

Улаанбаатар хотын хөрс болон уснаас хар тугалгад тэсвэртэй бактери илрүүлэх судалгааны дүнгээс

Б.Мөнхжин¹, Н.Алтанчимэг¹, Д.Түмэнжаргал², Н.Туул³

¹ Нийгмийн эрүүл мэндийн үндэсний төв

² МУИС, ШУС, БУС, Биологийн тэнхим

³ АШУҮИС, Нийгмийн Эрүүл Мэндийн Сургууль

Оршил

Биологийн нөхөн сэргээлтэнд бичил биетнийг ашиглах нь хими, физик (ион солилцлын арга, цахилгаан химийн боловсруултын арга, электроосмос, электрокоагуляци, электродиализ, мембран шүүлтийн арга, идэвхжүүлсэн нүүрсээр адсорбцлох, химийн тунадасжуулалтын арга г.м.) болон механик аргуудыг бодвол эдийн засгийн хувьд хэмнэлттэй, байгальд сөрөг нөлөө үзүүлдэггүй бөгөөд органик болон органик бус химийн нэдлийг задалж, бохирдсон хөрс, усыг цэвэршүүлж, нөхөн сэргээж чаддагаараа давуу талтай.

Хар тугалга нь агаар, ус, хүнс, арьсаар дамжин бие организмд орж, бараг бүх эрхтэн тогтолцоонд сөрөг нөлөө үзүүлдэг хортой хүнд элемент юм.

Аж үйлдвэржсэн болон агаарын бохирдол ихтэй орчинд хар тугалга ихээр агуулагдана. Хар тугалга нь байгальд PbS хэлбэрээр оршдог ба эрдсийн исэлдэлтээр хар тугалга хөрсөнд шилждэг. Харин хар тугалганы хүдрийг боловсруулах, шатаах, будаг хийх, хэвлэх үйлдвэрт ашиглах, сайн чанарын бетон гаргах зэрэг хүний үйл ажиллагааны үед их хэмжээний хар тугалга орчныг бохирдуулдаг.

Зарим микроорганизмууд хүнд металлын давсны тодорхой концентрацид тэсвэртэй байх төдийгүй түүнийг эс дотроо хуримтлуулах эсвэл бодисын солилцооны явцад урвалд оруулж хоргүйжүүлэх чадвартай [1]. Иймээс хүнд металлаар ялангуяа хар тугалгаар бохирдсон хөрсийг микроорганизмын

энэхүү чадварыг ашиглан хүнд металлыг хөрснөөс зайлуулах биотехнологийн аргыг боловсруулах боломжтой. Уг аргыг боловсруулахад нэн түүрүүнд хар тугалганы үйлчлэлийг тэсвэрлэх чадвартай микроорганизмыг илрүүлэх шаардлагатай юм.

Судалгааны материал, арга зүй

Судалгааны материал

Хөрсний дээжийг Улаанбаатар хотын Баянзүрх, Чингэлтэй, Хан-Уул, Сүхбаатар, Сонгино-Хайрхан болон Налайх дүүргийн 18 цэгээс нийт 36 дээж цуглуулав. Нийт 14 цэгээс (Дунд гол, Туул гол, Ногоон нуур, Бэлх, Дондогдуламын рашаан, Хар тугалганы үйлдвэр ойролцоох тогтоол нуур, Төв цэвэрлэх байгууламж) усны дээж авч судалгаанд ашиглав.

Хөрсөнд хар тугалганы агууламжийг тодорхойлох арга зүй

Хөрсийг USS#10 шүүлтүүрээр шүүгээд 24 цаг 40°C хадгална. Дээжнээс 1 г жинлэн авч HNO₃ болон H₂O₂ -д уусган дээжийн задаргаа хийнэ. Уусмалаа шилэн фибер шүлтүүр ашиглан 100 мл -ийн хэмжээт колбонд шүүж, MNS (ISO) 11885:2011 стандарт аргаар iCAP7400 ICP-OES багаж ашиглан хар тугалганы агууламжийг тодорхойлох шинжилгээг хийнэ.

