УДК: 57. 579.66

ӨМҮРГАЗИЕВА Ч. М., УРПОЕВА Р.Д.
Ж.Баласагын атындагы КУУ
OMURGAZIEVA CH.M., URPOEVA R.D.,
J.Balasagun KNU

КОРГОШУНГА ТУРУКТУУ ТОПУРАК МИКРОМИЦЕТТЕРИН ИЗИЛДӨӨ ЖАНА СКРИНИНГ

Скрининг и исследование почвенных микромицетов, устойчивых к свинцу.

Screening and study of lead resistant soil micromycetes.

Аннотация: *Кыргызстандын радиоактивдик уран калдыктары көмүлгөн аймактардын ар кандай типтеги топурактарынан бөлүнүп алынган микромицет штаммдарынын коргошундун (PbSO4) жогорку концентрацияларына туруктуулук касиеттерин аныктоо максатта скрининг жүргүзүлдү. Эксперименттин жыйынтыгында, изилденген микроскоптук козу карындардын ичинен 6 штамм коргошундун 2мг/л; 5мг/л; 6мг/л концентрацияларына, туруктуу штаммдар катары тандалып алынды.*

Аннотация: *Проведен скрининг штаммов микромицетов выделенных из различных типов почв на территориях радиоактивных урановых хвостохранилищ Кыргызстана на устойчивость к высоким концентрациям свинца (PbSO4). В результате эксперимента было обнаружено, что из изученных микроскопических грибов 6 штаммов были отобраны в качестве устойчивых штаммов к высокой концентрации свинца (2 мг/л; 5 мг/л; 6 мг/л).*

Abstract: *Micromycetes strains isolated from various soil types in the territories of the radioactive uranium tailings of Kyrgyzstan were screened for resistance to high concentrations of lead (PbSO4). As a result of the experiment, it was found that out of the studied microscopic fungi, 6 strains were selected as resistant strains to a high concentration of lead (2 mg/l; 5 mg/l; 6 mg/l).*

Урунттуу сөздөр: *топурак микромицеттери; штаммдар; коргошундун жогорку концентрациялары.*

Ключевые слова: *почвенные микромицеты; штаммы; высокие концентрации свинца*

Key words: *soil micromycetes; strains; high lead concentrations*

Ар кандай уулу заттар менен булганган топурактарды реабилитациялоо (калыбына келтирүү) стратегияларын иштеп чыгуу маселелери заманбап экологиялык биотехнологиянын негизги милдеттеринин бири болуп калды. Мындай стратегияларды иштеп чыгуулар топуракта өтүүчү биологиялык, химиялык жана физикалык-химиялык процесстерди терен билүүгө негизделиши керек [1; 7].

Оор металлдардын ичинен коргошун (Pb) кооптуулугу боюнча биринчи класстагы химиялык булгандыруучу заттардын катарына кирет. Коргошун техногендик таштандыларда өтө чон өлчөмдө кармалат. Ал түз ингибирлөө же активация жолдору менен көптөгөн физиологиялык жана метоболиттик процесстерди бузууга жөндөмдүү, ошондой эле кыйыр жол менен регулятордук механизмдерге аминокислоталар жана башка биомолекулалар менен бекем комплекстерди пайда кылып, металлдарды металлкармаган ферменттерге алмаштыруу менен таасир этет [6].

Азыркы күндө, айлана чөйрөнүн ар кандай ксенобиотиктер, анын ичинде оор металлдар, нефтепродуктылар менен булгануусунан тазалоо ыкмаларынын ичинен

биологиялык же биотехнологиялык методдорду колдонуу, тактап айтсак, эффективдүү микроорганизмдердин штаммдарын колдонуу өзгөчө жакшы натыйжалуу экендигин белгилешүүдө [14; 4; 17].

