

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 317 (2016), 137 – 142

A. A. Omirbekova, T. D. Mukasheva, R. Zh. Berzhanova, R. K. Sydykbekova, L. V. Ignatova,
N. K. Bektyleuova, N. Davenova, K. R. Baymahanova, S. Ibraimova, M. H. Shigaeva

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

E-mail: togzhan.mukasheva@kaznu.kz

INTERACTION OF BACTERIA-DESTRUCTORS AND PLANTS IN A MODEL SYSTEMS OF OIL POLLUTION

Abstract. Using techniques of inoculation of plants by active strains-destroyers is an effective way to improve the tolerance of plants to pollutant and contributes to increase productivity and acceleration of purification processes of oil-polluted soil. In model studies the effectiveness of plant-microbial associations composed of plants (alfalfa or barley) and microorganisms-destroyers of oil – *Rhodococcus* SP, T-RP 18 and *Gordoniarubripertincta* L-RP 20 were assessed. The decline of hydrocarbons in oil-polluted soil when using plant-microbial associations was more than 60%.

Keywords: plant-microbial association, alfalfa, barley, microorganisms-destroyers, proline, peroxidase, inoculation.

УДК 633.311:579.64

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

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

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ И РАСТЕНИЙ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ

Аннотация. Использование приемов инокуляции растений активными штаммами-деструкторами является эффективным способом повышения толерантности растения к загрязнителю и способствует повышению результативности и ускорению процессов очистки нефтезагрязненной почвы. В модельных исследованиях проведена оценка эффективности растительно-микробных ассоциаций, состоящих из растений (люцерна или ячмень) и микроорганизмов – деструкторов нефти – *Rhodococcus* sp. T-RP 18 и *Gordoniarubripertincta* L-RP 20. Убыль углеводов в нефтезагрязненной почве при использовании растительно-микробных ассоциаций была более 60 %.

Ключевые слова: растительно-микробная ассоциация, люцерна, ячмень, микроорганизмы – деструкторы, пролин, пероксидазы, инокуляция.

Растения и ассоциированные с ними микробные комплексы в условиях углеводородного загрязнения могут приводить к усилению очистки среды, с одной стороны, и изменению растительно-микробных взаимодействий – с другой. Взаимоотношение растений и микроорганизмов в ризосфере реализуется через предоставление ниши для развития микроорганизмов, а корневые выделения регулируют развитие ризомикробиоты. В свою очередь, метаболическая активность микроорганизмов, их способность к продукции биологически активных веществ обеспечивают рост и развитие растений [1-3].

Выявление влияния партнеров растительно-микробных ассоциаций под действием углеводородного загрязнения являлось задачей исследований. Изменения биохимических и физиологических характеристик растения в ответ на стресс проявляются раньше, чем становятся видны морфологические изменения. Учитывая это, в условиях загрязнения углеводородами можно ожидать отчетливые изменения биохимических и физиологических процессов, среди которых корневые выделения являются связующим звеном в сложной системе растение-микробы-загрязнитель, могут иметь важное значение для фиторемедиации [4, 5].

Материалы и методика исследования. Растительно-микробных ассоциаций, состоящих из растений (люцерна или ячмень) и активных микроорганизмов – деструкторов нефти – *Rhodococcus* sp. T-RP 18 и *Gordoniarubripertincta* L-RP 20 [5].

Для поддержания и выращивания микроорганизмов – деструкторов нефти использовались среды: мясопептонный агар - Titan Biotech LTD, Индия; среда 8E - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (состав солей (г/л воды) – 1,5; KH_2PO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; NaCl – 0,5; агар – 20.

Инокуляция растений активными углеводородоокисляющими микроорганизмами ризосферы и ризопланы растений. Опытные растения выращивали в 2 л сосудах, заполненных 2 кг нефтезагрязненной (20 г нефти на кг почвы) или незагрязненной углеводородами нефти (контроль) почвой. Использовались почвогрунты, взятые с месторождения Жанаозен (Узень). Предварительно проводили определение остаточного количества нефти в почве. В каждый сосуд помещали 10 семян одного растения и выращивали в ростовой комнате при условиях – 14-ти часового светового периода и 10 часов темнового периода. Продолжительность культивирования составила 36 суток.