Хөрснөөс хүнд металл тэсвэртэй бактери илрүүлэх арга зүй

Хөрсний дээжийг Plate Count Agar гэжээлт орчинд өсгөвөрлөж бичил биетний тоог тогтооно. Тэжээлт орчны гадаргуу дээр ургасан колоний морфологийн онцлог шинж чанарыг тодорхойлж,

колоний бичиглэл хийнэ. Хар тугалганы 1 – 8 mM концентрацитай Nutrient Broth шингэн орчинд өсгөвөрлөж, хамгийн өндөр концентрацийг тэсвэрлэж ургасан цэвэр өсгөвөрийн өсөлтийн динамикийг тодорхойлно. Бактерийн өсөлтийн динамикийг тодорхойлохдоо 1000 мг/л хар тугалганы агууламжтай 9мл Nutrient Broth шингэн орчинд цэвэр өсгөвөрийн суспензээс 1мл -ийг хийж байнгын сэгсрэлттэй термостатад 37°C өсгөвөрлөнө. Өсгөвөрлөлтийн 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 цагуудаас дээж авч спектрофотометр ($\lambda = 600 \text{ nm}$) -ээр гэрлийн шингээлтийг хэмжиж өсөлтийн динамикийг гаргана. Хар тугалгагүй орчинг хяналт болгоно. Хар тугалгатай орчинд өсгөвөрлөсөн бактерийн өсөлтийн динамикийг хяналттай харьцуулна.

Хар тугалганы агууламжийг бууруулж буй эсэхийг тодорхойлохдоо Nutrient Broth шингэн орчинд хар тугалганы давсыг 500 мг/л хэмжээгээр хийж, дээр нь хөрснөөс ялгасан бактерийн өсгөвөрөөс тарилга хийж 37°C –ийн 160 эрг/мин хурдтай сэгсрэгчтэй термостатад өсгөвөрлөнө [3,4,5,6].

Бактерийг тодорхойлох арга зүй

VITEK®2 хагас автомат анализатор ашиглан тодорхойлно. VITEK®2 багаж нь бичил биетний төрөл зүйлийг үндсэн 64 биохимийн шинжид үндэслэн тодорхойлох бөгөөд Грамын будалтаас шалтгаалж шинж бүрт тохирох картыг ашигладаг. 5-н үндсэн карт байдаг. Үүнд: Грам сөрөг, Грам эерэг, хөгц мөөгөнцөр, спортой савханцар, эмгэг төрүүлэгч гэж ангилна. Үр дүн нь 5-18 цагийн дараа гарна. 4,5% - ийн NaCl – ийн уусмалаас жижиг хуруу

шилэнд 3 мл-ийг хийнэ. Тэжээлт орчинд ургасан колониос микробиологийн гогцоо болон хөвөн бамбараар авч хуруу шилэнд хийнэ. Сэгсрэгчээр хольж эсийн булингга сайтар найруулна. Нягт хэмжигчээр эсийн булингын нягтыг шалгана. Эсийн булингатай хуруу шилэнд шинжилгээнийхээ картны гуурсыг дүрж кассетэнд байрлуулна. Шинжилгээ дуусахад хариу компьютерт автоматаар гарна.

Усанд хар тугалга тодорхойлох арга зүй

HNO_3 болон HCl ашиглан усны дээжийн задаргааг хийж Whatman 41 филтрээр шүүгээд дээжний сав (полипропилен) -нд хийнэ. Дээжин дэх хар тугалганы агууламжийг ICP-MS багажаар тодорхойлно.