Микроорганизмдердин оор металлдарды уусуздандыруусу аларды байлоо, хелатташтыруу, чөктүрүү жана валенттүүлүктөрүн өзгөртүү, диметилдештирүү же металлорганикалык кошулмаларды пайда кылуусу менен уулу эмес формага трансформациялоосунун негизинде жүрөт [5; 11; 12]

Ошол себептүү, металлдар менен микроорганизмдердин клеткаларынын бири-бирине таасир этүү маселелери практикалык жана теориялык кызыгууну жаратат. Теориялык жактан алганда, металлдардын жогорку концентрацияларынын микробдук клеткага тийгизген таасирлери жана алардын микроорганизмдер тарабынан энергиянын булагы катары же электрондордун акцепторлору катары колдонуусу кызыгууну туудурса [10], ал эми практикалык мааниси - микроорганизмдердин сырткы чөйрөдөн оор металлдарды топтоо жөндөмдүүлүгүн изилдөө эффективдүү штаммдарды булганган чөйрөнү биоремедиациялоого (биотазалоо) колдонууга мүмкүндүк берет.

Металлдар майда дисперстик бөлүкчөлөр түрүндө жана эриген абалында өнөр жай комбинаттардын тазаланбаган агын сууларында кармалат. Алардын көпчүлүгү уулуу жана узак мезгилдерге чейин стабилдүү. Акыркы жылдары биотехнологияда микроорганизмдерди өнөр жайдан чыккан кир агын суулар жана топурактардагы оор металлдардан арылуу же концентирлөө үчүн инструмент катары колдонууга багытталган изилдөөлөр башталды. Бул заманбап технология кээ бир микроорганизмдердин клеткаларынын оор металлдарды көп өлчөмдө топтоо (аккумуляция) жөндөмдүүлүктөрүнө негизделген [15; 10; 2]. Металлдарды биоаккумуляциялоонун эффективдүү методдорун иштеп чыгуу үчүн ушул процесстин механизмдери изилденүүдө, ошондой эле микроорганизмдердин туруктуу жана активдүү штаммдарын издөө жана бөлүп алуу иштери жүргүзүлүүдө.

Изилдөөнүн максаты. Кыргызстандын техногендик зоналарынын ар кандай типтеги топурактарынан бөлүнүп талынган микроскоптук козу карындардын коргошундун жогорку концентрацияларына туруктуу штаммдарын тандоо.

Изилдөөнүн материалдары жана методдору. Изилдөөдо микроскоптук козу карындардын 10 штаммы колдонулду. Бул штаммдар Кыргызстандын радиоактивдик уран калдыктары сакталган (хвостохранилище) аймактардын (Мин-Куш: Туюк-Суу; Талды-Булак; Кажы-Сай;) жана Ак-Түс тоо-кен комбинатынын №1 «Чыныке» калдыктар сактагычы (Кичи-Кемин району) жайгашкан территориялардын ар кандай типтеги топурак үлгүлөрүнөн бөлүнгөн микромицеттердин таза культуралары болуп эсептелет (табл.1.).

Таблица 1.

Кыргызстандын техногендик аймактарынан бөлүнүп алынган микроскоптук козу карындардын топурак биотоптору

		Экосистема	
	Штаммдар	Регион	Топурак тиби
	Penicillium notatum N_3-TS_2	**Туюк-Суу** радиоактивдик уран калдыктары сакталган аймак (Мин-Куш шаарчасынан 7 км алыстыкта).	Ачык күрөң
	Paecilomyces spp. N_4-Mk_2	**Мин-Куш** уран калдыктар сакталган аймак, (200м) Жумгал району.	Тоо түздүктүү, ачык-күрөң, 0-25см.
	Penicillium spp. N_1/Mk-2	**Мин-Куш** уран калдыктар сакталган аймак, (800м).	Тоо түздүктүү, ачык-күрөң, 0-25см.
	Penicillium purpurogenum 24-01(2)	**Ак-Түз** тоо-кен комбинаты, №1 «Чыныке» калдыктар сактагычы (Кичи-Кемин)	Тоо-кара типтеги топурак, 0-25см.
	Penicillium purpurogenum N_5-K_1	**Мин-Куш** өнөр жай комбинаты, (15 км)	Күрөң
	Penicillium spp. N_2Kg2	**Кажы-Сай** өнөр жай комбинаты, (200м алыстыкта)	Ачык күрөң
	Penicillium spp. N_1-TB_2	**Талды-Булак** радиоактивдик уран калдыктар сактагычына 200м алыстыкта	Ачык күрөң
	Penicillium spp. N_5-TS_3	**Туюк-Суу** радиоактивдик уран калдыктар сакталган аймак (пос. Мин-Куш).	Ачык күрөң
	Penicillium notatum $N_5$$Кж_3$	**Кажы-Сай** өнөр жай комбинатынын радиоактивдик уран калдыктар сактагычы	Ачык күрөң
0	*Penicillium spp.*N_2Кж	**Кажы-Сай** калдыктар сактагычы, (3км).	Ачык күрөң топурак, 0-15 см.

