

Жалпы, соматлондық формалардың тамыр жүйесі NaCl-дың жоғары концентрациясына (1,68%) төзімділігі бастапқы сортпен салыстырғанда едәуір жоғары болып табылды. Селекцияға ендіріу үшін 1 гибрид және 14 соматлонды формалар сұрыптап алынды, олар сабақ және тамыр жүйесі бойынша төзімділігі бастапқы сортпен (бақылау) бірдеу, немесе жоғарылау және өте жоғары: Отан сортының 11 соматлонды линиясы (Отан №7.4 біркелкі линиялар; Отан 2№23 (10.2.7) өте ірі, қызыл және шыны тәрізді дәнді линия; Отан №7.14 линия; Отан 5 ақ дәнді линия, Отан 2 №23 (10.1) қызыл дәнді және қысқа сабақты линия, Отан №7.11 біркелкі линия, Отан 17(8.9) линия, Отан 2№23(10.2.6) өте ірі, қызыл және шыны тәрізді дәнді линия, Отан 8.7.5 қылтанақты линия, Отан №7 біркелкі линия, Отан 8.5.3 шыны тәрізді линия), Целинная 3С сортының 2 соматлонды линиясы (Целинная 3С R2 ерте пісіп жетілетін линия; Целинная 3С R2 жатаған емес және ерте пісіп жетілетін линия), өте жоғары тұзға төзімді гибридті линия Г₄ (Целинная 3С x Казахстанская 15) және оның нөлдік мутациясы бар Г₄соматлонды варианты.

1. Munns R. Genes and salt tolerance: bringing them together // *New Phytologist*. – 2005. – V. 167. – P. 645-663.
2. Sreenivasulu N., Grimm R., Wobus U., Weachke W. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt tolerant and salt sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*) // *Physiol. Plant.*, 2000. – V. 109. – P. 435-442.
3. Larkin P. J., Scowcroft W. R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement // *Theor. And Appl. Genet.* – 1981. – V.60. – № 4. – P. 197-214.
4. Adkins S.W., Kunanuvatchaidach R., Goodwin I.D. Somaclonal variation in rice – drought tolerance and other agronomic characters // *Aust. J. Bot.* – 1995. – V. 43. – P. 201-209.
5. Bertin P., Kinet J.M., Bouharmont J. Heritable chilling tolerance improvement in rice through somaclonal variation and cell line selection // *Aust. J. Bot.* – 1996. – V. 44. – P. 91-105.
6. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция /Отв. Ред. Глеба Ю.Ю. – Киев: Наукова Думка. – 1990. – 280 с.
7. Zhang G.Y., Guo Y., Chen S.L., Chen S.Y. RFLP tagging of a salt tolerance gene in rice // *Plant Sci.* – 1995. – V. 110. – P. 227-234.
8. Winicov I. Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt-tolerant cell lines // *Plant Sci.* – 1996. – V. 113. – P. 105-111.
9. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement // *Theor. And Appl. Genet.* – 1981. – V. 60. – (4). – P. 197-214.
10. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. – Москва: ВО «Агропромиздат». – 1990. – 384 с.
11. Кучеренко Л. Индуцированный морфогенез в культуре тканей риса и его использование для создания исходного селекционного материала /В кн.: Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука. – 1986. – С.211-214.
12. Ahloowalia B. S. Somaclones of wheat regenerated from primordial leaf callus // *Gen. Manipulat. Plant. Breed. Proc. Int. Symp.*, Berlin, Sept. 8-13. – 1985. – P. 577-579.
13. Терлецкая Н.В. Диагностика устойчивости мягкой пшеницы к засухе и солевому стрессу, моделируемому in vivo и in vitro // Биотехнология. Теория и практика. – Алматы, 2008. – №4. – С.64-70.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа. – 1990. – 352 с.

В результате скрининга на солеустойчивость 25 соматлонных линий пшеницы сорта Отан, Целинная 3С и гибридной линии Г₄ (Целинная 3С x Казахстанская 15) были выявлены солеустойчивые формы.

As the result of screening for salt tolerance of 25 somaclonal lines of wheat varieties Otan, Cellinnaya 3S and hybrid line H₄ (Celinnaya 3S x Kazakhstanskaya 15) have been revealed the salt-resistant forms.

