

UOT 57

**S.Ə. Tağıyeva**  
AR ETN Mikrobiologiya İnstitutu  
safada.tagiyeva@yahoo.com

## **KÜR ÇAYI SUYUNDAN TƏCRİD OLUNMUŞ *BACILLUS POLYMYXA* BAKTERİAYASI ƏSASINDA BAKTERİOSİN SİNTEZİ**

**Açar sözlər:** *bakteriya, biosin, bakteriosin, Bacillus polymyxa, protein sintezi*

İyirmi birinci əsri “yaşıl” texnologiyalar əsri adlandırmaq olardı. Son illərdə yaşıl enerjiyə, yaşıl yanacağa, qeyri-plastik materiallara, təbii və ekoloji təmiz qida məhsullarına və qeyri-kimyəvi dərman preparatlarına üstünlük verilir. Probiotiklər və prebiotiklər, bitki mənşəli preparatlar və bakteriya mənşəli antibakterial maddələr - bakteriosinlər kimyəvi antibiotiklərlə müqayisə olunur və onları müəyyən hallarda əvəz edir. Bu maddələrin sintezi üçün yararlı olan bakteriyaların sayı çox məhdud olduğuna görə yeni prodüsent bakteriyaların aşkar olunması və onlardan yeni bakteriosinlərin əldə edilməsi böyük əhəmiyyət kəsb edir.

Müəllif tərəfindən Azərbaycanın Neftçala rayonunun Bankə kəndindən Kür çayının suyundan *Bacillus polymyxa* bakteriyasının yeni ştammi təcrid olunub və bu yeni izolyatdan antibakterial maddə əldə olunub. Yeni bakteriosinin molekulyar kütləsi və antibakterial təsirinin yoxlanılması, sintez prosesi və istifadə perspektivləri məqalədə öz əksini tapmışdır.

**C.A. Тагыева**

## **СИНТЕЗ БАКТЕРИОЦИНА ИЗ БАКТЕРИИ *BACILLUS POLYMYXA*, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ВОДЫ РЕКИ КУРА**

**Ключевые слова:** *бактерии, биоцин, бактериоцин, Bacillus polymyxa, синтез белка*

XXI век можно назвать веком «зеленых» технологий. В последние годы предпочтение отдается “зеленой” энергии, “зеленому” топливу, натуральным материалам, натуральным и экологически чистым продуктам питания, натуральным тканям и лекарственным препаратам не химического происхождения. Пробиотики и пребиотики, растительные препараты и антибактериальные вещества бактериального происхождения - бактериоцины сравнивают с химическими антибиотиками и, в некоторых случаях, заменяют их. Поскольку количество бактерий, пригодных для синтеза этих веществ, очень ограничено, большое значение имеет открытие новых продуцентов и получение из них новых бактериоцинов.

Новый штамм бактерии *Bacillus polymyxa* был выделен автором из воды реки Кура в селе Банке Нефтчалинского района Азербайджана и из этого нового изолята получено антибактериальное вещество. В статье отражены измерения молекулярной

массы и антибактериального действия нового бактериоцина, процесс его синтеза и перспективы использования.

*S.A. Taghiyeva*

## **SYNTHESIS OF BACTERIOCINE FROM BACTERIA *BACILLUS POLYMYXA* ISOLATED FROM WATER OF THE KUR RIVER**

**Keywords:** *bacteria, biocin, bacteriocin, Bacillus polymyxa, protein synthesis*

The twenty-first century could be called the era of "green" technologies. In recent years, preference has been given to green energy, green fuel, non-plastic materials, natural and environmentally friendly food products and non-chemical medicines. Probiotics and prebiotics, herbal preparations and antibacterial substances of bacterial origin - bacteriocins are compared with chemical antibiotics and replace them in certain cases. Since the number of bacteria suitable for the synthesis of these substances is very limited, it is of great importance to discover new producers and obtain new bacteriocins from them.

New strain *Bacillus polymyxa* bacterium was isolated from the water of Kura River in Banka village of Neftchala region of Azerbaijan by the author and antibacterial substance was obtained from this new isolate. Determination of the molecular mass and antibacterial effect of the new bacteriocin, synthesis process and prospects of application are reflected in the article.