Изилдөөдө колдонулган топурак микромицеттерин идентификациялоо культуралдык-морфологиялык жана биохимиялык касиеттеринин негизинде [7; 9; 16] Аныктагычтарынын жардамы менен жүргүзүлдү.

Металлдын конценрацияларын даярдоо. Даяр азыктык чөйрөгө (Сабуро) стерилдик шартта коргошундун сульфатынын ($PbSO_4$) сууда эриген туздарынын топурактагы чектелген нормасынан (ЧК - ПДК) бир нече эсе жогорку

концентрациялары киргизилди: 2мг/л - ЧК 0.25; 5мг/ л ЧК 0.63; 6мг/л - ЧК 0.75. Сабуро азыктык чөйрөсүнүн курамы төмөндөгүдөй (1000 мл/г. дисст.суу): микологиялык пептон 10г, глюкоза 40г, агар - 15г; (pH=5,6).

Асептикалык эрежелерди сактоо менен микроскоптук козу карындардын штаммдары Петри чөйчөкчөсүндөгү Сабуро азыктык чөйрөсүнө киргизилди. Өстүрүү термостатта 28ºС температурада жүргүзүлдү. Бардык изилдөөлөр 3-4 жолу кайталоо менен өттү.

Металлдын ($PbSO_4$) жогорку концентрацияларынын микроскоптук козу карындардын морфологиялык касиеттерине болгон таасирин изилдөө үчүн штаммдардын радиалдык өсүү деңгээлдери (48, 96, 144 жана 336 сааттар аралыгында) текшерилип, ар бир өзгөрүүлөрү белгиленди.

Контролдук культуралар (металл кошулбаган азыктык чөйрөдө өсүп жаткан инокулят) жана $PbSO_4$ дозаларында өстүрүлүп жаткан культуралардан 48 – 336 сааттар аралыгында препараттар даярдалып, микроскоптук изилдөөлөр жана алардын микрофотографиялары тартылып алынды (микроскоп МБИ-3).

Микроскоптук козу карындардын культураларынын радиалдык өсүү ылдамдыгынын денгээлдери аныкталды. Радиалдык өсүү ылдамдыгы төмөнкү формула менен аныкталды: $Kr=(r-r_o)/ (t-to)$. K - өсүүнүн радиалдык ылдамдыгы; r_o - баштапкы t_o убактагы колониянын радиусу; r - t убактагы колониянын радиусу [8].

Изилдөөнүн жыйынтыгы

Изилдөөлөр көрсөткөндөй, микроскоптук козу карындардын 10 штаммы коргошундун чектелген концентрациясынан бир нече эсе жогорулатып кошулган азыктык чөйрөлөрдө 48; 96; 144; 336 сааттар аралыгында өсүүсүн уланта алышты. Алардын морфологиялык, культуралдык жана радиалдык өсүү деңгээлдери изилденип, коргошундун жогорку концентрацияларына туруктуулук касиеттери аныкталды (Диаграммалар 1, 2, 3, 4, 5, 6).

Төмөндө скринингдин жыйынтыктары берилди:

$1N_3$-TS_2 *Penicillium notatum* штаммы коргошундун 1, 2, 3-дозаларында 48-саатта өсүүсү – активдүү, ал эми 96 сааттан баштап культуралдык өзгөрүүлөр жүргөн. Аба мицелийи – күңүрт-жашкылт, бетинде ак бубактары бар, субстраттык мицелийи (СМ) - саргыч, агарга ачык-саргыч пигмент бөлүп чыгарган. Консистенциясы – баркыт сымал.

Коргошундун 5мг/л концентрациясында 48-96 сааттарда өсүүсү жогору болгон, ал эми 6мг/л концентрациясында штаммдын өсүүсү салыштырмалуу төмөн, ал эми 144 саатта радиалдык өсүү көрсөткүчү жогорку чекке жеткен (Диаг.1.).