Уснаас хүнд металлд тэсвэртэй бактери илрүүлэх арга зүй

Усны дээжинд 10^{-6} хүртэл шингэрүүлэг хийн Plate Count Agar тэжээлт орчинд тарилга хийн 30°C хэмд 48 цаг өсгөвөрлөнө. Ургасан колониос цэвэр өсгөвөр ялган авч хөрснөөс хүнд металлд тэсвэртэй бактери илрүүлэх аргазүйн дагуу шинжилгээг хийж гүйцэтгэнэ.

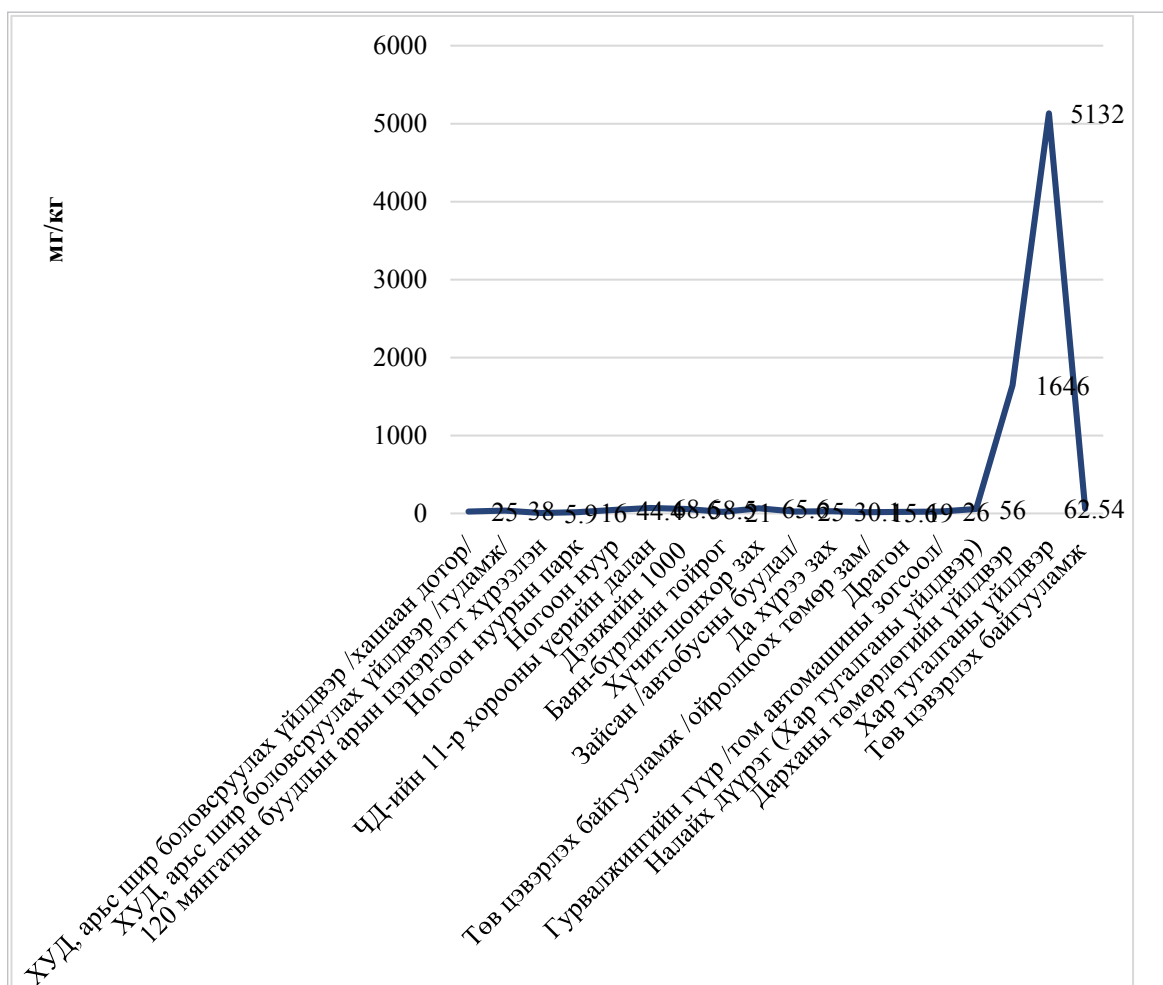
Судалгааны үр дүн

Хөрсний дээжинд хар тугалганы агууламж тодорхойлсон дүн

Нийт 18 цэгийн 2 дээж (Хар тугалганы үйлдвэр - 5132мг/кг, Дарханы төмөрлөгийн үйлдвэр – 1646 мг/кг) -нд хар тугалганы агууламж аюултай болон хортой агууламжийн хэмжээнээс (1200 мг/кг) давсан байна. Хөрсний дээжинд хар тугалганы агууламжийг тодорхойлсон үр дүнг Хүснэгт 1, Диаграмм 1 -д тус тус харуулав.

Хүснэгт 1. Хөрсний дээжин дэх хар тугалганы агууламж

№	Хөрсний дээж	Хар тугалганы агууламж (мг/кг)
1	ХУД, арьс шир боловсруулах үйлдвэр /хашаан дотор/	25
2	ХУД, арьс шир боловсруулах үйлдвэр /гудамж/	38
3	120 мянгатын буудлын арын цэцэрлэгт хүрээлэн	5.9
4	Ногоон нуурын парк	16
5	Ногоон нуур	44.4
6	ЧД-ийн 11-р хорооны үерийн далан	68.6
7	Дэнжийн 1000	58.5
