DOI:10.26104/IVK.2019.45.557

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ КЫРГЫЗСТАНА, № 2, 2020

БИОЛОГИЯ ИЛИМДЕРИ
БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ
BIOLOGICAL SCIENCES

Өмүргазиева Ч.М., Каулбекова А.А., Джамангулова А.К.

КОРГОШУНДУН ЖОГОРКУ КОНЦЕНТРАЦИЯСЫНА ТУРУКТУУ ТОПУРАК БАКТЕРИЯ ШТАММДАРЫН ТАНДОО

Омургазиева Ч.М., Каулбекова А.А., Джамангулова А.К.

СКРИНИНГ ШТАММОВ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ УСТОЙЧИВЫХ К ПОВЫШЕННЫМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ СВИНЦА

Ch.M. Omurgazieva, A.A. Kaulbekova, A.K. Dzhamangulova

SCREENING OF STRAINS OF SOIL BACTERIA RESISTANT TO ELEVATED CONCENTRATIONS OF LEAD

УДК: 579.2

Кыргызстандын техногендик аймактарынын ар кандай типтеги топурактарынан бөлүнүп алынган (Орловка-Боорду, Туюк-Суу, Миң-Куш, Ак-Тюз, Талды-Булак, Кажы-Сай) бактерия штаммдарынын коргошундун (PbSO4) жогорку концентрацияларына туруктуу штаммдары изилденди. Скринингдин жыйынтыгында изилденген топурак бактерияларынын 10 штаммынын ичинен коргошундун (ЧК - чектелген концентрация) (PbSO4) 44 мг/л (1 ЧК); 54 мг/л (5 ЧК); 68 мг/л (10 ЧК) жогорку дозаларына чыдамдуу болгон эффективдүү штаммдар катары төмөнкү 3 штамм тандалып алынды: Ак-Т/хв-6 – Bacillus megatherium, N1-ТВ3 – Streptococcus ssp. Жана Н-5[8] Bacillus megatherium. Металлдын (Pb) жогоруда көрсөтүлгөн концентрацияларына бактерия клеткаларынын өсүү динамикасы жана морфологиялык касиеттерине болгон таасири изилденди. Тандалган резистенттүү штаммдар оор металлдар менен булганган топурак экосистемасынын биоремедиациясы үчүн даярдалуучу биопрепараттардын негизин түзүүгө сунушталат.

Негизги сөздөр: *бактерия штаммдары, топурак үлгүлөрү, коргошундун жогорку концентрациялары, хвостохранилища, техногнендик зона, топурак микрофлорасы.*

Исследованы устойчивые штаммы бактерий к высоким концентрациям свинца (PbSO4) выделенные из различных типов почв техногенных зонах Кыргызстана (Орловка-Боорду, Туюк-Суу, Мин-Куш, Ак-Тюз, Талды-Булак, Каджи-Сай). Получены экспериментальные данные о влиянии различных концентраций ($PbSO_4$) свинца (44 мг/л (1ПДК); 54 мг/л (5 ПДК); 68 мг/л (10 ПДК)) на рост бактериальной клетке. После скрининга отобранные 3 штамма (Ак-Т /хв-6 – B. Bacillus megatherium, N1-ТВ3 – Streptococcus ssp. И Н-5[8] Bacillus megatherium) из 10 штаммов исследуемых бактерий показали устойчивость и эффективность при высокой концентрации свинца. Изучено влияние металла (Pb) в указанных концентрациях на динамику роста и морфологические свойства бактериальных клеток. Отобранные устойчивые штаммы будут рекомендованы к использованию в качестве основы биопрепаратов для биоремедиации почвенных экосистем, загрязненных тяжелыми металлами.

Ключевые слова: *штаммы бактерий, почвенные образцы, высокая концентрация свинца, хвостохранилища, техногенная зона, почвенная микрофлора.*

Resistant bacterial strains to high concentrations of lead (PbSO4) isolated from various types of soils in technogenic zones of Kyrgyzstan (Orlovka-Bordu, Tuyuk-Suu, Min-Kush, Ak-Tyuz, Taldy-Bulak, Kaji-Sai) were studied. Experimental data were obtained on the effect of different concentrations of (PbSO4) lead (44 mg / L (1 MPC); 54 mg / L (5 MPC); 68 mg / L (10 MPC)) on the growth of a bacterial cell. After screening, selected 3 strains (Ak-T / xv-6 - B. Bacillus megatherium, N1-TB3 - Streptococcus ssp. And H-58 Bacillus megatherium) from 10 strains of the studied bacteria showed resistance and efficacy at a high concentration of lead. The effect of metal (Pb) in the indicated concentrations on the growth dynamics and morphological properties of bacterial cells was studied. The selected resistant

DOI:10.26104/IVK.2019.45.557

strains will be recommended for use as a basis for biopreparations for bioremediation of soil ecosystems contaminated with heavy metals.

