



Органик нэгдлээр бохирдсон хөрсийг микробиологийн аргаар цэвэршүүлэх боломж

Э.Цэнгүүн, Э.Цолмонгэрэл, Б.Бүжидмаа, Н.Туул, Ю.Хорлоо*

Агроэкологийн сургууль, ХААИС

*Холбоо барих хаяг: khorloo@muls.edu.mn

ХУРААНГУЙ

Гексахлорциклогексаныг манай улс хөдөө аж ахуйн салбарт өргөнөөр ашиглаж үр тариа, хүнсний ногооны талбай, ойн аж ахуйн хөрс, ургамлыг хортон шавжаас хамгаалах, мал амьтныг хамуу болон бусад төрлийн өвчнийг эмчлэхэд ашиглаж байсан. Энэхүү пестицид нь хүний эс, эд болон байгаль орчинд удаан хугацаагаар хуримтлагддаг, онцгой хортой, хорт хавдар үүсгэх нөлөөтэй, хэрэглэхийг хориглосон химийн бодис юм. Уг судалгаагаар гексахлорциклогексанаар бохирдсон хөрсний дээжинд илэрсэн бактерийн 12 омогийг 1%-ийн гексахлорциклогексан агуулсан хатуу (Nutrient agar) тэжээлт орчинд 25 хэмд 3 өдрийн турш өсгөвөрлөж ялган авсан. Биологийн шинж чанараараа ялгаатай бөгөөд уг хөрсний дээжинд доминант илэрсэн 2 омогийн морфологи, физиологи, биохимийн шинж чанарыг тодорхойлсон. Уг өсгөвөрүүдийн биохимийн шинж чанарыг тодорхойлоход НСНDB1 (коллекцийн №1) өсгөвөр 100%-иар *Bacillus circulans*, НСНDB2 (коллекцийн №2) өсгөвөр 99%-иар *Brevibacillus brevis* болохыг тус тус тодорхойлов.

Түлхүүр үг: гексахлорциклогексан, морфологи, физиологи, биохими, тэжээлт орчин

ОРШИЛ

Дэлхий дээр анх 1825 онд эрдэмтэн Michael Faraday гексахлорциклогексаныг химийн нийлэгжлийн аргаар гарган авсан бөгөөд улмаар 1942 онд Их Британи улсын Иеханий химийн үйлдвэрт их хэмжээгээр үйлдвэрлэж эхэлсэн байдаг. Тухайлбал: 1950-2000 онд дэлхий даяар жилдээ 600.000 тонн гексахлорциклогексан Линданыг үйлдвэрлэж хөдөө аж ахуйн салбарт өргөнөөр ашиглаж байсан. Дэлхий дахинаа анх эдгээр химийн хортой бодисуудын талаар 2001 оны 5-р сард Швед улсын Стокгольм хотноо дэлхийн 150 гаруй орон нэгдэн чуулж 2004 онд албан ёсоор 12 удаан задардаг органик бохирдуулагчид (УЗОБ)-ыг зарлаж, тэдгээрийн хор хөнөөлөөс хүний эрүүл мэнд, байгаль орчныг хамгаалах зорилготой Стокгольмын Конвенц байгуулсан. Монгол улс уг конвенцид 2004 онд нэгдэн орж, улмаар Засгийн газрын 2006 оны 99 дүгээр тогтоолоор “Удаан задардаг органик бохирдуулагчийн тухай” Үндэсний хөтөлбөрөө баталсан юм. Гэсэн хэдий ч эдгээр удаан задардаг органик бохирдуулагчдын нэг болох гексахлорциклогексан ($C_6H_6Cl_6$) нь манай улсын тариалангийн зарим талбайн хөрсөнд мөн мал эмнэлгийн хуучин агуулах зэрэгт хадаглагдсаар байна. Энэхүү бодис нь мэдрэлийн системийг

