений в модельных системах, загрязненных углеводородами нефти не изучалось [4].

Способ непосредственной инокуляции бактериальной суспензии в стерильный песок является наиболее эффективным методом внесения микроорганизмов. Контролем в данном эксперименте служили стерильная система без растений с нефтью, стерильная система с растениями без нефти (рисунок 1).

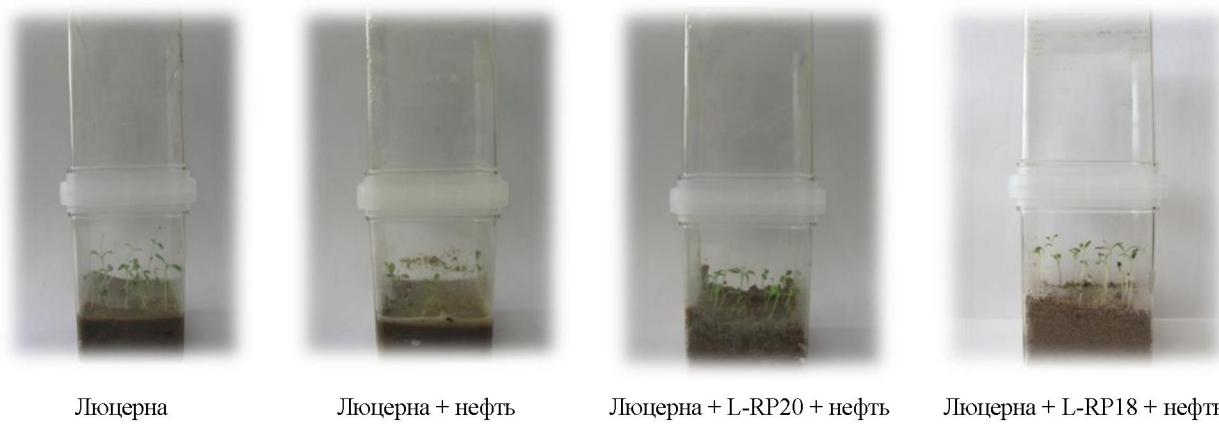


Рисунок 1 – Модельные генотипотические системы

При использовании штаммов-деструкторов *Gordoniaterrae* L-RP18 и *Rhodococcuserythropolis* L-RP20, численность клеток в ризосфере и ризоплане люцерны была выше на один порядок по сравнению с растениями, выращенными в отсутствии нефти. Эти данные свидетельствуют, что корни растений были колонизированы внесенными штаммами микроорганизмов. Также установлено, что численность была выше на поверхности корней, чем в ризосфере, что может быть обусловлено наличием экссудатов растений (рисунок 2).

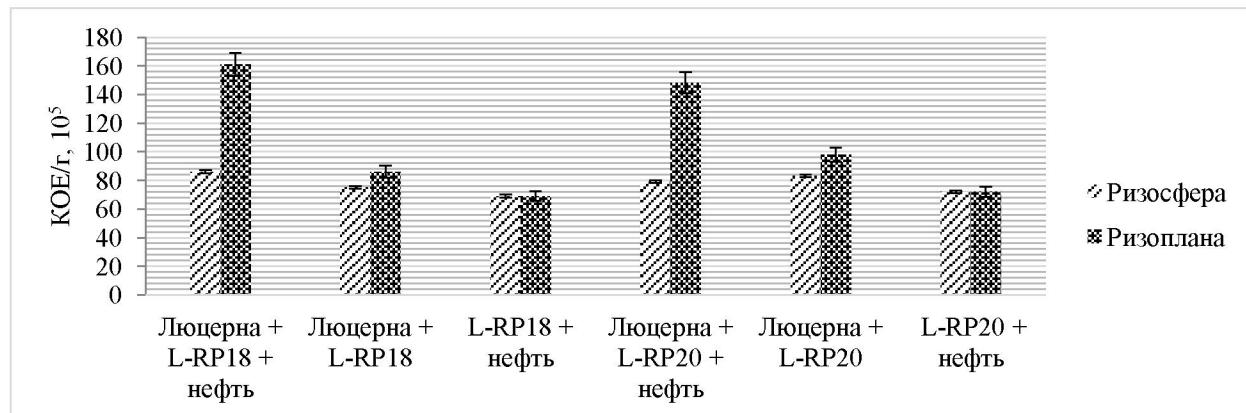


Рисунок 2 – Численность интродуцированных микроорганизмов на корнях люцерны через 7 суток культивирования растений, KOE/g

Так, при интродукции штамма *Gordoniaterrae* L-RP18, в ризосфере численность составила $86 \pm 1,2 \times 10^5$ KOE/g почвы, в ризоплане - $161 \pm 0,6 \times 10^5$ KOE/g корня. При использовании культуры *Rhodococcuserythropolis* L-RP20, численность в ризосфере составила $79 \pm 0,4 \times 10^5$ KOE/g почвы, в ризоплане - $148 \pm 0,5 \times 10^5$ KOE/g корня.