Семена растений стерилизовали 10 % раствором гипохлорита натрия в течение 30 мин., затем промывали 4 раза стерильной водопроводной водой в течение 2 часов. Семена раскладывали на Л-агар и инкубировали 18-20 ч при 24°C, для контроля стерильности семян. Инокуляцию микроорганизмами проводили погружением семян в течение 2-3 ч в суспензию, содержащую клетки штаммов, в концентрации $1.3 \cdot 10^8$ клеток/мл [6].

Схема эксперимента

1. Растение
2. Нефть + растение
3. Растения + ассоциация микроорганизмов
4. Нефть + растения+ ассоциация микроорганизмов

Через 10/30 суток оценивали: остаточное содержание нефти в почве; определение содержания свободного пролина; определение активности пероксидазы.

Определение содержания нефти в образцах гравиметрическим методом [7].

Содержание пролина определяли в вегетативных органах проростков по модифицированному методу, описанному L.Bates с соавторами [8]. Для определения содержания пролина был построен калибровочный график в интервале от 0,01 до 0,2 мМ пролина. При построении графика использовали навеску и различные разведения чистого пролина фирмы “Ajinomoto” (Япония).

Определение активности пероксидазы проводили по методу, описанному в работе [9]. Активность фермента рассчитывали по формуле: $A = (D (\alpha + \beta + \gamma)) / td$, где D - оптическая плотность, равная 0,250; d – толщина слоя жидкости (толщина кюветы), см; t - время, с; α - отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки, мл, к массе навески, г; β - степень дополнительного разведения вытяжки (если это потребуется); γ - степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси (при данных условиях).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью встроенного статистического пакета Excel (MS Office 2007).

Результаты и обсуждение

При воздействии на растения поллютантов происходят значительные изменения в метаболизме их клеток, что, в первую очередь, связано с активностью ферментов. Среди последних пристальное внимание к себе в настоящее время привлекают пероксидазы и полифенолоксидазы, которые являются одними из широко распространенных. Им отводится важная роль в реализации

защитного и адаптивного потенциала растений, испытывающих воздействие загрязнителей или патогенов. Эти ферменты так же участвуют в регулировании процессов роста [10-12]. Установлено, что растворимые пероксидазы, представленные цитоплазматической формой фермента и слабо связанные с клеточными стенками, наиболее чувствительны к влиянию стрессовых факторов. Пероксидаза, являясь окислительно-восстановительным ферментом, контролирует уровень перекиси водорода и антиоксидантов в проростках растений, а антиоксиданты, накапливаясь в тканях, участвуют в реакциях подавления образования радикалов. Пероксидаза входит в состав антиоксидантной системы растений, активность которой определяет их уровень устойчивости к различным воздействующим факторам в процессе онтогенеза. Обладая широкой субстратной специфичностью, фермент может проявлять свойства оксидазы. Активность пероксидазы возрастает с увеличением дыхания у пшеницы при выходе их из состояния вынужденного покоя [11]. Поскольку образование некоторых активных форм кислорода, в том числе и перекиси водорода в настоящее время считается одним из основных механизмов системной устойчивости растений, то изменение активности растворимых пероксидаз может служить в качестве биоиндикатора развития устойчивости растения.

На рисунках 1, 2 представлены результаты определения пероксидазной активности, выраженные в единицах относительной активности.