### **Giriş**

Məlumdur ki, bəzi bioloji aktiv maddələrin mənbəyi bakteriyalardır. Fermentlər (polimeraza, lipaza, proteaza və proteinaza), vitaminlər (B6), turşular (sirkə turşusu) kimi maddələr - bakteriosinlər və digər bakterial hüceyrələrin məhsulları bakteriyalar əsasında biotexnoloji proseslər nəticəsində əldə olunur. Baxmayaraq ki, bakteriya növlərinin sayı təxminən otuz mindir, bioloji aktiv maddələrin sintezi üçün yararlı olan bakteriyaların sayı çox məhduddur. Yalnız üç yüz bakteriya növü bakteriosinlərin sintez mənbəyi olaraq prodüsent adını daşıyır. Prodüsent mikroorqanizmlər bir sıra tələblərə cavab verməlidir: onlar sürətlə çoxalmalıdır, insan və ətraf mühit üçün zişansız olmalıdır, ucuz və asan qida mühitlərində çoxalmalıdır, əlavə maddələr əmələ gətirməməlidir və s. Belə bakteriyaları aşkar etmək, onlardan bakteriosinləri əldə etmək müasir biotexnologiyanın vəzifələrindən biridir. Bu məqalədə Azərbaycanın Kür çayından təcrid olunan prodüsent bakteriya və onun əsasında bakteriosin sintezi təsvir edilmişdir.

### **Material və metodlar**

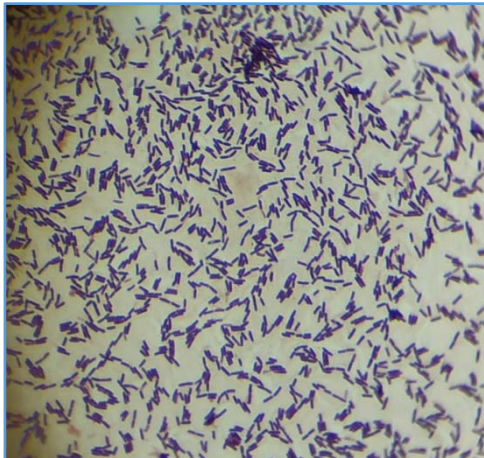
Kür çayı Azərbaycanın ən uzun çayıdır. Suyunu Türkiyənin buzlaqlarından alıb Gürcüstan ərazisindən axaraq, Azərbaycanın qərbindən şərginə keçir və Xəzər dənizinə tökülür. Neftçala rayonu bu çayın dənizə tökülən yeridir [6, s.3-

15]. Kür çayı Azərbaycanın əsas içməli su mənbəyi olaraq, əksər rayonların əhalisini içməli su ilə təmin edir, suvarma və təsərrüfat məqsədi ilə istifadə olunur. Kür çayının sakit axımı və yumşaq torpaqlardan ibarət dibi suyun torpaqdakı mikroorqanizmlərlə çirklənməsinə səbəb olur. Son bir neçə il ərzində Kür axımının ləngiməsi [13], onun dəniz suyu ilə qarışması və, təbii ki, tərkibindəki bakteriyalarla zənginləşməsi müşahidə olunur. “Kür suyunun səviyyəsinin azalması, onun axarının sürətinin azalmasına gətirib çıxarır ki, bu da öz növbəsində xüsusilə şimali-şərq küləyi gücləndiyi zaman dəniz suyunun çayın məcrasına daxil olmasına səbəb olur” [6]. Kür çayın biosenozunun heyvanları (sürünənlər, buğumayağlılar, amfibiyalar və balıqlar) bakteriyaların və digər mikroorqanizmlərin təbii rezervuarlarıdır. Eyni zamanda, kiçik və iri buynuzluların suya girməsi, içməsi, insanların çimməsi və digər insan və heyvanların, quşların Kür suyu ilə digər təmasları, çirkab suların küllü miqdarda Kürə axılması [3, s.97-104], [5, s.2-22], [8, s.8], əlbəttə ki, onun bakteriyalar və digər mikroorqanizmlərlə zənginləşdirir. Kür çayının suyunda dibindəki torpaqdan, lilin tərkibindən və digər səbəblərdən asılı olaraq, saprotroflar (sulfobakteriyalar, nitrifikasiya edici bakteriyalar, dəmir bakteriyalar) və bəzi şərti patogenlər mövcuddur [7, s.6-25]. Təbii ki, Kür suyunun bakteriya tərkibində, əsasən, *Escherichia coli* və digər coliformalar (*Enterobacter* və *Citrobacter*) çoxluq təşkil edir [14]. Lakin, digər bakteriyalara da rast gəlmək mümkündür. Məsələn, *Bacillus lincheformis*, *Bacillus polymyxa* və *Bacillus subtilis* suya torpaqdan qaldırılır [31, c.160-165].