гэмтээж, элэг бөөрийг өвчлүүлж хорт хавдрыг үүсгэхэд нөлөөлдөг. Манай орны газар тариалангийн эдэлбэр газруудад хүнсний ногоог хортон шавжаас хамгаалах зорилгоор олон жилийн турш пестицидийн зориулалтаар гексахлорциклогексаныг өргөнөөр ашигласан байдаг. Иймд тухайн хөрсөн дэх микроорганизмуудыг илрүүлэн тэдгээрийн биологийн онцлогыг судлах нь уг пестицидээр бохирдсон хөрсийг микробиологийн аргаар нөхөн сэргээж биологийн цэвэрлэгээ хийхэд суурь судалгаа болно. Органик пестицидээр бохирдсон тариалангийн талбайн хөрсөн дэх бактерийг ялгаж, ангилал зүйн хамаарал, ферментийг нийлэгжүүлэх чадавхийг судлан удаан задардаг органик бохирдуулагчийг биозадралд оруулах чадавхитай бактерийн омогийг илэрүүлж тодорхойлон байгаль орчинд ээлтэй, хөрсний бохирдлыг цэвэршүүлэх, нөхөн сэргээхэд зориулагдсан микробын бэлдмэл (microbial agent) үйлдвэрлэн хөдөө аж ахуйн газар тариалангийн эдэлбэр газрын бохирдсон хөрсийг нөхөн сэргээж, цэвэршүүлэхэд ашиглаж орчны бохирдлыг микробиологийн аргаар цэвэршүүлэх нь орчин үеийн дэвшилтэт арга технологиудын нэг юм.

СУДАЛГААНЫ АРГА ЗҮЙ

Хөвсгөл аймгийн Рашаант сумын нутаг дэвсгэр дэх Энх тал хороолол 9-р хорооны 9-р гудамж /49⁰123344, 101⁰451401/-ны гексахлорциклогексанаар бохирдсон хөрснөөс дээж авав.

Хөрснөөс дээж авах арга. Судлах гэж байгаа газрын 1000 м² талбай бүрээс хөрсийг бохирдуулж байгаа гол цэгийн ойролцоо хэсэгт 25 м² талбай сонгон, тэр талбайн дөрвөн өнцөг, төв хэсгээс нь бүгд 5 цэгээс 15-20 см-ийн гүнээс дээж авна. Дээж авахдаа жижиг хүрзийг сайн цэвэрлэж, спирт шингээсэн хөвөнт бамбарын дөлөөр шатааж ариутган, дээж авах хэмжээнд хүртэл газраа ухаад, хүрзээ дахин дээрх аргаар ариутган ухсан нүхнийхээ 3-5 см орчим зузаан хэсгийг авч хаяад цаана нь гарч ирсэн талбайгаас 150-200 грам шороо авч, ариун лонхонд хийж, пергаментан цаасаар амсарыг нь даруулан бооно. Нэг дээжний хэмжээ 1 кг-аас илүүгүй байна [2].

Шингэрүүлгийн аргаар хатуу тэжээлийн орчинд суулгац хийх арга. Хөрсний дээжнээс 10 грамыг жигнэж аваад 9 мл устай колбонд хийж бөглөөд сайтар сэгсэрсэний дараа 10 минут болгон дахин сэгсрээд ариун пипеткээр 1 мл суспенз соруулан авч 9 мл ариутгасан устай 1-р хуруу шилэнд хийж сэгсэрсний дараа дахин 1 мл суспензийг ариутгасан пипеткээр соруулан 2-р хуруу шилэнд хийнэ. Улмаар 3, 4, 5-р гэх мэт хуруу шилэнд дээрх аргаар шингэрүүлгийг бэлтгэнэ. Тохиромжтой шингэрүүлгээс 1 мл суспенз авч зохих тэжээлт орчинтой петрийн аяганд хийн жигд тараагаад термостатанд тавина.

Эс будах арга. Бактерийн эс будах арга нь бактерийн эсийг будах хамгийн энгийн найдвартай аргад тооцогддог бөгөөд бактерийн будагдах шинж нь түүний эсийн ханын бүтэцтэй холбоотой. Бэхжүүлсэн препарат дээр шүлтлэг хөх ягаан будаг болох кристалл виолет дусааж 1-2 минут байлгах замаар будалтыг хийнэ. Препаратаа усаар угааж дээр нь Люголийн уусмалаас дусаана. 1-2 минут байлгасны дараа усаар зайлна. Дээрх препарат дээр 96% этилийн спиртийн уусмал дусааж 1 минут болгоод усаар угаана. Препарат дээр шүлтлэг шинжтэй улаан ягаан өнгийн фуксин дусааж 1-2 минут болгоно. Будалт дууссаны дараа препаратыг дахин усаар угааж хатаагаад микроскопоор харна. Этилийн спиртээр боловсруулалт хийх үед будаг нь арилсан эсүүд улаан ягаан болсон байх ба харин будгаа хадгалан үлдсэн эсүүд хөх ягаан өнгөөр будагдсан харагдана [2].