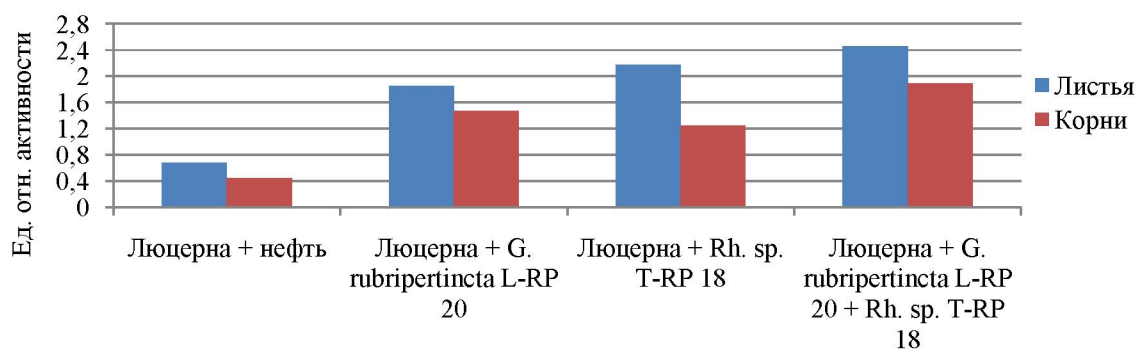


Рисунок 1 – Активность пероксидаз в листьях и корнях люцерны, выращенных на нефтезагрязненной почве в присутствии интродуцированных углеводородокисляющих микроорганизмов

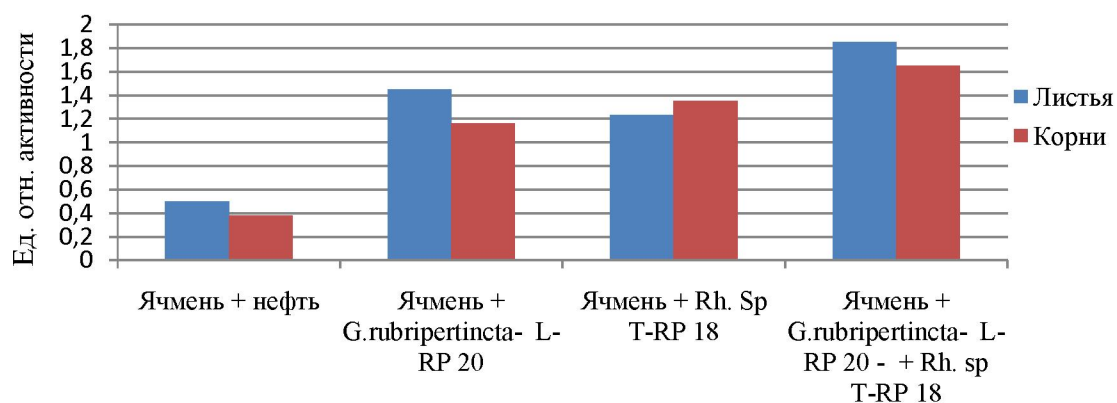


Рисунок 2 – Активность пероксидаз в листьях и корнях ячменя, выращенных на нефтезагрязненной почве в присутствии интродуцированных углеводородокисляющих микроорганизмов

Полученные данные показали, что загрязнение почвы нефтью влияло на активность пероксидаз растений ячменя и люцерны. Степень воздействия нефтяных углеводородов на активность оксидаз растений в присутствии интродуцированных микроорганизмов была неоднозначной в различных органах тестируемого растения. У 14 суточных проростков растений при 2%-ном загрязнении почвы нефтью, без внесения микроорганизмов, активность фермента возрастала в корнях в 1,5 раза, а в листьях в 2 раза. Инокулирование семян штаммами *Rhodococcus* sp. T-RP 18 и

Gordoniarubripertincta L-RP20 приводило к увеличению показателя пероксидазной активности растений. Кроме того, надо отметить, что при инокулировании ассоциацией микроорганизмов степень активности была в несколько раз выше в сравнении с обработкой семян монокультурами.

Вероятно, под действием нефти происходила стимуляция активности пероксидаз как неспецифической реакции растений на загрязнение почвы. Может быть, фенольные соединения, содержащиеся в нефти, транслоцировались в анализируемых растениях, и индуцировали активизацию фермента. Известно, что окисление фенольных соединений с участием пероксидазы является неспецифической защитной реакцией растений пшеницы на воздействие разных по природе стрессоров. В данном случае индукция пероксидаз, вероятно, связана с эффектом детоксикации нефтяных углеводородов растениями [11].