А.В. Гончарова, Т.А. Карпенюк, Я.С. Цуркан

УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ АКТИВНОГО ИЛА КАК СОРБЕНТЫ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Из активного ила выделены штаммы бактерий Pseudomonas sp. 409TA и дрожжей Candida sp. 410AT, способные хорошо размножаться в присутствии в среде высоких концентраций Cu²⁺ и Zn²⁺, неприхотливые к питательным средам и обладающие способностью к использованию нефтепродуктов в качестве источников углерода и энергии.

К многочисленным вредоносным для окружающей среды и человека воздействиям, относятся загрязнения водоемов промышленными и коммунально-бытовыми сточными водами, содержащими нефтепродукты и тяжелые металлы [1-3]. Применяемые в настоящее время системы и принципы очистки сточных вод весьма разнообразны и среди них едва ли не самое значительное место отведено

биологическим методам, так как биологическая очистка - это прежде всего деструкция чуждых природной среде соединений, осуществляемая безреагентным путем.

Некоторые микроорганизмы активного ила, применяемого в сооружениях биологической очистки, способны накапливать и трансформировать металлы, углеводороды нефти и другие загрязнители в больших количествах, поскольку в ходе эволюции в них сформировались системы их поглощения, концентрирования и переработки [4,5]. Селекция в этом направлении позволит получить формы, активно аккумулирующие и трансформирующие загрязнители, отобрать штаммы, обладающие высокой емкостью и селективностью по отношению к данным загрязнителям, оценить возможность и целесообразность их применения для решения практических задач по очистке и доочистке промышленных растворов, сточных вод, загрязненных почв. и на их основе создавать перспективные препараты и системы для биоочистки..

Из агрессивной среды сооружений биологической очистки городских сточных вод нами были выделены штаммы бактерий *Pseudomonas sp. 409TA* и дрожжей *Candida sp. 410AT*, характеризующиеся высокой способностью к деградации углеводородов нефти и нефтепродуктов [6-8]. Они продемонстрировали способность размножаться в присутствии в среде культивирования высоких концентраций Cu^{2+} и Zn^{2+} (). Для оценки потенциала их практического использования при очистке сточных вод, загрязненных как нефтепродуктами, так и тяжелыми металлами, в модельных экспериментах нами были изучены процессы извлечения из растворов ионов Cu^{2+} и Zn^{2+} штаммами *Pseudomonas sp. 409TA* и *Candida sp. 410AT*.

Материалы и методы исследований

Объектами исследования послужили штаммы нефтеокисляющих микроорганизмов родов *Pseudomonas* и *Candida* - *Pseudomonas sp. 409TA*, *Candida sp. 410AT*, выделенные из активного ила очистных сооружений г.Алматы. В работе были использованы стандартные питательные среды [9-11]. Для приготовления растворов металлов использовали соли ZnCl_2 и $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. В качестве источников углерода использовали дизельное топливо, нефть, глюкозу.

Кинетику сорбции ионов тяжелых металлов изучали методом ограниченного объема [12,13]. Для проведения экспериментов рабочий показатель оптической плотности составлял 0,05 для клеток бактерий и дрожжей, что соответствует $0,45 \cdot 10^6$ кл/мл бактерий, $6 \cdot 10^3$ кл/мл дрожжей. Остаточное количество металла в супернатанте методом атомно-адсорбционной спектроскопии [14]. Содержание меди определяли комплексометрическим методом в присутствии металлоиндикатора мурексида. Содержание цинка определяли комплексометрическим методом в присутствии металлоиндикатора ксиленолового оранжевого [15]. Все эксперименты проводили в 3-5 кратной повторности. Статистическую обработку полученных результатов проводили методом [16].

Результаты и обсуждения:

Изучение процессов извлечения ионов тяжелых металлов данными культурами из раствора (среда культивирования) было проведено с использованием следующих вариантов опыта:- суспензия бактерий - раствор металла;- суспензия дрожжей - раствор металла;- суспензия бактерий и дрожжей - раствор металла по следующей схеме (риснок 1).