Key words: *bacterial strains, soil samples, high concentration of lead, tailings, technogenic zone, soil microflora.*

Биосферанын коркунучтуу булгандыруучуларынын бири болуп оор металлдар эсептелинет. Жогорку концентрацияларда бардык оор металлдар комплекс түзүүгө жөндөмдүүлүгүнүн эсебинен, микробдор менен башка организмдерге уулуу болуп саналат [1]. Антропогендик таасир астында айлана-чөйрөгө оор металлдардын топтолушу, кандайдыр бир деңгээлде тирүү организмдерге, анын ичинен микробиотага да таасирин тийгизет [5]. Оор металлдар микроорганизмдердин жашоо процессинде кош ролду ойношот. Алардын айрымдары “нанобөлүкчө” аз санда гана абдан маанилүү болуп саналат. Ал эми кээ бирлеринин Cd, Pb, Bi, Hg биологиялык ролу белгисиз [3]. Оор металлдар клетканын иштөө функциясына таасир келтирип, натыйжада клетканын бөлүнүү, өсүү процесстерин бузат. Микробдук клетканын кандайдыр бир чөйрөлөргө туруктуулугу гендер аркылуу берилип, микроорганизмдер ошол чөйрөгө толеранттулугун көрсөтөт [2].

Изилдөөнүн максаты: Коргошундун жогорку концентрациясына туруктуу бактерия штаммдарын изилдөө жана скрининг жүргүзүү

Изилдөөнүн обьектиси жана методдору: Изилдөөнүн материалы катары Кыргызстандын радиоактивдик уран калдыктары (хвостохранилища) сакталган аймактардын (Орловка-Боорду, Туюк-Суу, Миң-Куш, Ак-Тюз, Талды-Булак, Кажы-Сай) ар кандай типтеги топурак үлгүлөрүнөн бөлүнүп алынган бактериялардын таза культуралары колдонулду (табл. 1).

1-таблица

Бактериялардын бөлүнүп алынган жерлеринин маалыматтары

№	Бактерия штаммдары	Экосистема		Металлдардын кармалышы, (мг/кг топуракта)
		Регион	Топурак тиби	
1.	N_3/ORL_1 *B. megatherium*	**Боорду** уран калдыктар сактагычынан 3-5 км алыстыкта (Орловка шаарчасы)	ачык-күрөң	Pb - 300; Zn -30; Ni – 50; Sr-300
2.	mk I *Arthrobacter spp.*	**Миң-Куш** уран калдыктары сакталган аймактан 500м, (Миң-Куш шаарчасы)	Тоо-түздүктүү ачык-күрөң	Pb – 30; Zn – 70 Ba - 500; Sr – 300
3.	Ак- Т кв-6 *B. megatherium*	**№1 «Чыныке»** калдыктар сактагычы (Ак-Түз тоо-кен комбинаты, Кичикемин району)	ачык-коңур, 0-25 см	Pb - 680; Zn - 350
4.	N_2-ORL_2 *Bacillus spp*	**Орловка** шаарчасы, түндүк-батыш тарабынан 1,5 км	Боз	Pb – 12; Zn – 30; Ba – 700; Sr – 500
5.	N_1–TB_3 *Streptococcus spp.*	**Талды-Булак** радиоактивдик уран калдыктар сактагычынан **200 м** (Мин-Куш).	Ачык күрөң	Pb – 700; Zn – 30; Zr – 700; Ni - 70
6.	N_4/ORL_1 *Bacillus cereus*	**Орловка** шаарчасы, калдык сактагычтан 5-7 км алыстыкта	Ачык-күрөң	Pb – 40; Zn – 50 Zr – 500; Mn – 90
7.	N1-TB_2 *Bacillus subtilis*	**Талды-Булак** радиоактивдик уран калдыктар сактагычы 200 м (Мин-Куш).	Ачык-күрөң	Pb – 700; Zn – 30; Zr – 700; Ni - 70
8.	B.m.6/6 *B. megatherium*	**Ак-Түз** тоо-кен комбинаты жайгашкан аймак	Тоо кара топурак	Pb – 680; Zn – 350
9.	H-5^8 *B. megatherium*	**Ак-Түз – “Чыныке”** калдыктар сактагычы	Тоо-кара топурак	Pb-680; Zn-350
10.	N_3/KS-3/2 *Bacillus cereus*	**Кажы-Сай** уран калдыктар сактагыч жайгашкан аймактан 200 м	Ачык күрөң	Pb – 700; Zn – 30; Zr – 700; Ni - 70