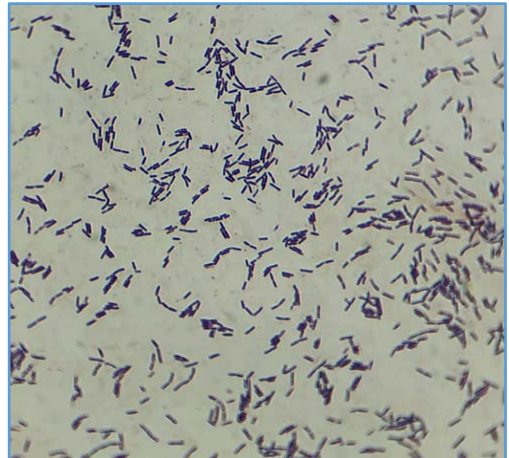
Yeni prodüsent bakteriyaların təcrid etmək üçün Bankə kəndində (coğrafiya koordinatları 39.408755 şimal enliyi, 49.255228 şərq uzunluğu) Kür qırağında 100 metr məsafə ilə üç su nümunəsi toplanılmışdır. Havanın temperaturu 27 °C, suyun temperaturu 19 °C olmuşdur. Bu su nümunələrin hərəsi bir nöqtədən, lakin müxtəlif dərinliklərdən yığılan nümunələrin qarışığı kimi hazırlanmışdır. O cümlədən, A nöqtədən 20 santimetr, 1 metr və 2 metr dərinlikdən steril şüşə qablarına yığılmış su nümunələri bir qabda toplanmış, maqnit qarışdırıcısı vasitəsilə qarışdırılmışdır. Eyni şəkildə B və C nöqtələrdən ikinci və üçüncü nümunə hazırlanmışdır. Nümunələrin əkilməsi məqsədi ilə nümunələr 1:100 steril distillə suyu ilə durulaşdırılmışdır. 0.5 ml durulaşdırılmış su nümunələri steril pipetlə Petri qabındakı aqarlar üzərinə əlavə olunub, şeykərdə yelləndirilmişdir və, beləliklə, suyun aqar üzərində yayılması əldə olunmuşdur. Su nümunələrin Beyin Ürək İnfuziyası aqarına (BHİ, Brain Heart Infusion Aqar), *Müller-Hinton*(MHA) aqarına və *Mac-Conkey* aqarına əkilməsi keçirilmişdir (**Şəkil 1**). 24 saat 37 °C inkubasiyadan sonra Petri qablarında bitmiş bakteriyalar təhlil olunmuşdur. İnkubasiyadan sonra, əsasən, çox saylı MHA və BHİ aqarlarda açıq boz, MCA isə çəhrayı rəngli koliformalar bitmişdir. Mikroskopiyaya zamanı uzun Qram müsbət çöpvarı bakteriyalar müşahidə olunmuşdur (Şəkil 2; 3). Nəticədə Kür suyunun nümunə №2 və nümunə №3 nümunələrindən *Bacillus* cinsli bakteriyaların saf



*Şəkil 1. Kür suyu nümunələrin əkilməsi*



*Şəkil 2. Kür suyunun Nümunə 2-dən təcrid olunmuş Bacillus cinsli bakteriyalar*



*Şəkil 3. Kür suyunun Nümunə 3-dən təcrid olunmuş Bacillus cinsli bakteriyalar*

kulturaları əldə edilmişdir. Bakteriyanın klassik üsullarla (hərətlik, katalaza, oksidaza, polisaxaridlərin fermentasiyası və bir sıra başqaları) identifikasiyası keçirilmişdir. 3 nümunənin ikisində (Nümunə №2 və Nümunə №3) bir-birinə identik *Bacillus* bakteriyaları aşkar olunmuşdur. Onların Qram müsbət, hərəkətsiz, katalaza müsbət, oksidaza mənfi, indol mənfi, ureaza mənfi və digər xüsusiyyətləri aşkar olunmuşdur. Yuxarıda göstərilən Kür suyundan təcrid