В результате проведенных экспериментов было показано, что после внесения ионов меди к смыву, содержащему дрожжевые клетки, уже в течение первых десяти минут содержание ионов меди в исследуемом растворе значительно уменьшалось. Так, при добавлении к дрожжевым клеткам ионов меди в концентрации 0,5 г/л клетки поглощали $91,75\% \pm 0,4$, что свидетельствует о том, что дрожжевые клетки способны к быстрому извлечению ионов меди из раствора за счет сорбции металла на своей поверхности. При внесении ионов меди в среду культивирования в концентрации 6 г/л дрожжевые клетки сорбировали $98,34\% \pm 1,4$; а при внесении к смыву дрожжевых клеток ионов меди в концентрации 9 г/л, дрожжевые клетки сорбировали $99,44\% \pm 1,7$.

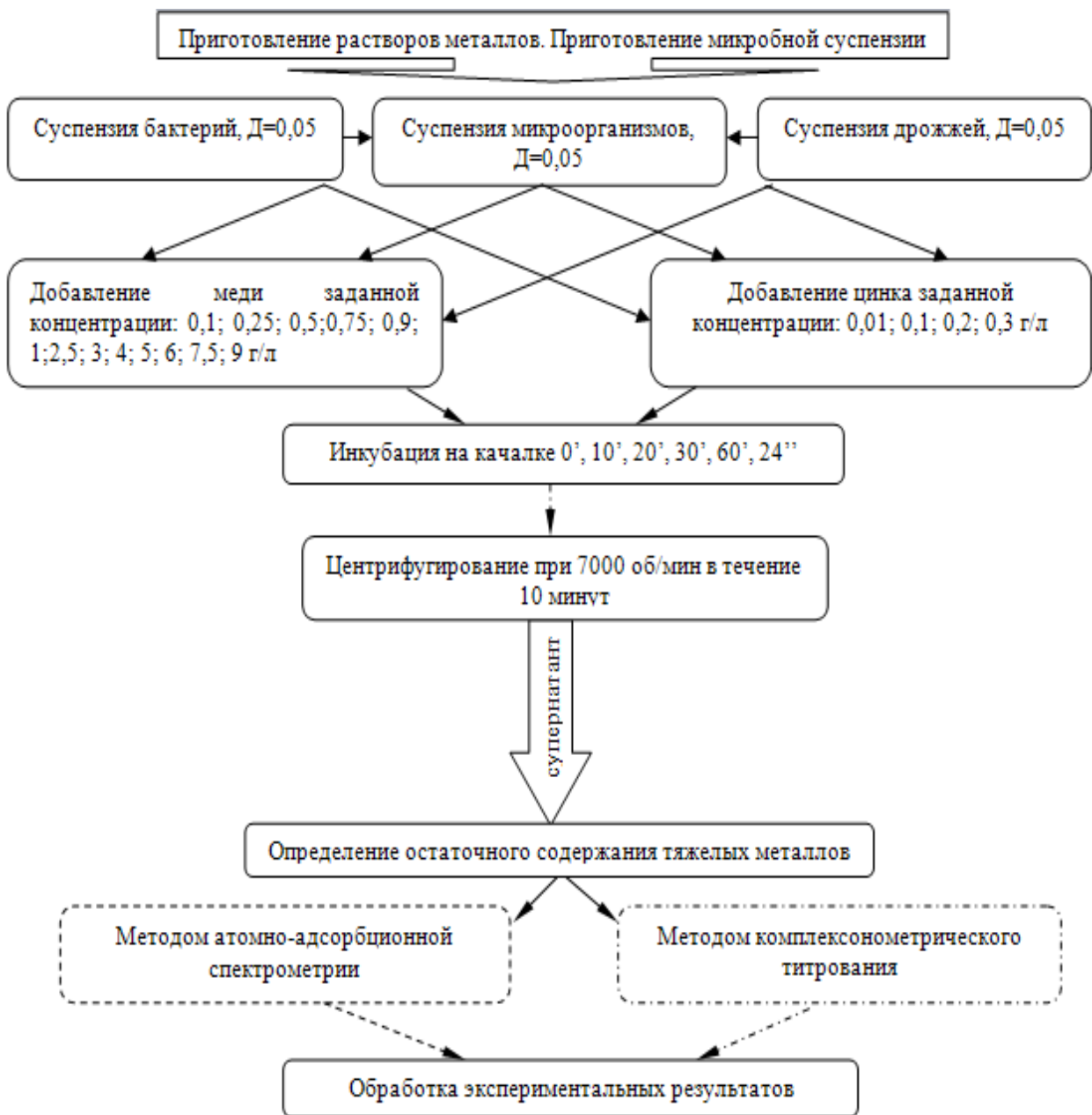


Рисунок 1 - Изучение процессов извлечения ионов тяжелых металлов культурами

При изучении сорбционной способности дрожжевых клеток по отношению к ионам цинка было показано: при добавлении цинка в концентрациях 0,01; 0,1; 0,2; 0,3 г/л клетки дрожжей сорбировали $93,6\% \pm 1,6$; $96,3\% \pm 1,8$; $99\% \pm 0,4$; $99,023\% \pm 0,2$ соответственно.

Аналогичная серия экспериментов была проведена для клеток бактерий *Pseudomonas sp. 409TA*. При добавлении ионов меди в концентрации 0,25 г/л к смыву, содержащему бактериальные клетки, процент поглощения ионов составлял $91\% \pm 0,8$. При концентрации ионов меди 0,9 г/л в смыве бактериальных клеток процент поглощения составлял $94,17\% \pm 2$; а при концентрации ионов меди 9 г/л в смыве, содержащем бактериальные клетки, поглощающая способность доходила до $94,79\% \pm 1$.