DOI:10.26104/IVK.2019.45.557

Бактерия штаммдары эт-пептон агарында (ЭПА) жаныртылып өстүрүлдү [4].

Металлдын концентрацияларын даярдоо. Коргошундун күкүртүү кычкылынын ($PbSO_4$) топурактагы чектелген концентрациясынан (ЧК) бир нече эсе жогору дозалары: *44 мг/л (1 ЧК); 54 мг/л (5 ЧК); 68/л (10 ЧК)* даярдалды:

Жалпы эксперментке 1000 мл ЭПА азыктык чөйрөсү даярдалып 250 мл ден Эрленмейер колбаларына бөлүштүрүлдү. Азыктык чөйрөгө (ЭПА) коргошундун жогоруда көрсөтүлгөн концентрацияларын кошуп, Петри чөйчөкчөлөрүнө куюштурулду. Андан сон, асептикалык эрежелерди сактоо менен изилденүүчү бактерия штаммдарынын 24 сааттык инокуляттары Петри чөйчөкчөсүндөгү агар пластинасына киргизилип, термостатка (28ºС) салынды.

Металлдын (Pb) жогоруда көрсөтүлгөн дозаларынын бактерия клеткаларынын өсүү динамикасына жана морфологиялык касиеттерине болгон таасирин изилдөө максатта штаммдардын өсүү деңгээлдери 18, 24, 48, 96 саттар аралыгында текшерилди: ар бир экспозициялар аралыгында контролдук жана коргошундун ар бир дозаларында өстүрүлгөн культуралардан препараттар даярдалып, иммерсиондук системада микроскоптун алдында МБИ-3 клеткалары каралып, ар бир өзгөрүүлөрү тыкаттык менен белгиленди.

Изилдөөнүн жыйынтыгын талкуулоо: Микроорганизмдердин ичинен топурак бактериялары бат көбөйүү жөндөмдүүлүгүнө байланыштуу, булгануунун – уулуу элементтердин таасирин изилдөө үчүн эң сонун модель катары көп белгилешүүдө. Ошентип, техногендик топурактардан бөлүнгөн **бактериялардын** 10 штаммын коргошундун ($PbSO_4$) жогорку концентрациялары алдын ала кошулуп даярдалган азыктык чөйрөлөрүндө өстүрүүдө (изилдөөнүн узактыгы 18-96 саат) культуралардын морфологиялык жана культуралдык өзгөрүүлөрү же аларга болгон оор металлдын таасирине туруктуулук касиеттери изилденип, төмөндө жыйынтыктары берилди (табл. 2):

mkI штаммы *Arthrobacter spp.*– контролдук вариантта бактериянын өсүүсү абдан жакшы, ал эми коргошундун 1ЧК (44мг/л) штаммдын өсүүсү агардын бетинде жука гана издери байкалат, изилдөөнүн кийинки 24-96 сааттар аралыктарында бактерия клеткасынын өсүүсү токтогон, ал эми 5 ЧК (54мг/л) жана 10 ЧК (68мг/л) штаммдын өсүүсү белгиленген жок, демек, mkI штаммы $PbSO_4$ жогорку концентрацияларына толеранттуулугу начар экенин көрсөтөт.