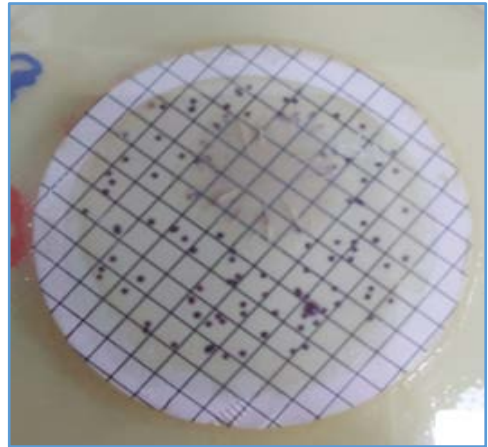
olunmuş bakteriyaların *Bacillus* cinsli olması manual metodlarla təstiqlənmişdir. Müvafiq testlər keçirilərkən bakteriyanın katalaza testində müsbət, oksidaza mənfi, indol mənfi, hərəkətsiz, eskulin hidrolizi və müvafiq polisaxaridlərin fermentasiyası zamanı turşuların əmələ gəlməsi, antibiotiklərə həssaslığı və digər testləri Kür suyundan təcrid olunmuş bakteriyaların *Bacillus subtilis* ya-da *Bacillus polymyxa* (*Paenibacillus* spp.) növünə aid olmasını təsdiqləmişdir.

Diferensial İdentifikasiya Hindistanın (Kerala) ABIS (Advanced Bacterial Identification System) sisteminin (Databaza) verdiyi tövsiyələrə uyğun olaraq keçirilmişdir. Digər *Bacillus*-larla eyni nəticələr verən testlərdən (katalaza, oksidaza, və s.) əlavə olaraq duzlu mühitdə bitmə qabiliyyəti yoxlanılmışdır və aşkar olunmuş bakteriyanın *Bacillus polymyxa* növünə ayırd olması təsdiqləmişdir.

Kür çayından izolə edilmiş *Bacillus polymyxa* aqarlar (MHA, BHIA) üzərində biotəbəqə yaratmışdır (Şəkil 4). Bu ağ-bozumtul qat aqarın üstünü tam olaraq örtmüşdür. Belə xüsusiyyət, əsasən, *Bacillus subtilis* və *Bacillus polymyxa* izolyatlarında müşahidə olunur [126]. Eyni koloniya Kür suyunun koli-titrini müəyyən etdikdə filtrin üzərində aşkar olunmuşdur. (Şəkil 5) Kür suyunda Coliform aqarda disk filtrləri ilə müəyyən edilmiş koloniyaların sayı 97, ümumi 1 ml koloniyaların sayı KƏV (Koloniya əmələ gətirən vahid) 970.000 olub (durulaşdırma 1:10000).



**Şəkil 4.** Kür çayından təcrid olunmuş *Bacillus polymyxa* bakteriyaların aqar üzərində biotəbəqə yaratması



**Şəkil 5.** Kür çayı suyunun koli-titri müəyyən etdiyi zaman disk üzərində *Bacillus polymyxa* koloniyası

Kür suyundan təcrid olunmuş təbii *Bacillus polymyxa* ştamminin antibakterial xüsusiyyətlərini öyrənmək üçün Qoyun Qan aqarı QQA və Ətli Peptonlu aqar ƏPA istifadə olunmuşdur. Bu ştamın Qram mənfi və Qram müsbət bakteriyalarla birlikdə Petri qasasının 2 yarım-dairəyə bölünərək aqarda yan-yana

əkilməmişdir - bir tərəfinə *Bacillus polymyxa* bakteriyası, digər tərəfinə isə digər bakteriya. Əkmə nəticələri təhlil edilmişdir və Kür çayından izolə olunmuş bakteriyaların digər bakteriyalarla antaqonizmi aşkar edilmişdir.