При добавлении к суспензии клеток бактерий ионов цинка в концентрации 0,01 г/л процент извлечения иона металла составлял $93,5\% \pm 0,5$. При увеличении концентрации цинка увеличивался процент поглощения цинка клетками бактерий, который доходил до $98,13\% \pm 0,2$ при добавлении цинка в концентрации 0,3 г/л.

Совместное культивирование клеток бактерий и дрожжей показало, что процент сорбирования меди при добавлении ее в концентрации 7,5 г/л составлял $99,19\% \pm 1,3$; процент сорбирования цинка микроорганизмами при внесении в концентрации 0,3 г/л к смыву клеток достигал $99,01\% \pm 0,4$ (таблица 1).

Таблица 1

Поглощение ионов металлов консорциумом клеток *Pseudomonas sp. 409TA* и *Candida sp. 410AT* в течение 10 минут

Исходная концентрация соли металла, г/л	Исходная концентрация соли металла, мг\10мл	Объем ЭДТА 0,05 моль/л пошедшего на титрование, мл	Количество сорбированного металла, г/л	Равновесная концентрация металла, г/л	Количество сорбированного металла, %
Сульфат меди, CuSO ₄					
0,1	1	0,6	0,089	0,011	88,75±2
0,5	5	2,2	0,459	0,041	91,75±1,9
0,9	9	3,1	0,842	0,058	93,54±1,7
2,5	25	6,55	2,377	0,123	95,09±1,5
4	40	2,92	3,945	0,055	98,62±1
7,5	75	3,25	7,439	0,061	99,19±1,3
Хлорид цинка, ZnCl ₂					
0,01	0,1	0,64	0,0099	0,0001	95,4±0,6
0,1	1	3,7	0,097	0,003	97±1
0,2	2	2	0,198	0,002	98,8±0,3
0,3	3	2,9	0,297	0,003	99,01±0,4

Полученные данные свидетельствуют о способности бактериальных и дрожжевых клеток к быстрой сорбции ионов меди и цинка из растворов. С увеличением концентрации ионов меди/цинка в среде в проверенном в эксперименте диапазоне процент сорбированного металла клетками бактерий *Pseudomonas sp. 409TA* и дрожжей *Candida sp. 410AT* возрастал. Совместное культивирование культур бактерий и дрожжей не уменьшало процента сорбции металлов из среды культивирования.