Нефть оказывала значительный фитотоксический эффект на побеги растений люцерны. Так, измерение длины побегов растений люцерны через 7 суток выращивания в системе с нефтью без микроорганизмов, показало, что длина побегов была на 30% ниже, чем в контрольных образцах без нефти и бактерий. Наилучший защитный эффект на растения наблюдался в системах, содержащих штаммы *Gordoniaterrae* L-RP18 и *Rhodococcuserythropolis* L-RP20 (рисунок 3).

Нефть и нефтепродукты, а также исследуемые культуры бактерий негативно или положительно влияли на рост и развитие проростков в маджентах. Углеводороды губительно действовали на проростки люцерны, надземная и подземная части растения были очень короткими по сравнению с контролем, а также высшие проростки были слабыми и могли даже привести к развитию аномального растения. Исследуемые культуры, наоборот, оказывали стимулирующее действие на люцерну (рисунок 4).

Согласно литературным данным, корень растения представляет собой весьма неоднородную сферу местообитания микроорганизмов. Его различные части отличаются как интенсивностью

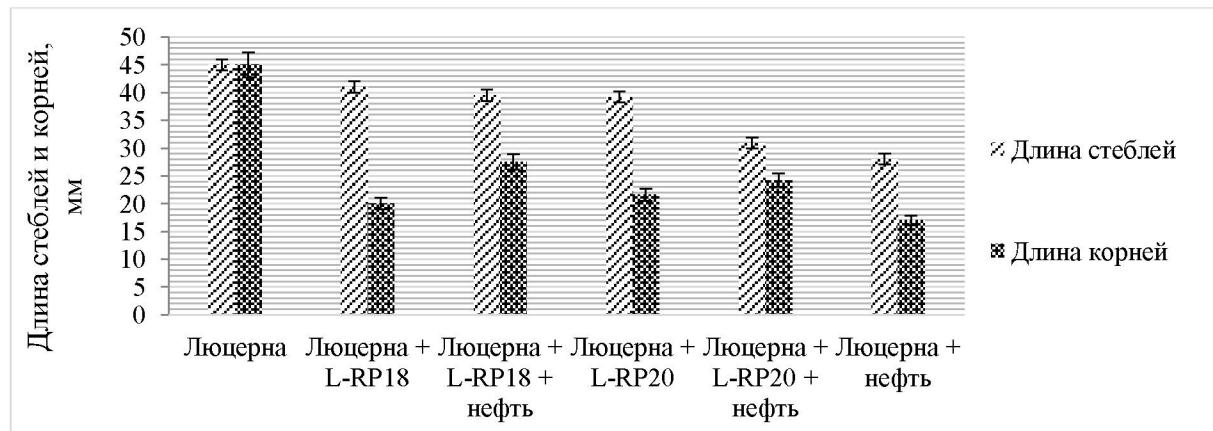


Рисунок 3 – Влияние штаммов-деструкторов на биометрические показатели роста люцерны