Учитывая важную роль пролина адаптации к абиотическим факторам среды [12-14], целью данного этапа работы явилось изучение накопления свободного пролина у ячменя и люцерны при инокулировании углеводородокисляющими микроорганизмами. Объектом исследования служили 14 дневные проростки растений. Было показано достоверное накопление свободного пролина в корнях растений при обработке семян суспензией микроорганизмов в условиях загрязнения нефтью (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние обработки семян активными микроорганизмами – деструкторами нефти на накопление свободного пролина в вегетативных органах проростков растений в условиях загрязнения нефтью

Варианты опыта	Накопление свободного пролина в вегетативных органах растений, мг/г	
	листья	корни
Ячмень		
Контроль (Растение)	0,25±0,001	0,28±0,004
Контроль (Растение + нефть)	0,60±0,002	0,60±0,004
<i>G. rubripertincta</i> L-RP-20	1,20±0,07	1,45±0,11***
<i>Rh. sp</i> T-RP 18	1,25±0,6	1,75±0,11***
<i>G. rubripertincta</i> L-RP-20 + <i>Rh. sp</i> T-RP 18	1,55±0,7	2,10±0,12***
Люцерна		
Контроль (Растение)	0,30±0,2	0,60±0,04
Контроль (Растение + нефть)	0,75±0,7	1,15±0,04
<i>G. rubripertincta</i> L-RP-20	0,40±0,3	1,45±0,11***
<i>Rh. sp</i> T-RP 18	0,80±0,7	1,25±0,11***
<i>G. rubripertincta</i> L-RP-20 + <i>Rh. sp</i> T-RP 18	0,65±0,7	1,35±0,11***
***При P < 0,001 относительно контроля.		

При использовании растительно-микробных ассоциаций *Rhodococcus sp.* T-RP 18 и *Gordoniarubripertincta* L-RP 20 с каждым из растений в отдельности снижение концентрации нефти проходило медленнее примерно на 10%, чем при использовании смеси двух штаммов *Rhodococcus sp.* T-RP 18 и *Gordoniarubripertincta* L-RP 20 с растениями (рисунок 3).

Возможно, в процессе биодеградации нефти смесью микроорганизмов между бактериями возникала кооперация, в результате которой процесс утилизации углеводородов нефти проходил эффективнее. Результаты показывали, что наибольшую эффективность растительно-микробной ассоциации по сравнению с использованием только растений или только отдельных штаммов-деструкторов углеводородов нефти. Растения вносили непосредственный вклад в работу растительно-микробных ассоциаций (от 15 до 20%) за счет своих собственных ферментных систем и механизмов детоксикации поллютантов. Ранее отмечалось, что взаимодействие корней растений с органическими соединениями (в том числе и углеводородами нефти) индуцирует пероксидазную активность, которая может иметь внутриклеточную функцию как часть защитного механизма и/или прямо влиять на деградацию поллютантов в окружающей среде [11].

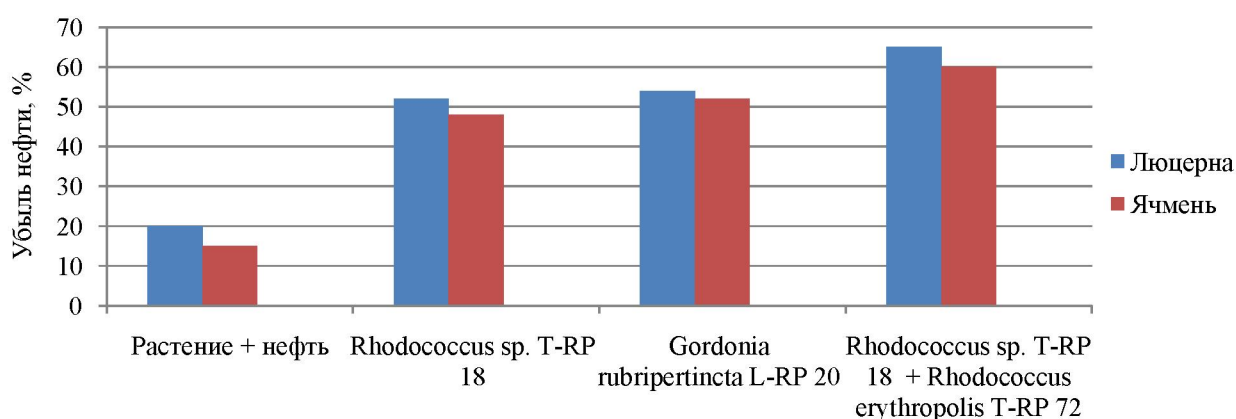


Рисунок 3 – Убыль нефти при интродуцировании растений микроорганизмами – деструкторами