8	Баян-бүрдийн тойрог	21
9	Хүчит-шонхор зах	65.6
10	Зайсан /автобусны буудал/	25
11	Да хүрээ зах	30.1
12	Төв цэвэрлэх байгууламж /ойролцоох төмөр зам/	15.6
13	Драгон	19
14	Гурвалжингийн гүүр /том автомашины зогсоол/	26
15	Налайх дүүрэг (Хар тугалганы үйлдвэр)	56
16	Дарханы төмөрлөгийн үйлдвэр	1646
17	Хар тугалганы үйлдвэр	5132
18	Төв цэвэрлэх байгууламж	62.54



Диagramм 1. Хөрсний дээжин дэх хар тугалганы агууламж

Хөрсний дээжнээс хар тугалганы давсны үйлчлэлд тэсвэртэй бактери илрүүлсэн дүн

Хөрсний нийт дээжийг Nutrient Agar орчинд тарилга хийж 37°C хэмд 24-48 цаг халуун тогтоогуурт өсгөвөрлөн улмаар 69 бактерийн цэвэр өсгөвөр ялгаж хар тугалганд тэсвэрлэх чадварыг тодорхойлоход 98% нь буюу 65 өсгөвөр хар тугалганы 1 mM концентрацид өсөж үржих чадвартай байна. 4 өсгөвөр хар

тугалганы 8 mM (1660мг/л) концентрацийг тэсвэрлэж байгааг тогтоов.

Бактерийн өсөлтийн динамикийг тодорхойлсон дүн

Хөрснөөс ялгасан UBMF2 дугаартай өсгөвөр хар тугалгатай орчин дахь биомассын хуримтлал 72-96 цагт хамгийн их, SUBZ4, UBLF1 болон UBLF3 өсгөвөр 48-72 цагт хамгийн их биомасс тус тус үүсгэж байна.