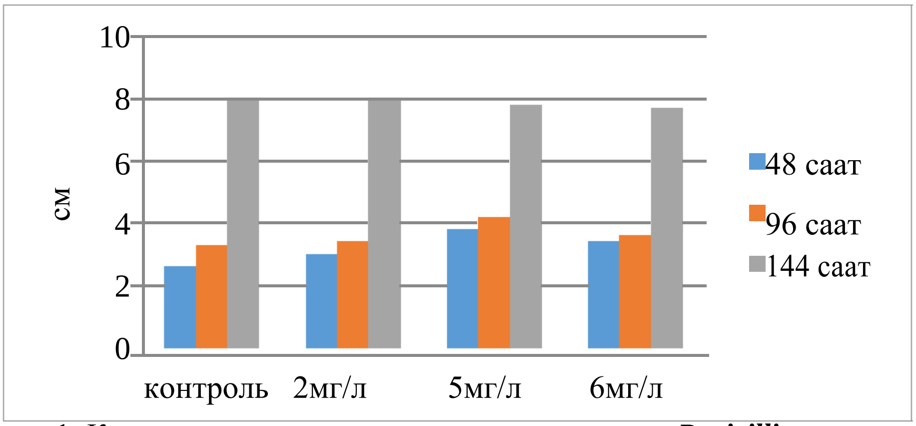

Диаграмма 1. Коргошундун жогорку концентрацияларында ***Penicillium notatum*** N_3-**TS_2** штаммынын радиалдык өсүү ылдамдыгы (см менен).

Penicillium purpurogenum **24-01(2) штаммы өсүүнүн** 48-саатында контролдо, 3 дозада тен жакшы байкалган (диагр2.). Контролго салыштырмалуу 1-, 2-, 3-дозаларда аба мицелийи өзгөрүп, субстратка пигмент бөлүп чыгаруу менен коштолгон. Ал эми изилдөөнүн 96-сааттар аралыгында козу карындын радиалдык өсүүсү басаңдап, бирок 144-саатта өсүү көрсөткүчү бара-бара активдешкени белгиленген, муну менен аталган штаммдын металлдын жогорку концентрацияларына көнүгүү активдүүлүгүн түшүндүрүүгө болот (Диаг.2.).

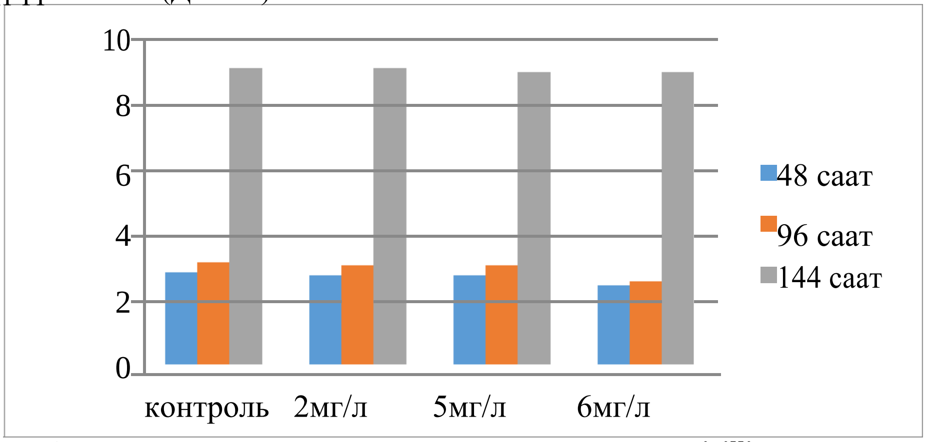

Диаграмма 2. Коргошундун жогорку концентрацияларында ***Penicillium purpurogenum*** **24-01(2)** штаммынын радиалдык өсүү ылдамдыгынын көрсөткүчтөрү (см менен).

***Penicillium spp*. N_1-TB_2 штаммы** 48 саатта өсүүсү белгиленип, ал эми изилдөөнүн 96, 144, 336-саттар аралыгында аба мицелийи жана СМ өзгөргөн.