Таким образом, растительно-микробная ассоциация, состоящая из штаммов-деструкторов *Rhodococcus sp. T-RP 18* и *Gordonia rubripertincta L-RP 20* и ассоциированных с ними растениями (люцерна, ячмень) является эффективным инструментом для фиторемедиации нефтезагрязненных почв, так как внутри ассоциации отсутствуют отрицательные взаимодействия, влияющие на скорость и эффективность утилизации нефти, численность микроорганизмов и развитие растений, ассоциированных со штаммами-деструкторами.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Gao Y., Guo S., Wang J., Li D., Wang H., Zeng D. Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil // *Chemosphere*. – 2014. – Vol. 117. – P. 486 – 493.
- [2] Муратова А.Ю., Турковская О.В., Хюбнер Т., Кушк П. Изучение эффективности использования люцерны и тростника для фиторемедиации загрязненного углеводородами грунта // *Прикл. биохим. и микробиол.* – 2003. – Т. 39, № 6. – С. 681-688.
- [3] Trapp S., Karlson U. Aspects of phytoremediation of organic pollutants // *Journal of Soils and Sediments*. – 2001. – Vol. 1. – P. 37-43.
- [4] Radetski C.M., Cotelle S., Ferard J.F. Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate // *Environ. Exp. Bot.* – 2000. – Vol. 44. – P. 221-229.
- [5] Omirbekova A., Mikolasch A., Schumann P., Reinhard A., Sheikhan H., Berzhanova R., Mukasheva T., Schauer F. Enrichment of aliphatic, alicyclic and aromatic acids by oil-degrading bacteria isolated from the rhizosphere of plants growing in oil-contaminated soil from Kazakhstan // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2015. – Vol. 99 (9). – P. 4071-4084.
- [6] Diab E.A., Reham K.A. Badry Biodegradation of PAH Compounds in the Rhizosphere of *Tamarix nilotica*: A Salt tolerant wild plant // *Journal of American Science*. – 2011. – Vol. 7(X). – P. 115 – 124.
- [7] Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – 448 с.
- [8] Bates L.S., Waldren R.P., Teare D. Determination of Free Proline for Water Stress Studies // *Plant and soil*. – 1973. – Vol. 39, N 1. – P. 205-207.
- [9] Иванов В.Б., Плотникова Е.А. Практикум по физиологии растений. – Академия, 2001. – 144 с.
- [10] Kaur N., Gupta A.K. Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants // *Curr. Sci.* – 2005. – Vol. 88. – P. 1771-1780
- [11] Eriyamremu G.E., Asagba S.O., Onyeneke E.C., Aguebor-Ogie B. Bonny light crude oil and its fractions alter radicle galactose dehydrogenase activity of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and maize (*Zea mays*) // *Trends in ApplSci Res.* – 2007. – Vol. 2. – P. 433-438.
- [12] Patra H.K., Sayed S., Sahoo B.N. Toxicological aspects of chromium (VI) induced catalase, peroxidase and nitrate reductase activities in wheat seedlings under different nitrogen nutritional environment // *Polln Res.* – 2002. – N 21(3). – P. 277-287.
- [13] Cunningham S.D., Ow D.W. Promises and prospects of phytoremediation // *Plant Physiol.* – 1996. – Vol. 110. – P. 715-719.
- [14] Tammam A.A. Response of *Vicia faba* plants to the interactive effect of sodium chloride salinity and salicylic acid treatment // *Acta Agronomica Hungarica*. – 2003. – N 51. – P. 239-248.

REFERENCES

- [1] Gao Y., Guo S., Wang J., Li D., Wang H., Zeng D. Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil // *Chemosphere*. 2014. Vol. 117. P. 486-493.
- [2] Muratova A.Ju., Turkovskaja O.V., Hjubner T., Kushk P. Izuchenie jeffektivnosti ispol'zovanija ljucerny i trostnika dlja fitoremediacii zagrijaznennogo uglevodorodami grunta // *Prikl. biohim. i mikrobiol.* 2003. Vol. 39, N 6. P. 681-688.