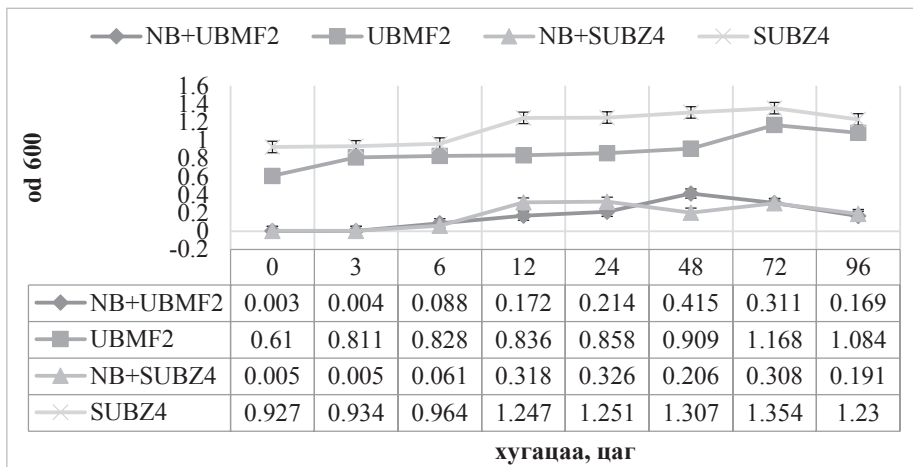


График 1. Хөрснөөс ялгасан UBMF2, SUBZ4 өсгөвөрийн өсөлтийн динамик (хар тугалгатай болон хар тугалгагүй орчинд)

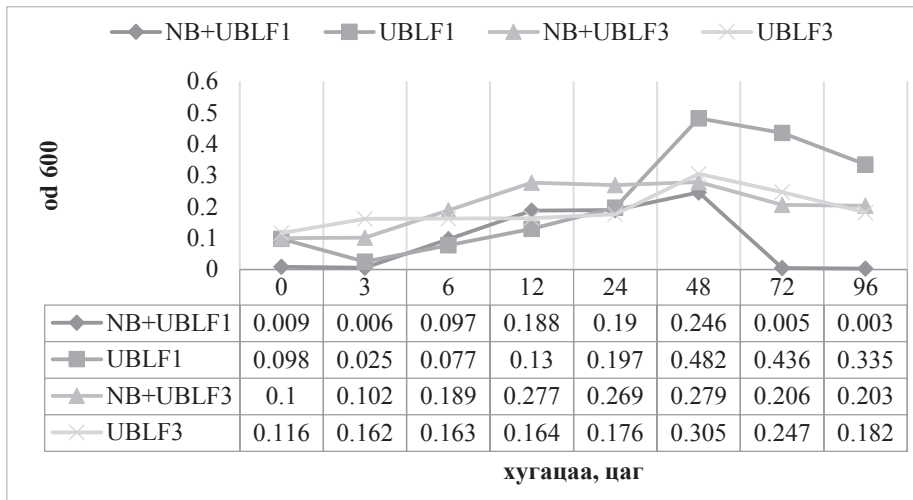
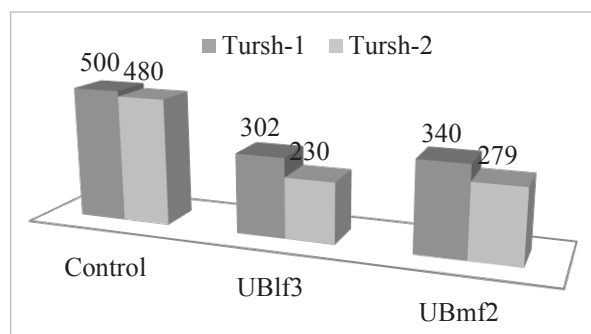


График 2. Хөрснөөс ялгасан UBLF1, UBLF3 өсгөвөрийн өсөлтийн динамик (хар тугалгатай болон хар тугалгагүй орчинд)

Хар тугалганы агууламжийг бууруулж буйг тодорхойлсон туршилтын дүн

Хар тугалганы хамгийн өндөр концентрацийг тэсвэрлэж байгаа 2

өсгөвөрөө 500 мг/л-ээр бэлдсэн шингэн орчинд өсгөвөрлөж, харьцуулалт хийв. 14 хоногийн дараа хар тугалганы агууламжийг бууруулсан дүнг Диаграмм 2-р харуулав.