Бактерийн өсгөвөржил шинж чанарыг тодорхойлох арга. Петрийн аяганд давамгайлан

ургасан бактерийн өсгөвөржил шинж чанарыг өсгөвөрийн хэмжээ (том - 10 мм, дунд зэрэг - 1-10 мм, цэгэн - 1мм), хөндлөн огтлол (дугуй, конусан, хавтгай, гэр хэлбэрийн), зах (тэгш, долгиотсон, шүдлэг, сормуулаг, мөчирлөсөн), гадаргуу (хавтгай, үрчгэр, атираатай), төлөв байдал (өтгөн, салслаг, шингэн, наалдамхай) гэсэн үзүүлэлтүүдийг баримтлан тодорхойлно.

Бактерийн эсийн морфологи шинж чанар. Олон улсын СИ системээр микробын эсийн хэмжээний нэгжийг микрометр (мкм) буюу 1/1000 миллиметр (мм) байхаар тогтжээ. Микроорганизмын эсийн хэмжээг тодорхойлохдоо микроскопын объектив ба окулярмикрометрийг ашиглана. Объективмикрометр нь голдоо шилэн дугуйтай, түүн дээр 1 мм-ийг 100 хуваасан зураастай, зураасны хоорондох зай нь 0,01 мм буюу 10 мкм хэмжээтэй байна. Окуляр микрометр нь ижил хэмжээтэй хуваагдсан зураасуудтай дугуй пластинк хэлбэртэй. Бактерийн эсийг хэлбэрээр нь кокк, савханцар, коккбацилл, махир савханцар, спирилл, спирохет (мушгиа) гэх зэргээр ангилна.

Температурын хамаарлыг тодорхойлох арга. Nutrient агар тэжээлт орчинд тарилга хийсний дараа 4°C-42°C –д тус тус 24-48 цаг өсгөвөрлөн цэвэр өсгөврүүдийн ургалтын эрчмээр нь температурын хамаарлыг тодорхойлно.

pH-ийн хамаарлыг тодорхойлох арга. Хатуу тэжээлт орчинд тарилга хийсний дараа 4-14 -д тус тус 24-48 цаг өсгөвөрлөн цэвэр өсгөврүүдийн ургалтын эрчмээр нь температурын хамаарлыг тодорхойлно.

Каталаза ферментийн идэвхи тодорхойлох арга. Ихэнхи аэроб микроорганизмууд каталазын идэвхитэй байдаг. Облигат анаэроб ба ихэнхи микробууд каталазын идэвхигүй байдаг. Каталаза фермент нь устөрөгчийн хэт исэлийг задалж хүчилтөрөгч үүсгэдэг. Каталазын идэвхийг тодорхойлохын тулд шингэн тэжээлийн орчинд ургуулсны дараа дээр нь 1 мл 33% устөрөгчийн хэт исэлийг хийж өгөхөд их хэмжээний хийн цэврүү үүсдэг. Энэ нь тухайн эсэд каталаза фермент байгааг илтгэнэ.

Оксидаза ферментийн идэвхи тодорхойлох арга. Оксидазын дискний тусламжтайгаар тодорхойлно. Үүний дүнд цэвэр өсгөвөрөөс суспенз бэлтгэн дискэн дээрээ дусаана. Дусаасан хэсэгт оксидазын диск хөх өнгө үзүүлж байвал оксидазын сорил эерэг харин өнгөгүй хэвээр байвал оксидазын сорил сөрөг байна гэж тооцно [7].

VITEK® 2 (bioMérieux) автомат анализатораар биохимийн идэвхийг тодорхойлох арга. Сонгон авсан өсгөвөрүүд нь холимог биш, цэвэр буюу нэгэн төрлийн колони байх шаардлагатай. Дээжнээс цэвэр өсгөвөр ялгаж, морфологи,

физиологийн шинжийг харгалзан хоорондоо ялгаатай цэвэр өсгөвөрүүдийг сонгон авч автомат VITEK® 2 Грам сөрөг карт, Грам эерэг карт ашиглан тодорхойлно [8].

СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН ҮР ДҮН

Бактерийн нийт 2 омогийг 1%-ийн гексахлорциклогексан агуулсан хатуу /Nutrient agar/ тэжээлт орчинд 25 хэмд 3 өдрийн турш өсгөвөрлөж ялган авсан. Биологийн шинж

чанараараа ялгаатай бөгөөд уг хөрсний дээжинд доминант илэрсэн 2 омогийн морфологийн шинж чанарыг тодорхойлсон /Table 1/.

Table 1

Morphological characterization of isolated bacteria

Д/д	Колонь дугаар	Бактерийн эсийн тоо (1 гр/сая)	Колонь хэмжээ	Хэлбэр	Өнгө	Гадаргуу	Зах	Төлөв байдал
1	НСНДВ1	5	1 мм	Дугуй	Бор шаргал	Барзгар	Тэгш	Долгиолсон
2	НСНДВ2	1	2 мм	Дугуй	Бор хүрэн	Барзгар	Тэгш бус	Нягт

Нийт ялгасан бактерийн 2 омог дугуй хэлбэртэй, барзгар гадаргуутай, бор шаргал, бор хүрэн өнгөтэй, тэгш ба тэгш бус захтай, долгиолсон болон нягт төлөвтэй, хэмжээгээрээ дунд зэргийн колони болохыг тодорхойлов.

Грамын будалтыг хийж үзэхэд НСНДВ1, НСНДВ2 омогууд нь Грам эерэг бактери илэрсэн.

Эдгээр 2 омог тус бүрийн физиологийн идэвхийг шингэн (Nutrient Broth) болон хатуу (Nutrient agar) тэжээлт орчинд температур болон орчны зөрүүтэй нөхцөлд өсгөвөрлөхөд 4-40 хэмд, 0-7%-ийн давстай, 3-11 рН орчинд өсгөвөрлөгдөж, каталаза ферментийг нийлэгжүүлж, оксидаза ферментийг нийлэгжүүлэхгүй байна /Table 2/.

Table 2

Physiological characterization of isolated bacteria

Омог	Температур	Оптималь температур	рН	Оптималь рН	NaCl	NaCl /оптималь/	Катал аза	Оксид аза
НСНДВ1	4-40	25-35	3-11	6-9	0-7	1-5	+	-
НСНДВ2	4-40	25-35	3-11	7-9	0-7	1-5	+	-

+эерэг, -сөрөг

Уг бактерийн өсгөвөрүүдийг VITEK® 2 Грам эерэг карт ашиглан биохимийн шинж чанарыг тодорхойлоход НСНДВ1 бактерийн омог нь Arginine dihydrolase, Beta-galactosidase, Cyclodextrin, Beta-galactopyranosidase, Alpha-mannosidase, Leucine arilamidase, L-Pyrrolidone arilamidase, Beta-glucuronidase, Urease, D-galactose, D-ribose, Lactose, N-acetylglucosaminidase, D-mannitol, D-

mannose, Pullulan, Salicin, D-trehalose, НСНДВ2 бактерийн омог нь Arginine dihydrolase, Beta-galactosidase, Cyclodextrin, Alpha-mannosidase, Leucine arilamidase, L-Pyrrolidone arilamidase, Beta-glucuronidase, Urease, D-galactose, D-ribose, Pullulan, Salicin, Sucrose зэрэг макромолекулууд, ферментүүдийг нийлэгжүүлж, задлаж байна /Table 3/.