Petri kasalarında Ətli-peptonlu aqara və Qanlı Qan aqarına 5 Qram müsbət (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus aqalactia* ATCC 13813, *Enterococcus fecalis* ATCC 29212) və 5 Qram mənfi (*Escherichia coli* ATCC 15922, *Pseudomonos aerogenosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Shigella flexneri* ATCC 12022) ştammları ilə yan-yan əkilmişdir. Bakterioloji əkmənin nəticələri təhlil olunmuşdur və onlarda müəyyən antibakterial xüsusiyyətlər aşkar olunmuşdur. ***Bacillus polymyxa* Kür ştammbəzi Qram müsbət bakteriyaların inkişafını əngəlləmişdir. Xüsusilə də, *Escherichia coli* ATCC 15922, *Pseudomonos aerogenosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Shigella flexneri* ATCC 12022 nümayiş etmişdir. Qram mənfi bakteriyalardan *Pseudomonos aerogenosa* mənfi təsir aşkar olunmuşdur.**

Təcürbələr göstərdi ki, Kür çayının suyundan təcrid olunmuş təbii *Bacillus subtilis* ştammları yeni bakteriosinlərin sintezi üçün produsent şəklində istifadə oluna bilər.

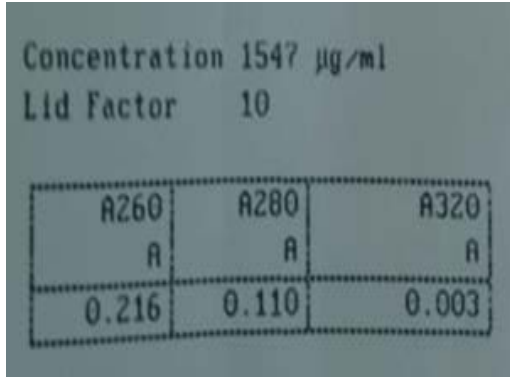
Kür suyundan təcrid olunmuş təbii *Bacillus polymyxa* ştammindən bakteriosin əldə edilmişdir. Bakterial suspenziya MacFarland standartı üzrə optik sıxlığı 3.0 qədər tənzimlənmişdir və rollerdə otaq temperaturunda (22<sup>0</sup> C) 18 saat yelləndirmək üçün yerləşdirilmişdir. Bioloji aktiv maddələrin bakterial hüceyrələrin üzərindən yuyulandan sonra suspenziyanı diri bakterial hüceyrələrdən azad etmək məqsədi ilə sınaq şüşələri 2300 RPM sürətlə bir saat ərzində otaq temperaturunda fırladıldı və sonra supernatant yığıldı. Supernatantın sterilliyi bakterioloji əkmə ilə təsdiqlənmişdir.

Kür suyundan təcrid olunmuş təbii *Bacillus polymyxa* bakteriyasından zülal çökdürmək üçün məhlula -5°C temperaturda yavaş-yavaş soyudulmuş aseton əlavə olunmuşdur. Zülal məhlulundan 100 ml yığılıb, üzərinə 40 ml aseton əlavə olunmuşdur. Sınaq borusu -5°C dondurucuya yerləşdirilmişdir və hər 5 dəqiqədən yoxlanılmışdır. 10 dəqiqədən sonra məhlulda çökmə prosesi başlayıb, 16 dəqiqə ərzində isə tam bitmişdir. Növbəti mərhələdə sınaq məhlulu 20.000 RCF sürətlənmə ilə sentrifüqadan keçirilib və protein çöküntüsü 20 ml həcmdə yığılıb -20°C dondurucuya qoyulmuşdur.

Sintez olunmuş və saflaşdırılmış zülal məhlullarının təmizliyi spektrofotometriya üsulu ilə *Eppendorf Biospectrometer* vasitəsilə yoxlanılmışdır. Protein təmizliyi göstəricisi 0.59 müəyyən olunmuşdur. Təmiz zülallar üçün optimal 260/280 nisbəti 0,6 sayılır, ona görə təmizliyi 0.59 tam məqsədə uyğun sayıla bilər. Ölçmələr nəticəsində zülal tərkibli məhlulun yetərinə təmiz olması müəyyən edilmişdir.

Kür suyundan izolə olunmuş bakteriosin məhlulu  $-20^{\circ}\text{C}$  soyuducuya yerləşdirilmişdir.