- [3] Trapp S., Karlson U. Aspects of phytoremediation of organic pollutants // Journal of Soils and Sediments. 2001. Vol. 1. P. 37-43.
- [4] Radetski C.M., Cotelle S., Ferard J.F. Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate // Environ. Exp. Bot. 2000. Vol. 44. P. 221-229.
- [5] Omirbekova A., Mikolasch A., Schumann P., Reinhard A., Sheikhan H., Berzhanova R., Mukasheva T., Schauer F. Enrichment of aliphatic, alicyclic and aromatic acids by oil-degrading bacteria isolated from the rhizosphere of plants growing in oil-contaminated soil from Kazakhstan // Applied microbiology and biotechnology. 2015. Vol. 99 (9). P. 4071-4084.
- [6] Diab E.A., Reham K.A. Biodegradation of PAH Compounds in the Rhizosphere of *Tamarixnilotica*: A Salt tolerant wild plant // Journal of American Science. 2011. Vol. 7(X). P. 115-124.
- [7] Lur'e Ju.Ju. Analiticheskaja himija promyshlennyh stochnyh vod. M.: Himija, 1984. 448 p.
- [8] Bates L.S., Waldrten R.P., Teare I.D. Determination of Free Proline for Water Stress Studies // Plant and soil. 1973. Vol. 39, N 1. P. 205-207.
- [9] Ivanov V.B., Plotnikova E.A. Praktikum po fiziologii rastenij. Akademija, 2001. 144 p.
- [10] Kaur N., Gupta A.K. Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants // Curr. Sci. 2005. Vol. 88. P. 1771-1780.
- [11] Eriyamremu G.E., Asagba S.O., Onyeneke E.C., Aguebor-Ogie B. Bonny light crude oil and its fractions alter radicle galactose dehydrogenase activity of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and maize (*Zea mays*) // Trends in ApplSci Res. 2007. Vol. 2. P. 433-438.
- [12] Patra H.K., Sayed S., Sahoo B.N. Toxicological aspects of chromium (VI) induced catalase, peroxidase and nitrate reductase activities in wheat seedlings under different nitrogen nutritional environment // Polln Res. 2002. N 21(3). P. 277-287.
- [13] Cunningham S.D., Ow D.W. Promises and prospects of phytoremediation // Plant Physiol. 1996. Vol. 110. P. 715-719.
- [14] Tammam A.A. Response of *Vicia faba* plants to the interactive effect of sodium chloride salinity and salicylic acid treatment // Acta Agronomica Hungarica. 2003. N 51. P. 239-248.

**А. А. Өмирбекова, Т. Д. Мұқашева, Р. Ж. Бержанова, Р. К. Сыдықбекова, Л. В. Игнатова,
Н. К. Бектілеуова, Н. Давенова, К. Р. Баймаханова, С. Ибраимова, М. Х. Шығайева**

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

ӨСІМДІКТЕР МЕН ДЕСТРУКТОР-БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ МҰНАЙМЕН ЛАСТАНҒАН МОДЕЛЬДІ ЖҮЙЕЛЕРДЕГІ ҚАРЫМ-ҚАТЫНАСЫ

Аннотация. Өсімдіктер мен белсенді деструктор-штаммдарды инокуляциялау тәсілдерін қолдану өсімдіктің ластандырушыға төзімділігін жоғарылатудың және мұнаймен ластанған топырақты тазалау үдерістерін жылдамдатудың тиімді әдістерінің бірі болып табылады. Өсімдіктер (жоңышқа немесе арпа) мен мұнайдың деструктор-микроорганизмдерінен – *Rhodococcus sp.* T-RP 18 және *Gordonia rubripertincta* L-RP 20 тұратын микробты-өсімдік бірлестіктерінің тиімділігіне модельді зерттеулерде бағалау жүргізілді. Мұнаймен ластанған топырақтағы көмірсутектердің азаюы өсімдік-микробты бірлестіктерді қолдану кезінде 60 % жоғары болды.

Түйін сөздер: микробты-өсімдік бірлестігі, жоңышқа, арпа, деструктор-микроорганизмдер, пролин, пероксидаза, инокуляция.