Диagramм 2. UBLF3 болон UBMF2 дугаартай өсгөвөрийн хар тугалганы агууламжийг бууруулсан байдал

UBLF3 дугаартай өсгөвөр хар тугалганы агууламжийг 302 мг/л болон 230 мг/л болтол бууруулсан. Харин UBMF2 дугаартай өсгөвөр 340 мг/л болон 279 мг/л болтол бууруулсан байна.

Хар тугалганд тэсвэртэй бактерийг тодорхойлсон дүн

VITEK®2 хагас автомат анализатораар тодорхойлоход UBLF1, UBLF3, SUBZ4 өсгөвөр нь *Bacillus* sp. –ийн төрөл (83%), харин UBMF2 нь *Bacillus thuringiensis* (93%) болохыг тодорхойлов.

Хүснэгт 2. Хөрснөөс ялгасан өсгөвөрийн физиологи - биохимийн шинж чанарыг VITEK®2 анализатороор тодорхойлсон үр дүн

№	Физиологи/ биохимийн шинж чанар	Өсгөвөрийн дугаар					Физиологи/ биохимийн шинж чанар	Өсгөвөрийн дугаар			
		SUBZ4	UBLF3	UBMF2	UBLF1			SUBZ4	UBLF3	UBMF2	UBLF1
1	BXYL	-	-	-	-	24	dMAN	+	-	-	-
2	LysA	-	-	-	-	25	dMNE	+	+	+	+
3	AspA	-	-	-	-	26	dMLZ	-	-	-	-
4	LeuA	+	+	+	+	27	NAG	+	(-)	(-)	(-)
5	PheA	+	+	+	+	28	PLE	+	-	-	-
6	ProA	-	-	-	-	29	IRHA	-	-	-	-
7	BGAL	-	-	-	-	30	BGLU	+	-	-	-
8	PyrA	+	+	+	+	31	BMAN	-	-	-	-
9	AGAL	-	-	-	-	32	PHC	-	-	-	-
10	AlaA	-	(+)	(+)	(+)	33	PVATE	(+)	+	+	+
11	TyrA	+	(+)	(+)	(+)	34	AGLU	(-)	-	-	-
12	BNAG	-	+	+	+	35	dTAG	-	-	-	-
13	APPA	-	-	-	-	36	dTRE	+	+	+	+
14	CDEX	-	-	-	-	37	INU	-	-	-	-
15	dGAL	-	-	-	-	38	dGLU	+	+	+	+
16	GLYG	-	-	-	-	39	dRIB	(-)	+	+	+
17	INO	+	-	-	-	40	PSCNa	-	-	-	-
18	MdG	+	-	-	-	41	NaCl 6.5%	+	-	-	-
19	ELLM	-	-	-	-	42	KAN	-	-	-	-
20	MdX	-	-	-	-	43	OLD	-	-	-	-
21	AMAN	-	-	-	-	44	ESC	+	+	+	+
22	MTE	-	+	+	+	45	TTZ	+	-	-	-
23	GlyA	+	-	-	-	46	POLYB_R	-	+	+	+

Тайлбар: (+) - эерэг, (-) - сөрөг

Усны дээжинд хар тугалганы агууламж тодорхойлсон дүн

Усны бүх дээжинд хар тугалганы агууламж 0.01 болон <0.01 мг/л –ээс бага буюу хүлцэх хэмжээнд байна.

Хүснэгт 3. Усан дахь хар тугалганы агууламж

№	Усны дээж	Хар тугалганы агууламж (мг/л)
1	Дунд гол (Энхтайвны гүүрийн нүхэн гарц)	<0.01
2	Дунд гол (Энхтайвны гүүрийн зүүн урд)	<0.01
3	Дунд гол (Энхтайвны гүүрийн зүүн хойд)	<0.01
4	Дунд гол (Энхтайвны гүүрийн баруун тал)	<0.01
5	Туул гол (Сонсголонгийн гүүр доод хэсэг)	<0.01
6	Туул гол (Төв цэвэрлэх байгууламж)	<0.01
7	Дунд гол (Нарны хорооллын гүүр зүүн)	<0.01
8	Ногоон нуур дээд хэсэг (11-р хороо)	<0.01
9	Ногоон нуур (Баянбүрд)	<0.01
10	Ногоон нуурын парк	<0.01
11	Бэлх гол	0.01
12	Дондогдуламын рашаан	0.01
13	Хар тугалганы үйлдвэр (хашаан доторх тогтоол нуур)	<0.01
14	Төв цэвэрлэх байгууламж	<0.01