Коргошундун 2мг/л концентрациясында козу карындын радиалдык өсүүсүнүн көрсөткүчү 48-96 саатта контролго салыштырмалуу жогору, ал эми 5-6мг/л концентрацияларында өсүү басаңдаган (Диаг.3.).

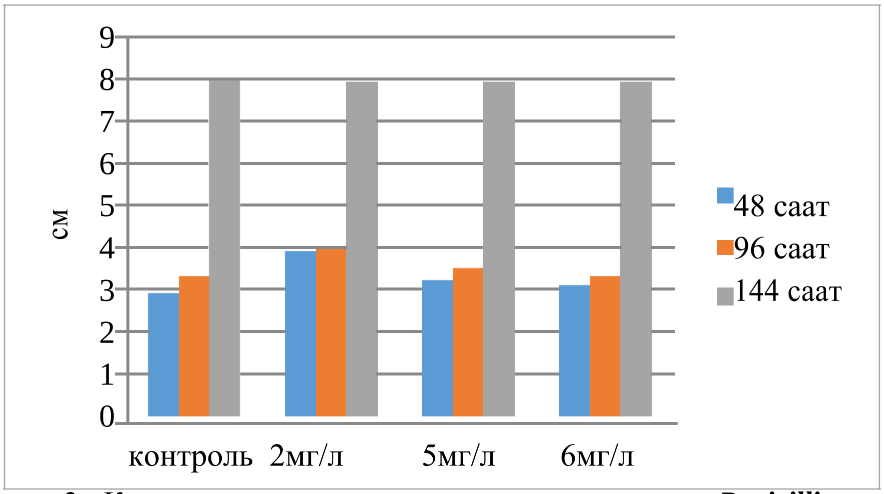

Диаграмма 3. Коргошундун жогорку концентрацияларында ***Penicillium spp*** **N$_1$-TB$_2$** штаммынын радиалдык өсүү ылдамдыгы

Penicillium spp. N5-TS3 штаммынын 48 саатта жана 1-дозада (2мг/ л) өсүүсү жакшы, ал эми 2-дозада (5мг/л) жана 3-дозада (6мг/л) өсүүсү салыштырмалуу начар; 96-144 сааттар аралыгында аба, субстраттык мицелийлери, консистенциясы дагы өзгөргөн.

Радиалдык өсүүдө 48-96 саатта контролго салыштырмалуу коргошундун 2мг/л; 5мг/л концентрацияларында өсүү төмөндөгөн; 6мг/л концентрацияда өсүү активдешип, ал эми 144 саатта өсүү жогорку көрсөткүчтү берген (Диаг.4).

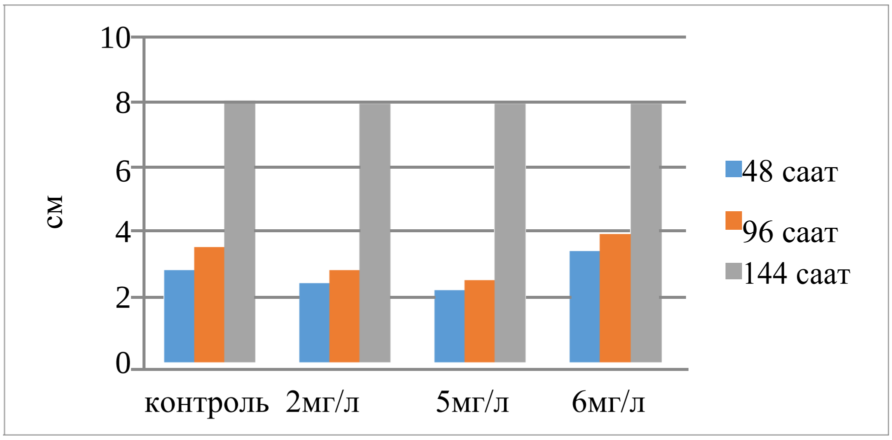

Диаграмма 4. Коргошундун жогорку концентрацияларында ***Penicillium spp*** **N$_5$-TS$_3$** штаммынын радиалдык өсүү ылдамдыгынын көрсөткүчтөрү (см менен).