Kür suyundan izolə olunmuş yabarı *Bacillus polymyxa* ştamminından sintez edilmiş bakteriosin zülal məhlulun konsentrasiyası *NanoPhotometr* spektrofotometrində ölçülmüşür (Şəkil 6, 7). Kür suyundan təcrid olunmuş təbii *Bacillus polymyxa* ştamminından əldə olunmuş bakteriosinin konsentrasiyası 1547 nq/ml müəyyən edilmişdir.



Concentration 1547 µg/ml		
Lid Factor 10		
A260	A280	A320
A	A	A
0.216	0.110	0.003



Şəkil 6, 7. Kür suyundan təcrid olunmuş yabarı *Bacillus polymyxa* ştamminından əldə olunmuş bakteriosinin konsentrasiyasının və təmizliyinin spektrofotometrə ölçülməsi.

### Yekun

Beləliklə, ilk dəfə Kür çayının suyundan yeni produsent bakteriya *Bacillus polymyxa* təcrid olunmuş və onun əsasında yeni bakteriosin sintez edilmişdir. İstifadə olunmuş və müəlliflə hazırlanmış üsul asan və əlverişli olduğuna görə bu bakteriosinin sintezinin istehsalat miqyasına keçirilməsinə təklif olunur və digər yeni bakteriosinlərin sintez edilməsinə təkan verə biləcəkdir.

### ƏDƏBİYYAT

1. Aslanov, H., Məmmədova E. Azərbaycan ərazisində Kür çayının çirklənməsinə dair // - Bakı: Su problemləri: elm və texnologiyalar, - 2016. №3, s. 97-104.
2. Həsənov F. Azərbaycan Xəzər sektorunun Kür-Astara akvatoriyasında bioloji məhsuldarlığın tədqiqi: / biologiya üzrə fəlsəfə doktoru alimlik dərəcəsi almaq üçün təqdim olunan dis. avtoreferatı. / - Bakı, 2015. - 22 s.
3. Həsənov, S. Kür çayı: su səviyyəsinin azalması: [Elektron resurs] / Ekologiya portalı. - Bakı, 2020.

URL: <https://www.ecolifeinfo.az/kur-cayi-su-s%C9%99viyy%C9%99sinin-azalmasi-ekoloji-v%C9%99sosial-effektli%C9%99r/>

4. *Hüseynov, A.* Azərbaycanın su balansını təşkil edən əsas çaylar (icmal) // - Bakı: AMEA-nın Mikrobiologiya İnstitutunun elmi əsərləri, - 2017. № 2, s.6-25.
5. *İsayev, Ə.* Kür imdad diləyir // Azərbaycan. – 2009, 17 iyun. - s. 8.
6. *Məmmədov, M.* Azərbaycan hidroqrafiyası / M. Məmmədov. – Bakı: Bakı Dövlət Universiteti, - 2012. - 255 s.
7. *Rzayev, M.* Kür çayı 33 il sonra niyə Xəzərə çatmaya bilər: [Elektron resurs] / BBC News Azərbaycanda. – Bakı, - 2017.  
URL: <https://www.bbc.com/azeri/azerbaijan-39527834>
8. *Şirinov, O.* Kür və Araz çayının su keyfiyyətinin qiymətləndirilməsi: [Elektron resurs] / Azərbaycan Memarlıq və İnşaat Universiteti. - Bakı, 2020.  
URL: [https://www.academia.edu/43068566/K%C3%BCr\\_ve\\_Araz\\_%C3%A7ay%C4%B1n%C4%B1n\\_su\\_keyfiyyetinin\\_qiym%C9%99tl%C9%99ndirilm%C9%99si](https://www.academia.edu/43068566/K%C3%BCr_ve_Araz_%C3%A7ay%C4%B1n%C4%B1n_su_keyfiyyetinin_qiym%C9%99tl%C9%99ndirilm%C9%99si)
9. *Гайдаї, А.А.* Оценка Экологического состояния бассейна реки Бейсуг и предложения по улучшению его функционирования: /диссертация кандидата биологических наук / - Москва, - 2007. -180 с.
10. *Dykhuizen D.* Species number in bacteria// - California: Proc Calif Acad Scince, - 2005, - № 56 (6).
11. *Salme, T.* Paenicilllus polymyxa invades plant roots and forms biofilms: [Electronic resource] / Applied and environmental microbiology.–Washington, 2005. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1287669/>

Redaksiyaya daxil olub 24.10.2022