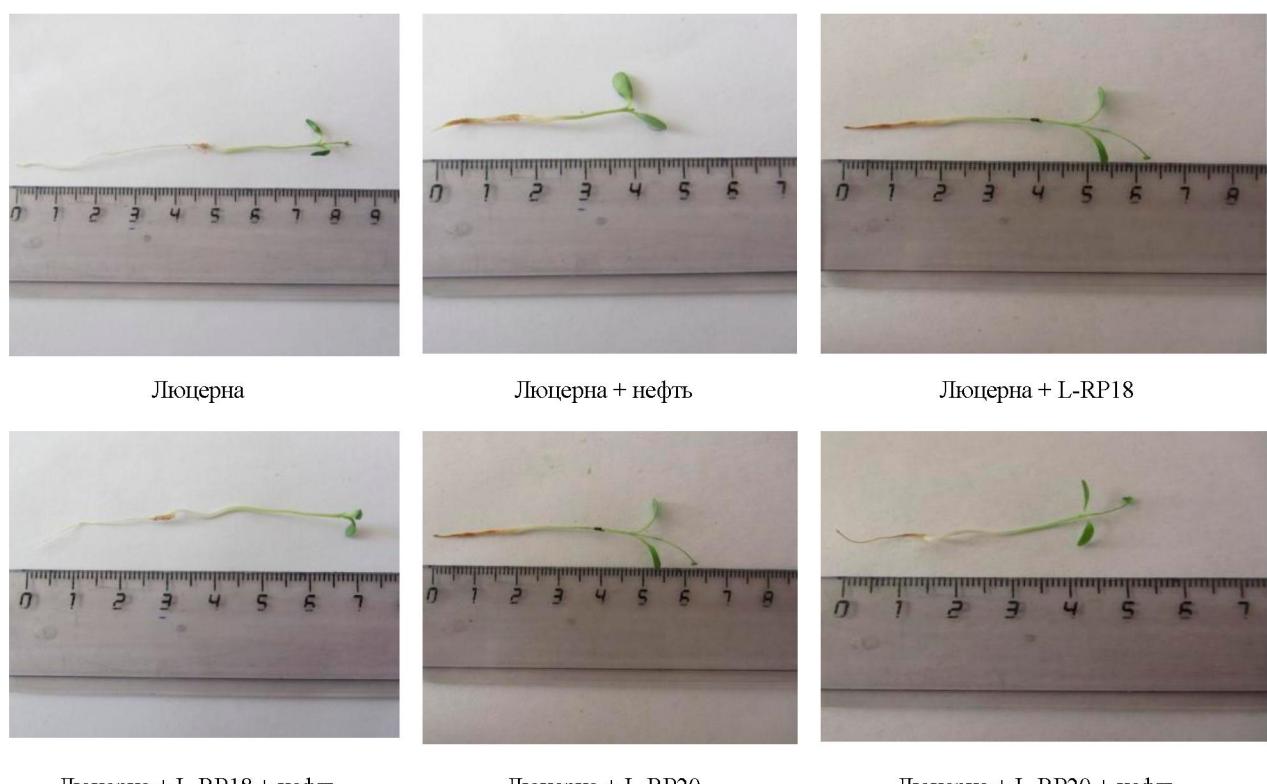


Рисунок 4 – Длина подземной и надземной частей люцерны в модельной системе при влиянии штаммов-деструкторов и нефти

выделения, так и составом корневых выделений. При интродукции активных штаммов бактерий в корневую зону растений именно их корневые экзометаболиты в значительной степени определяют интеграцию микроорганизмов с растением и дальнейшее совместное функционирование.

Таким образом, при оценке численности микроорганизмов в ризоплане и ризосфере было показано, что концентрация микроорганизмов на поверхности корней была выше по сравнению с ризосферой, что может быть связано с выделением экссудатов растениями, что стимулирует микробную активность. Установлено, что корни растений люцерны были колонизированы внесенными штаммами микроорганизмов. При изучении влияния нефти на растения в присутствии интродуцированных микроорганизмов установлено, что длина побегов была на 30% выше, чем в контрольных образцах без бактерий. Наилучший защитный эффект на растения наблюдался в системах, содержащих штаммы внесенных микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

- [1]Siciliano S., Fortin N., Mihoc A., Wisse G., Labelle S., Beaumier D., Roy R. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination // Appl Environ Microbiol. – 2001. – V.67. – P. 2469–2475.
- [2]Escalante-Espinosa E., Gallegos-Martinez M., Favela-Torres E., Gutierrez-Rojas M. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus latus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system // Chemosphere. – V. 59. – P. 405–413.
- [3]Togzhan D. Mukasheva, Lyudmila V. Ignatova, RamzaZh. Berzhanova, Raihan K. Sydykbekova, Anel A. Omirbekova, Dinara Dautova Screening of plants-phytoremediators resistant to oil pollution//Book of proceedings of 5th International SymposiumonBiosorption and Bioremediation. – 2012. – P. 56-59.
- [4]Omirbekova A., Kargayeva M., Mukasheva T., Sydykbekova R., Berzhanova R., Ignatova L. Isolation of oil-degrading microorganisms from rhizoplane and rhizosphere of plants and evaluation of their destructive activity// FEBS Journal. – 2013. - V. 280, Issue Supplement s1, P. 1-661.
- [5]Simons M., Van der Bij A.J., Brand J., de Weger L.A., Wijffelman C.A., Lugtenberg B.J. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria // Mol. Plant-Microbe Interact. - 1996. - V. 9. № 7. - P. 600-607
- [6]Kirk J.L., Kironomos J.N., Lee H., Trevors J.T. Phytotoxicity Assay to Assess Plant Species for Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soil // Bioremediation Journal. - 2002. - №6. - P.57-63.
- [7]Kvesitadze G., Khatashvili G., Sadunishvili T., Ramsden J.J. Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants: Basis of Phytoremediation // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. - 2006. – P. 61 - 124.