6. **N$_5$Кж$_3$ *Penicillium notatum* штаммы** 48 саатта өтө активдүү өсүүсүн көрсөткөн, контролдо да, коргошундун концентрацияларында да чөйчөкчөнүн бүт бетин каптап өскөн. Эң күчтүү культуралардын катарын толуктайт. Башка штаммдардан айырмаланып N$_5$Кж3 штаммынын 48-144 саат аралыктарында радиалдык өсүү ылдамдыгы жогорку көрсөткүчтү берген. Муну менен аталган штаммдын коргошундун жогорку концентрацияларына абдан туруктуулук касиетин айтууга болот. (Диаг.5.).

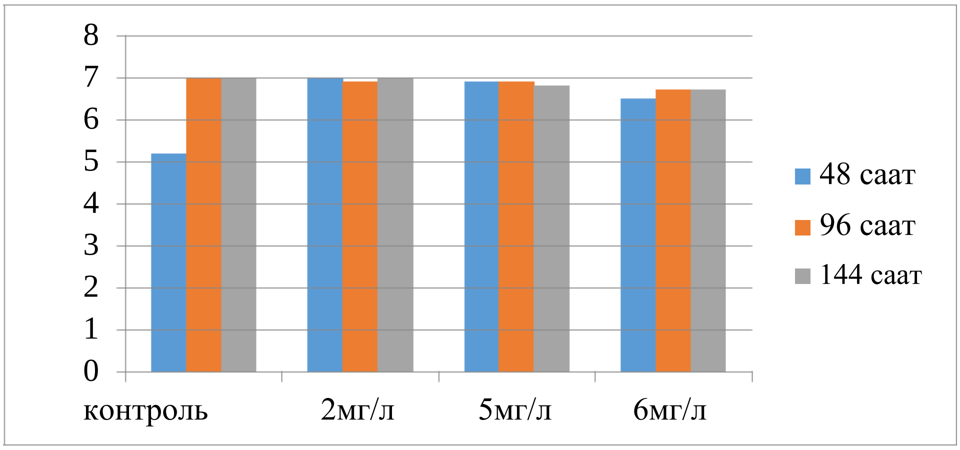

Диаграмма 5. Коргошундун жогорку концентрацияларында ***Penicillium notatum*** **N5Кж3** штаммынын радиалдык өсүү ылдамдыгы (см менен).

N2Кж *Penicillium spp.* штаммы 48- жана 96-саттардагы радиалдык өсүүсү, контролго караганда коргошундун концентрациясында активдүү (Диаг.6.), бирок изилдөөнүн 96-144 саттарында козу карындын культуралдык белгилеринин аба мицелийи жана консистенциясынын өзгөрүүсү белгиленген.

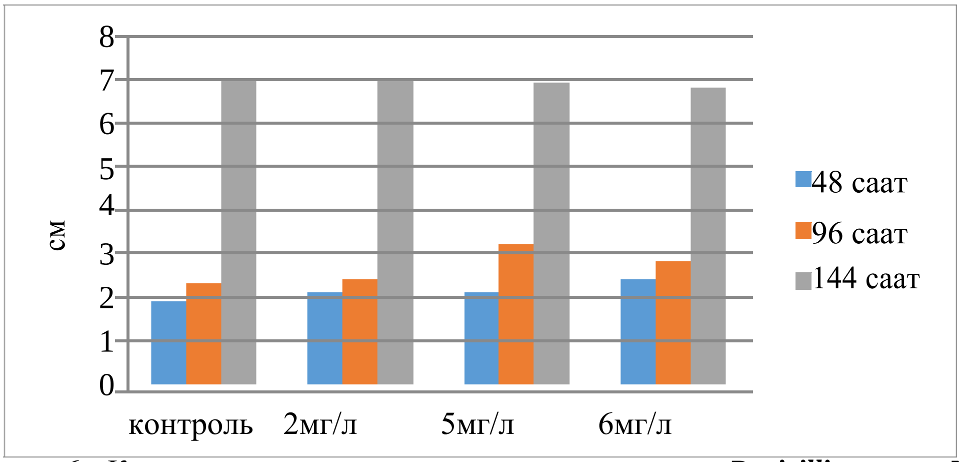

Диаграмма 6. Коргошундун жогорку концентрацияларында ***Penicillium spp*** **N2Кж** штаммынын радиалдык өсүү ылдамдыгынын көрсөткүчтөрү.