Уснаас хар тугалганд тэсвэртэй бактери илрүүлсэн дүн

Уснаас ялгасан нийт 32 өсгөвөрөөс хар тугалганы давсны үйлчлэлд тэсвэртэй бактери илрээгүй болно.

Хэлцэмж

Дэлхий дахинд энэ чиглэлийн судалгааны ажил өргөн хүрээнд хийгдэж байна. Тухайлбал, *Bacillus thuringiensis* зүйлийг ашиглан ХАА-н хүнсний ногоо тариалах талбайн Cd, Pb-ын бохирдлыг бууруулах судалгааны ажлыг 2019 оноос Хятад улсад хийж байна [Zigang, Li., 2019]. Үүнээс гадна уг бактери нь мөнгөн ус, манганыг хуримтлуулах чадвартай бөгөөд газрын тосыг задлах идэвхитэй болохыг тогтоожээ. [Kailasam Saranya, 2019; Huimin Huang, 2020].

Харин бидний ялгасан *B.thuringiensis* нь хар тугалгыг хуримтлуулах чадвартай байв.

Weichuan Qiao (2019) хийсэн судалгааны ажлын хүрээнд *Bacillus subtilis* ХЗ хамгийн дээд тал нь хар тугалганы давсны 2000 мг/л концентрацийг тэсвэрлэж байгааг тогтоосон байна [7]. Бидний ялгасан *Bacillus* sp. 1660 мг/л концентрацийг тэсвэрлэх чадвартай байгааг тогтоов.

Хараа голын эргийн хөрснөөс ялгасан 1 өсгөвөр хар тугалганы 7 мМ концентрацийг тэсвэрлэсэн байна [N.Tuul, 2010]. Заамарын уурхайн хөрснөөс ялгасан савханцар хэлбэрийн 2 өсгөвөр хар тугалганы 3 мМ концентрацийг тэсвэрлэж байсан [N.Tuul, 2012]. Тамсагийн нефтийн уурхайгаас ялгасан Грам эерэг, савханцар хэлбэрийн 1 өсгөвөр хар тугалганы 848 мг/л концентрацийг тэсвэрлэж байсан [N.Tuul, 2013]. Бидний ялгасан өсгөвөрүүд болох (UBMF2, UBLF3, UBLF1, SUBZ4) 8 мМ-ийг тэсвэрлэж байгааг тодорхойлсон нь дээрх судалгааны үр дүнтэй ойролцоо байна.

Дүгнэлт

Бидний цуглуулсан нийт усны дээжин дэх хар тугалганы агууламж нь зөвшөөрөгдөх хэмжээнд байгааг тогтоосон бөгөөд уснаас ялгасан бүх цэвэр өсгөвөр хар тугалганы концентрацийг тэсвэрлэх чадваргүй байна.

Тэжээлт орчинд хийсэн хар тугалганы агууламжийг (500 мг/л) UBLF3 дугаартай өсгөвөр 302 мг/л болон 230 мг/л; харин UBMF2 дугаартай өсгөвөр 340 мг/л болон 279 мг/л болтол тус тус бууруулж байгааг тогтоов.

Хөрсний дээжнээс ялган авсан нийт өсгөвөрөөс хар тугалганы үйлчлэлийг хамгийн сайн тэсвэрлэж байгаа UBMF2 өсгөвөр нь *Bacillus thuringiensis* (93%), харин UBLF1, UBLF3, SUBZ4 өсгөвөрүүд нь *Bacillus* sp. (83%) болохыг тодорхойлов.