N1-TB$_3$ штаммы *Streptococcus spp.* Контролдук вариантта 18-96 сааттар аралыгында өсүү абдан активдүү, 1ЧК (44 мг/л) 24-96-саттар аралыктарында штаммдын өсүүсү белгиленди, ал эми коргошундун жогорку 54 мг/л жана 68 мг/л концентрацияларында өсүү жок. Ошентип, N1-TB3 штаммы коргошундун 1ЧК (44мг/л) салыштырмалуу чыдамдуулук касиети белгиленди.

Ак-Т/хв-6 штаммы *Bacillus megatherium* коргошундун 44мг/л концентрациясында изилдөөнүн 18 саат аралыгында өсүү - жок, ал эми изилдөөнүн кийинки 24 саат аралыктарында клеткалардын изи байкалып, 42 сааттан кийин штаммдын өсүүсү белгиленген, ал эми контролдук вариантта 18-96 сааттар аралыгында өсүү абдан жакшы. Ал эми коргошундун жогорку концентрациясы - 5 ЧК (54мг\л) азыктык чөйрөдө бактерия штаммынын 42 сааттан кийин гана бир аз өсүү изи байкалып, металлдын 68мг/л концентрациясында өсүү жок. Ошентип, АК-Т/хв-6 штаммы изилдөөнүн жыйынтыгында коргошундун 1ЧК (44мг/л) концентрациясына салыштырмалуу чыдамдуулук касиетин көрсөтө алды.

Н-5-^{8} штаммы *Bacillus megatherium* – контролдук варинтта 18 - 96 сааттар аралыктарында өсүүсү – активдүү, ал эми коргошундун 1ЧК (44 мг\л) өсүү - жок, 5 ЧК (54мг/л) жана 10ЧК (68 мг/л) культуранын өсүүсү 42 сааттан кийин изи байкалып, 72-96 сааттар аралыктарындагы изилдөөлөрдө клеткалардын өсүүсүнүн токтогону белгиленген. **N3 KS-3/2**-*Bacillus cereus,* **N3/ORL 1** - *Bacillus megatherium,* **N2-ORL 2** -*Bacillus spp.,* **B.m.6/6** - *Bacillus megatherium,* **N1TB 2** - *Bacillus subtilis,* **N4ORL 1** - *Bacillus cereus* штаммдары контролдук вариантта изилдөөнүн 18-96 сааттар аралыктарында өсүү денгээли - активдүү, ал эми коргошундун $PbSO_4$ концентрациясында өсүүлөрү белги-ленген жок (табл. 2).

DOI:10.26104/IVK.2019.45.557

2-таблица

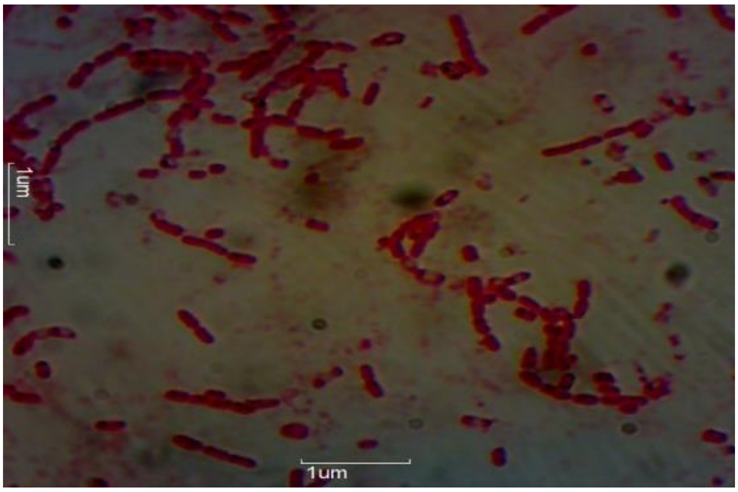
№	Бактерия штаммдары	Өсүү көрсөткүчтөрү 18, 24, 48, 96 сааттар аралыгында PbSO$_4$ дозалары (мг/л)			
		44 мг/л (1 ЧК)	**54 мг/л (5 ЧК)**	**68мг/л (10 ЧК)**	**Контроль (без металла)**
1.	mkI *Arthrobacter spp.*	+	-	-	+++
2.	N$_4$ORL$_1$ *Bacillus cereus*	-	-	-	+++
3.	**N$_1$-TB$_3$** *Streptococcus spp.*	++	-	-	+++
4.	**Ак-Т/хв-6***Bacillus megatherium*	++	++	-	+++
5.	Н-5-^{8} *Bacillus megatherium*	-	+	+	+++
6.	N$_3$ KS-3/2 *Bacillus cereus*	-	-	-	+++
7.	N$_3$/ORL$_1$ *Bacillus megatherium*	-	-	-	+++
8.	N$_2$-ORL$_2$ *Bacillus spp*	-	-	-	+++
9.	B.m 6/6 *Bacillus megatherium*	-	-	-	+++
10.	N$_1$TB$_2$ *Bacillus subtilis*	-	-	-	+++