Table 3

VITEK® 2 /bioMérieux/ automatic test for Gram positive bacteria				
№	Тестийн нэршил	Тестийн товчлол	HCHDB1	HCHDB2
1	D-amygdalin AMY	AMY	-	-
2	Phosphatidylinositol phospholipase C	PIPLC	-	-
3	D-xylose	dXYL	-	-
4	Arginine dihydrolase 1	ADH1	+	+
5	Beta-galactosidase	BGAL	+	+
6	Alpha-glucosidase	AGLU	-	-
7	Ala-phe-pro-arylamidase	APPA	-	-
8	Cyclodextrin	CDEX	+	+
9	L-aspartate arilamydase	AspA	-	-
10	Beta galactopyranosidase	BGAR	+	-
11	Alpha-mannosidase	AMAN	+	+
12	Phosphatase	PHOS	-	-
13	Leucine arilamydase	LeuA	+	+
14	L-proline arilamydase	ProA	-	-
15	Beta glucuronidase	BGURr	-	-
16	Alpha-galactosidase	AGAL	-	-
17	L-Pyrrolidone arilamydase	PyrA	+	+
18	Beta-glucuronidase	BGUR	+	+
19	Alanine arilamydase	AlaA	-	-
20	Tyrosine arilamydase	TyrA	-	-
21	D-sorbitol	dSOR	-	-
22	Urease URE	URE	+	+
23	Polymixin B resistance	POLYB	-	-
24	D-galactose	dGAL	+	+
25	D-ribose	dRIB	+	+
26	lactate alkalisation	ILATk	-	-
27	Lactose	LAC	+	-
28	N-acetylglucosaminidase	NAG	+	+
29	D-maltose	dMAL	-	-
30	Bacitracin resistance	BACI	-	-
31	Novobiocin resistance	NOVO	-	-
32	Growth in 6.5% NaCl	NC6.5	-	-
33	D-mannitol	dMAN	+	+
34	D-mannose	dMNE	+	+
35	Methyl-B-DGlucopyranoside	MBdG	-	-
36	Pullulan	PUL	+	+
37	D-raffinose	dRAF	-	-
38	O/129 resistance	O129R	-	-
39	Salicin	SAL	+	+
40	Sucrose	SAC	-	+
41	D-trehalose	dTRE	+	-
42	Arginine dihydrolase	ADH2s	-	-
43	Optochin resistance	OPTO	-	-
Ижил төстэй байдал			<i>Bacillus circulans</i> 100%	<i>Brevibacillus brevis</i> 99%

Эдгээр 2 омогийн биохимийн шинж чанарыг автомат VITEK® 2 Грам эерэг карт ашиглан тодорхойлоход HCHDB1 өсгөвөр (коллекцийн

№1) 100%-иар *Bacillus circulans*, HCHDB2 (коллекцийн №2) 99%-иар *Brevibacillus brevis* омог болох нь тус тус тогтоогдсон.

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ

Bacillus subtilis нь грам эерэг, савханцар, хөрсний бактер бөгөөд биотехнологийн салбарт өргөнөөр ашиглагддаг. Бактерийн эсийн хромосомын судалгаа хийхэд загвар организм болдог ач холбогдолтой зүйл юм. *Bacillus subtilis* нь ойролцоогоор 4-10 мкм урттай, 0.25-1 мкм диаметртэй, температурын хэт зөрүүтэй нөхцөлд амьдрах чадвартай, эндоспор үүсгэдэг бактери юм [3,4,5]. Хөрсөнд ялзруулагч, спор үүсгэдэг, аэробуудаас *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* ба *Bacillus megatherium*, ялзруулагч, спор үүсгэдэггүй, аэроб болон

факультатив анаэробуудаас *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Bacterium aquatilis* ба *Bacterium flavum* бактери гэх мэт агуулагддаг [1]. Бидний судалгаагаар пестицидээр бохирдсон хөрсний дээжинд доминант илэрсэн бактерийн омогуудын биологийн шинж чанарыг тодорхойлоход НСНДВ1 өсгөвөр *Bacillus circulans*, НСНДВ2 өсгөвөр *Brevibacillus brevis* омог болохыг тогтоосон нь бусад судлаачдын гексахлорциклогексанаар бохирдсон хөрснөөс илрүүлсэн бактерийн омогуудтай дүйж байна [9, 10].