REFERENCES

- [1]Siciliano S., Fortin N., Mihoc A., Wisse G., Labelle S., Beaumier D., Roy R. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination // Appl Environ Microbiol. – 2001. – V.67. – P. 2469–2475.
- [2]Escalante-Espinosa E., Gallegos-Martinez M., Favela-Torres E., Gutierrez-Rojas M. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus latus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system // Chemosphere. – V. 59. – P. 405–413.
- [3]Togzhan D. Mukasheva, Lyudmila V. Ignatova, RamzaZh. Berzhanova, Raihan K. Sydykbekova, Anel A. Omirbekova, Dinara Dautova Screening of plants-phytoremediators resistant to oil pollution//Book of proceedings of 5th International SymposiumonBiosorption and Bioremediation. – 2012. – P. 56-59.
- [4]Omirbekova A., Kargayeva M., Mukasheva T., Sydykbekova R., Berzhanova R., Ignatova L. Isolation of oil-degrading microorganisms from rhizoplane and rhizosphere of plants and evaluation of their destructive activity// FEBS Journal. – 2013. - V. 280, Issue Supplement s1, P. 1-661.
- [5]Simons M., Van der Bij A.J., Brand J., de Weger L.A., Wijffelman C.A., Lugtenberg B.J. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria // Mol. Plant-Microbe Interact. - 1996. - V. 9. № 7. - P. 600-607
- [6]Kirk J.L., Kironomos J.N., Lee H., Trevors J.T. Phytotoxicity Assay to Assess Plant Species for Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soil // Bioremediation Journal. - 2002. - №6. - P.57-63.
- [7]Kvesitadze G., Khatashvili G., Sadunishvili T., Ramsden J.J. Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants: Basis of Phytoremediation // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. - 2006. – P. 61 - 124.

МОДЕЛЬДІ ЭКОЖҮЙЕЛЕРДЕ МҰНАЙДЫ ҮДҮРІАТУҒА ҚАБІЛЕТТИ РИЗОСФЕРАЛЫ МИКРООРГАНИЗМ-ДЕСТРУКТОРЛАРЫМЕН ӨСІМДІКТЕРДІ МИКРОБЫ ТАРАНДЫРЫЛЫП ИНOKУЛЯЦИЯЛАУ

**А. А. Өмірбекова, Т. Д. Мұқашева, Р. Ж. Бержанова, Р. К. Сыдықбекова,
Л. В. Игнатова, Н. К. Бектілеуова, М. Т. Қарғаева, М. Х. Шигаева**

Тірек сөздер: гнотобиотикалық жүйе, жонышка, бактерия, инокуляция, биометриялық сипаттамалар.

Аннотация. Ризоремедиацияның қолданудың маңызды жағдайларының бірі ортадағы ластандыруышының деңгейін азайтуды қамтамасыз ететін өсімдіктер мен микроорганизмдердің бірлестігі, ластандырыушының жоғары деңгейдегі мөлшерін үздіргіштіктердің әдістерінде үзілділіктердің жағдайларын түсіндірді. Осімдіктер мен мұнайдың деструктор-штаммдарын инокуляциялау тәсілдері өсімдіктердің ластандырушыға тәзімділігін жоғарылатудың эффективтіктерінде үзілділіктердің жағдайларын түсіндірді. Сонымен, модельді жүйеде өсімдіктің мұнай көмірсутектерімен ластанған тамыр аймағы мен инокуляцияланған микроорганизмдердің бірлесіп әсер ету сипаттын зерттеу кезінде жонышка өсімдігінің тамыр аймағында инокуляцияланған *Gordonia terrae*L-RP18 және *Rhodococcus erythropolis* L-RP20 штамдарының бар екендігі байқалды.

Ризоплан мен ризосфера дағы микроорганизмдердің санын бағалауда тамырдың беткі жағында микроорганизмдердің саны ризосферамен салыстырғанда жоғарылау болды, ол өсімдіктердің микробтардың белсенділігін артыратын экссудаттардың бөлінуіне байланысты болуы мүмкін. Биометриялық көрсеткіштердің талдауы бойынша бактериясы жоқ бакылау үлгісіне қарағанда бактерия клеткалары инокуляцияланған үлгілерде өскіндердің ұзындығы 30 % жоғары болды. Яғни, өсімдіктерде микроорганизмдердің штамдары инокуляцияланған жүйелерде едөүр жоғары корғаныштық әсер байқалды.

Поступила 05.11.2015 г.