Ошентип, изилдөөнүн жыйынтыгында коргошундун ($PbSO_4$ 2мг/л; 5мг/л; 6мг/л) жогорку концентрацияларына туруктуу штаммдар катары төмөнкү микроскоптук козу карындар тандалды: 1) **24-01(2) *Penicillium purpurogenum;*** **2) N3-TS2 *Penicillium notatum*; 3) N5К ж3 *Penicillium notatum*; 4) N5-TS3 *Penicillium spp.*;** **5) N1-TB2 *Penicillium spp*.**; **6) N2Кж *Penicillium spp.*** (Сүр. 1.).

(1) (2) (3) (4) (5)

Сүрөт 1. Скринингдин жыйынтыгында тандалган **<u>туруктуу штаммдар</u>**.

Бул тандалган топурак микромицеттеринин эффективдүү штаммдары айлана-чөйрөнүн оор металлдар менен булгануу деңгээлин төмөндөтүү - биоремедиациялоо максатта колдонуу үчүн биопрепараттын негизин түзөт.

Пайдаланылган адабияттар:

1. Авакян З.А. Токсичность тяжелых металлов для микроорганизмов //Микробиология. Т.2. - М.,1978.- С.5-45.
2. Вельков В.В. Биоремедиация: принципы, проблемы, подходы //Биотехнология. - 1995. - №3-4. - С.20-27.
3. Глазовская М. А. Способность окружающей среды к самоочищению //Природа. 1979. № 3. С. 3-20
4. Градова Н.Б., Горнова И.Б., Эддауди Р. Использование бактерий рода Azotobacter при биоремедиации нефтезагрязненных почв //Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39. - №3. - С.318-321.
5. Жизнь микробов в экстремальных условиях /Под ред. Д. Кашнера. - М., 1981. - 519с.
6. Затонская В.М., Лобанов Ф.И., Макаров Н.В. Некоторые успехи проблемы загрязнения окружающей внутренней среды свинцом //Успехи химии.- Т.50.- Вып.4.-1981.-С.693-714.
7. Звягинцев Д.Г. Биология почв и их диагностики //Проблемы и методы биологической диагностики и индикации почв. – М., 1976. – С. 175-189.
8. Паников Н.С. Кинетика роста микроорганизмов. М.: Наука, 1991, 311с.
9. Пидопличко Н.М. Грибы – паразиты культурных растений: (Определитель в 3-х т.) Т.1-2. - Киев, 1977; Т.1. Грибы совершенные, 1977.- 296с. Т.2. Грибы несовершенные. – 1977. – 300с.
10. Сенцова О.В., Максимова В.Н. Действие тяжелых металлов на микроорганизмы //Успехи микробиологии. М., 1985. - С. 227-252.
11. Хижняк Т.В. Бактериальная трансформация и иммобилизация тяжелых металлов и радионуклидов: Автореф. диссертации ... доктора биологических наук. Москва, 2013. - 212 с.
12. Cortez, H., J. Pingarron, J. A. Munoz, A. Ballester, M. L. Blazquez, F. Gonzalez, C. Garc ıa, and O. Coto. 2010. Bioremediation of soils contaminated with metalliferous mining wastes. Trends Bioremediation Phytoremediation C. 283–99.

13. Ehrlich H.L. Microbes and metals //Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. Vol. 48. P. 687-692.
14. Feruke-Bello Y.M., Babalola G., Odeyemi Olu. A comparative study of the wild and mutated heavy metal resistant Klebsiella variicola generated for cadmium bioremediation /Bioremediation journal, 2018. - V. 22, N. 1-2, P.28–42.
15. Hughes M.N, Poole R.R. Metals and Microorganisms. - N.Y: Chapman and Hall, 1989. - 412 p.
16. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, H. L. Barnett, Barry B. Hunter, May 1998, 217p.
17. Robinson Junior Ndeddy Aka and Olubukola Oluranti Babalola. Identification and characterization of Cr-, Cd-, and Ni-tolerant bacteria isolated from mine tailings /Bioremediation journal, 2017, V. 21, N. 1, P.1–19.

Рецензент: Карабекова Ж.У *– биология илимдеринин доктору, Кыргыз Республикасынын УИА Биология институтунун директору.*