Ашигласан материал

1. Алтангэрэл, А., Даваасүрэн, С., Дорж, Д., 2009. Усан орчноос Pb (II)-ийг биосорбцийн аргаар багасгах судалгааны дүнгээс. *Шинжлэх Ухааны Академийн Мэдээ*, 191: х. 3-13
2. Abbas, H. S., Ismail, M. I., Mostafa, M. T. and Sulaymon, H. A., 2014. "Biosorption of heavy metals: A review. *Journal of Chemical Science and Technology*, Vol. 3, pp. 74–102.
3. Батчулуун, Ц., Гэрэлбаатар, С., 2015. Хөрс судлал. УБ. х. 11-14
4. Галт, Г., Цэрмаа, Д., 2000. Хөрсний микробиологи. УБ. х. 51-219
5. Chen, Y., Jiang, Y., Huang, H., Mou, L., Ru, J., Zhao, J. et al., 2018. Long-term and high-concentration heavy-metal contamination strongly influences the microbiome and functional genes in Yellow River sediments. *Sci. Total Environ.* pp. 637–638, 1400–1412
6. Оюунбилэг, Н., Цэцэг, Б., 2000. Улаанбаатар хот орчмын хөрсний актиномицетийн тархалт, тэдгээрийн хүнд металлд тэсвэрлэх чадвар. *Биологийн хүрээлэнгийн эрдэм шинжилгээний бүтээл*, х. 209-212
7. Weichuan Qiao Yunhao Zhang Hao Xia Yang Luo, 2019. Bioimmobilization of lead by *Bacillus subtilis* X3 biomass isolated from lead mine soil under promotion of multiple adsorption mechanisms
8. Tuul, N., Narantuya, D., Dorjkhand, B., Tumenjargal, D., 2010. The heavy metal resistance of bacteria from Kharaa river's riverside soil. International Conference "Current Advances in Microbiology, Immunology and Allergology", Ulaanbaatar, Mongolia, pp. 47-48

Detection results of lead resistant bacteria from soil and water in Ulaanbaatar city

B.Munkhjin¹, N.Altanchimeg¹, D.Tumenjargal², N.Tuul³

¹National Center for Public Health

²NUM, School of Science, Department of Biology

³MNUMS, School of Public Health

Abstract

Background: Soil pollution in Ulaanbaatar has increased in recent years, causing infectious and non-communicable diseases, both benign and malignant. Therefore, in order to reduce soil pollution, it is necessary to isolate strains resistant to heavy metals and use these microorganisms capable to degrade or accumulate heavy metals for bioremediation purposes.

Methods: Bacterial pure cultures were isolated from soil and water samples and incubated in a Nutrient Broth medium with a lead concentration of 1000 mg/L in a thermostat with a shaker at 37°C. The growth rate was determined at a wavelength of 600 nm using a Spectrophotometer.

Results: In total 69 pure cultures were isolated from the soil samples and 65 pure

cultures from them were able to grow at the concentration of lead of 1 mmol/L. 4 pure cultures (UBLF1, UBLF3, UBMF2, and SUBZ4) were able tolerate lead concentrations up to 8 mM. These cultures were determined by semi-automatic VITEK®2 analyzers and identified as *Bacillus* sp. (83%) and UBMF2 identified as *Bacillus thuringiensis* (93%) respectively.

Conclusion: The lead content in water samples were found to be acceptable, and isolated pure cultures were not able to withstand the lead concentrations.

Pure culture UBLF3 isolated from the soil capable to reduce lead concentration (500 mg/L) up to 302 mg/L and 230 mg/L in the medium, and pure culture UBMF2 up to 340 mg/L and 279 mg/L respectively.

*Танилцаж санал ирүүлсэн:
Зөвлөх зэргийн эмч Д.РЭГЗЭДМАА*