ДҮГНЭЛТ

1. Гексахлорциклогексанаар бохирдсон хөрсний дээжинд доминант илэрсэн бактерийн 2 омогийг ялган морфологийн шинж чанарыг тодорхойлоход бүгд дугуй хэлбэртэй, барзгар гадаргуутай, бор шаргал, бор хүрэн өнгөтэй, тэгш ба тэгш бус захтай, долгиолсон болон нягт төлөвтэй, хэмжээгээрээ дунд зэргийн колони болохыг тодорхойлов. НСНДВ1, НСНДВ2 бактерийн омогуудын физиологийн шинж чанарыг тодорхойлоход 4-40 хэмд, 0-7%-ийн давстай, 3-11 рН орчинд өсгөвөрлөгдөж, каталаза ферментийг нийлэгжүүлж, оксидаза ферментийг нийлэгжүүлэхгүй болохыг тодохойлов.
2. Тус омогуудын биохимийн шинж чанарыг автомат VITEK® 2 Грам эерэг карт ашиглан тодорхойлоход НСНДВ1 өсгөвөр (коллекцийн №1) 100%-иар *Bacillus circulans*, НСНДВ2 (коллекцийн №2) 99%-иар *Brevibacillus brevis* омог болох нь тус тус тогтоогдсон.
3. Эдгээр нутгийн омогууд нь гексахлорциклогексаныг бодисын солилцоондоо ашиглаж байгаа нь уг пестицидээр бохирдсон Хөвсгөл аймгийн Рашаант сумын нутаг дэвсгэр дэх уг бодисоор их хэмжээгээр бохирдсон хөрсөнд биологийн цэвэрлэгээ хийхэд ашиглагдах боломжтойг харуулж байна.

АШИГЛАСАН БҮТЭЭЛИЙН ЖАГСААЛТ

- [1] Л.Галт, Б.Цэрмаа. “Хөрсний микробиологи” УБ. 1990.
- [2] Л.Галт. “Хөрсний микробиологийн судалгааны аргууд” УБ.2004.
- [3] KhorlooYundendorj, “Characterization of Petroleum Oil and Endosulfan Degrading Bacteria from Marine Bacterial Libraries” Ph.D. dissertation, Dept. Env. Edu., Suncheon Univ., Korea, 2013.
- [4] Madigan, M; Martinko, J, eds. “Brock Biology of Microorganisms”, 11th ed.. Prentice Hall, 2005.
- [5] Nakamura, L. K. “Taxonomic Relationship of Black-pigmented *Bacillus subtilis* Strains and a Proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov.” International Journal of Systematic Bacteriology, 1989.
- [6] David Sheehan, “Bioremediation protocols” USA, 1997.
- [7] D.H. Bergey, John G Holt. “Bergeys manual of determinative bacteriology”, 9 th edition, USA , 1994.
- [8] Prederic Wallet, Caroline Lorez, Emilie Renaux, “Performances of VITEK 2 Colorimetric Cards for identification of Gram-Positive and Gram-negative Bacteria” 2005.
- [9] Gupta, A., C. P. Kaushik, and A. Kaushik, Degradation of hexachlorocyclohexane (HCH; α , β , γ and δ) by *Bacillus circulans* and *Bacillus brevis* isolated from soil contaminated with HCH. Soil Biol. Biochem. 32:1803-1805, 2000.
- [10] Yule, W. N., M. Chiba, and H. V. Morely. “Fate of insecticide residues. Decomposition of lindane in soil”. J. Agric. Food Chem. 15:1000-1004, 1967.

Possibility of microbial remediation of soil contaminated by organic compounds

Tsenguun Enkhtur, Tsolmongerel Erdenebayar, Bujidmaa Baasandorj, Tuul Nyambal,
Khorloo Yundendorj*

School of Agroecology, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding author: khorloo@muls.edu.mn

ABSTRACT

Hexachlorocyclohexane (HCH) has been widely used in agriculture of our country to protect crops, vegetable fields, forest soils and plants from pests, and to treat scabies and other diseases in livestock. This pesticide is a highly toxic, carcinogenic, and banned substance that accumulates in human cells, tissues, and the environment over a long period of time. Incubated at 25°C for 3 days. The morphological, physiological, and biochemical characteristics of the two strains that differed in their biological properties and were dominant in the soil sample were determined. To determine the biochemical properties of these cultures, HCHDB1 (collection №1) culture was identified as 100% *Bacillus circulans* and HCHDB2 (collection № 2) culture was identified as 99% *Brevibacillus brevis*.

Keywords: hexachlorocyclohexane, morphology, physiology, biochemistry, nutrient medium