Далее в работе изучалась кинетика поглощения ионов тяжелых металлов клетками бактерий *Pseudomonas sp. 409TA* и дрожжей *Candida sp. 410AT*. Для этого к смыву культуры дрожжей, содержащему 60×10^2 клеток на мл. (соответствует оптической плотности 0,05) добавляли разные концентрации ионов меди и производили определение остаточного содержания ионов меди в растворе через заданные промежутки времени.

Изучение кинетики поглощения ионов меди, показало, что при концентрации ионов меди 0,25 г/л в среде извлекающая способность дрожжевых клеток в течение первых десяти минут, составляла $91\% \pm 0,4$; через 30 минут после контакта дрожжевые клетки поглощали $91\% \pm 0,35$, а через 24 часа $93,25\% \pm 0,52$. При добавлении более высоких концентраций ионов меди в среду, например, 7,5 г/л процент поглощения ионов через заданные интервалы времени 10 мин, 30 мин, 1 час, 24 часа составлял соответственно $98,81\% \pm 0,05$; $99,03\% \pm 0,05$; $98,93\% \pm 0,16$; $99,08\% \pm 0,12$.

Анализ результатов по кинетике сорбирования ионов цинка дрожжами показал, что: при добавлении ионов цинка в концентрации 0,01 г/л, клетки дрожжей сорбировали $87\% \pm 2,1$ в течении 20 минут, $92,6\% \pm 1,6$ в течении часа и $93,6\% \pm 1,9$ через сутки культивирования. При добавлении цинка в большей концентрации – 0,2 г/л процент сорбирования был несколько выше и составлял $96,23\% \pm 2$; $95,58\% \pm 1,7$; $98,375\% \pm 0,6$; $99,034\% \pm 0,7$ через 20, 30, 60 минут и через 24 часа соответственно.

Изучение кинетики извлечения ионов меди из среды культивирования культуры бактерий показало, что в первый час культивирования содержание металла в среде с клетками бактерий уменьшалось на $93,25\% \pm 1,6$, через сутки клетки бактерий извлекали из среды культивирования до $94,75\% \pm 1,4$ добавленных ионов меди (при концентрации внесенной меди 0,9 г/л). Увеличение концентрации внесенных ионов меди до 7,5 г/л вело к увеличению сорбирования их клетками бактерий. Так, в течение часа клетки сорбировали $99,2\% \pm 0,5$, а через сутки - $99,28\% \pm 0,3$. Увеличение времени контакта бактерий с медью практически не влияло на сорбирующую активность.

Сорбирующая способность бактерий при добавлении ионов цинка в концентрации 0,01 г/л через 20 мин составляла $81,6\% \pm 0,8$; через 30 минут - $83,2\% \pm 1,3$; через час - $91,04\% \pm 1,8$; через сутки - $99,8\% \pm 1,5$. После контакта бактерий с цинком в концентрации 0,3 г/л в среде культивирования оставалось $7,6\% \pm 0,5$; через 60 минут – $3,3\% \pm 1$, а через сутки оставалось $2,87\% \pm 1,1$ ионов цинка.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в системе клетки микроорганизмов - раствор соли металла уже в течение первого часа инкубирования достигается состояние равновесия.

В дальнейшем была проведена серия экспериментов по степени извлечения ионов меди и цинка живыми и мертвыми клетками бактерий и дрожжей. Время инкубации - 60 минут. Результаты опытов показали, что достоверной разницы в количестве извлеченного металла между живыми, прокипяченными и проавтоклавированными клетками дрожжей нет. Так, живые клетки при концентрации ионов меди 0,1 г/л в течение часа сорбировали $91,51\% \pm 0,1$; прокипяченные - $90,02\% \pm 1$; проавтоклавированные - $90,89 \pm 1,1$. При высокой концентрации ионов меди (7,5 г/л) живые, прокипяченные и автоклавированные клетки дрожжей сорбировали соответственно $98,88 \pm 0,4$; $98,05 \pm 1,2$; $97,67 \pm 1$.

Этот показатель характеризует клетки дрожжей *Candida sp. 410AT*, так же как и клетки бактерий *Pseudomonas sp. 409TA* как перспективные биосорбенты, способные в течение первых 10-30 минут контакта со средой, содержащей ионы меди или цинка в большом количестве поглощать их из среды (в пределах концентраций, изученных в приведенных экспериментах). Увеличение продолжительности контакта ионов тяжелых металлов с клетками бактерий *Pseudomonas sp. 409TA* и дрожжей *Candida sp. 410AT* не влияло на процент извлеченного металла.