Белгилөө: (+) - өсүү изи бар; "-" - өсүү жок; ++ - өсүү жакшы: +++ - өсүүсү эң жакшы.

Ошентип, скринингдин жыйынтыгында изилденген бактериялардын 10 штаммынын ичинен коргошундун жогорку дозаларына чыдамдуу болгон **<u>күчтүү, эффективдүү штаммдар</u>** катары төмөнкү 3 штамм тандалып алынды: штамм Ак-Т/хв-6 – *Bacillus megatherium*, штамм N$_1$-TB$_3$ – *Streptococcus ssp.* жана штамм Н-5-^{8} *Bacillus megatherium.* Бул штаммдар коргошундун жогорку концентрациялары кошулган азыктык чөйрөлөрдө өсүүсүн уланта алышты. Бирок, бактерия клеткаларынын өсүү активдүүлүктөрү начарлаган, калган штаммдар өсүүнүн биринчи сааттарында гана өсүү издери байкалып, изилдөөнүн кийинки сааттарында клеткалар өлүмгө дуушар болушкан. Морфологиялык изилдөөлөр көрсөткөндөй, бактериялардын штаммынын клеткалары лизиске учурап, таякча формасындагы клеткалар ичкерип, ийрейип, б.а. клетка скринингден кийин формасы абдан өзгөргөн (1-сүрөт, А), ал эми *B.m 6/6 Bacillus megatherium* штаммынын клеткалары – контролдук вариантка (металл кошулбаган азык чөйрө) салыштырмалуу таякчалар жоонойгон (1-сүрөт, Б), ийри-буйру (түз эмес) формадагы клеткаларды көрүүгө болот.

А

DOI:10.26104/IVK.2019.45.557



Б

1-сүрөт. Коргошундун жогорку концентрацияларында клеткалары өзгөрүүгө дуушар болгон бактерия штаммдарынын микрофотографиясы: (А) - N3/ORL1 Bacillus Megatherium; (Б) - B.m 6/6 Bacillus Megatherium.

Тандалган эффективдүү штаммдар оор металлдар менен булганган топурак экосистемасынын биоремедиациясы үчүн даярдалуучу биопрепараттардын негизин түзөт. Ошентип, скринингдин жыйынтыгында, изилденген Кыргызстандын техногендик топурактарынан бөлүнүп алынган бактерия штаммдарынын ичинен 3 штамм (Ак-Т/хв-6 – *Bacillus megatherium,* N_1-ТВ-3 – *Streptococcus ssp.* жана Н-5-8 *Bacillus megatherium*) коргошундун (Pb) жогорку концентрацияларына чыдамдуулук касиеттерин көрсөтүп, өздөрүнүн тиричилик кылуу жөндөмдүүлүгүн жоготпостон метаболизмин уланта алаары белгиленди.

Адабияттар:

1. Gadd G.M. Metal tolerance. // Microbiology of extreme environments /Ed. by C.Edwards.-Philadelphia: Open University Press, 1990. - P. 178-210.
2. Багаева Т.В., Ионова Н.Э., Надеева Г.В. Микробиологическая ремедиация природных систем от тяжелых металлов: Учебно-метод. пособие. - Казань, 2013. - 56 с.
3. Бузолёва Л.С., Кривошеева А.М. Влияние тяжёлых металлов на размножение патогенных бактерий. // Журнал «Успехи современного естествознания». - 2013. - №7 - С. 3-33.
4. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта и др. - М.: Мир, 1983. - 536 с.
5. Фокина А.И., Ашихмина Т.Я., Домрачева Л.И., Горностаева Е.А., Огородникова С.Ю. Тяжёлые металлы как фактор изменения метаболизма у микроорганизмов. // Журнал «Теоретическая и прикладная экология». - 2015. - №2. - С. 5-15.