Способность клеток дрожжей *Candida sp. 410AT* и бактерий *Pseudomonas sp. 409TA* сорбировать ионы данных металлов была высока, поскольку при увеличении концентрации ионов металлов в среде, в течение часа в равной степени усиливалась поглощающая способность как живых, так и убитых разными способами клеток этих микроорганизмов.

Эти данные свидетельствуют о том, что культуры данных изолятов можно в дальнейшем использовать для очистки сточных вод, а также создавать биопрепараты на их основе, для очистки вод и водоемов от загрязнения тяжелыми металлами.

1. Плешакова Е.В., Дубровская Е.В., Турковская О.В. Приемы стимуляции аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры // Биотехнология. - 2005, № 1. - С. 42-50.

2. Fosso-Kankeu E., Mulaba-Bafubandi A.F., Mamba B.B., Barnard T.G. Prediction of metal-adsorption behaviour in the remediation of water contamination using indigenous microorganisms // Journal of Environmental Management, 2011. – V. 92. - P. 2786-2794.

3. Силищев Н.Н. Микробиологические технологии в процессах ремедиации природных и техногенных объектов: Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. – Уфа, 2009. - 28 с.

4. Бакулин М.К., Кучеренко А.С., Алпашкин Р.И. Выделение и изучение прикладных свойств микроорганизмов-деструкторов // Мат. Всерос. научно-практической конференции «Наука-производство-технология-экология». – Киров, 2003. – Т. 3. – С. 78-79.

5. Барышникова Л.М., Грищенков В.Г., Аринбасаров М.У., Шкидченко А.Н., Боронин А.М. Биодegradация нефтепродуктов штаммами-деструкторами и их ассоциациями в жидкой среде // Прикладная биохимия и микробиология. 2001. - Т. 37, № 5. – С. 542-548.

6. Карпенюк Т.А., Гончарова А.В., Бектурова А.Ж., Баубекова А.С., Жубанова А.А. Идентификация организмов биоценоза активного ила очистных сооружений г.Алматы // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – Алматы, №4 (30), 2006, - С.86-90.

7. Карпенюк Т.А., Гончарова А.В., Бектурова А.Ж., Цуркан Я.С., Бражникова Е.В. Оценка углеводородокисляющего потенциала микроорганизмов активного ила очистных сооружений г. Алматы // Материалы международной научно-практ. конференции «Современные проблемы экологии и устойчивое развитие общества». Алматы, 2010, -С. 170-173.

8. Карпенюк Т.А., Гончарова А.В., Бражникова Е.В., Цуркан Я.С. Оценка физиолого-биохимического статуса микроорганизмов для создания препаратов по очистке почвенного покрова, природных и сточных вод от тяжелых металлов.// Проблемы биогеохимии и геохимической экологии. №1(12) -2010, -С. 5-7.

9. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Изд-во МГУ, 1991. - С. 59 – 75.

10. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: Изд-во МГУ, 1976. - С. 56 – 124.

11. Практикум по микробиологии / Под. ред. А.Н. Нетрусова. - М.: Academia, 2005. - С. 448- 597.

12. Салдадзе К.М., Копылова - Валова В. Д. Комплексообразующие иониты комплекситы. - М.: Химия, 1980. - 336 с.

13. Taoufik J., Zeroual Y., Moutaakkil F. Aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacteria (*Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*) in fluidized bed bioreactor // Ann. Microbiol. 2004. – V. 54, N 2. – P. 189-200.

14. Лапенко Л.А., Виленский М.Г. Метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии в фоновом мониторинге тяжелых металлов // Мониторинг фонового загрязнения природной среды. - Вып.3. - Л.: Гидрометеониздат, 1986. - С. 216-223.

15. Лейтес Е.А., Смагин В.П. и др. Практикум по аналитической химии: Учебное пособие. - Барнаул: Изд-во «Азбука», 2004. - 75 с.

16. Лакин Г.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1990. – 230 с.