



UDK:631.8:632.9:579.64

Luiza TAGAEVA,

O‘zMU tayanch doktoranti

Moxichexra SHOXIDDINOVA,

O‘zMU o‘qituvchisi

Email: shoxiddinovamoxichehra@gmail.com

Behruz TOJIEV,

O‘zR FA Mikrobiologiya instituti tayanch doktoranti

Nilufar ELOVA,

O‘zR FA Mikrobiologiya instituti katta ilmiy xodimi, PhD

Qunduz NORMURODOVA,

O‘zMU Biologiya fakulteti Mikrobiologiya va biotexnologiya kafedrası prof.v.b., b.f.d

O‘zMU Biologiya fakulteti Genetika kafedrası mudiri, b.f.d., prof. S.Boboyev taqrizi asosida

DETERMINATION OF PROBIOTIC CHARACTERISTICS OF BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS - NUUZ 22 STRAIN ISOLATED FROM MEDICINAL PLANTS

Annotation

Growth on solid and liquid media, tolerance to acidic pH medium and bile, evaluation of enzymatic activities such as gelatinase, catalase, hemolytic, amylase, protease and lipase activities were studied and its safety as a feed additive of *Bacillus amyloliquefaciens* strain - NUUZ 22 isolated from the medicinal plant *Kalanchoe degremona* was investigated.

Key words: *Kalanchoe degremona*, bacterium, endophyte, probiotic, microorganism, isolate, *Bacillus amyloliquefaciens*, strain, gelatinase, catalase, hemolytic, amylase, protease, lipase, bile.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ШТАММА BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS - UZMU 22, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Аннотация

Были изучены рост на твердых и жидких средах, устойчивость к кислому pH среды и желчи, оценка ферментативной активности, такой как желатиназная, каталазная, гемолитическая, амилазная, протеазная и липазная и изучена его безопасность в качестве кормовой добавки штамма *Bacillus amyloliquefaciens* - УзМУ 22, выделенного из лекарственного растения *Kalanchoe degremona*.

Ключевые слова: *Kalanchoe degremona*, бактерия, эндофит, пробиотик, микроорганизм, изолят, *Bacillus amyloliquefaciens*, штамм, желатиназа, каталаза, гемолитическая, амилаза, протеаза, липаза, желчь.

DORIVOR O‘SIMLIKLARDAN AJRATILGAN BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS – O‘ZMU 22 SHTAMNING PROBIOTIK XUSUSIYATLARINI ANIQLASH

Аннотация

Kalanchoe degremona dorivor o‘simligidan ajratib olingan *Bacillus amyloliquefaciens* – O‘zMU 22 shtamning qattiq ozuqa va suyuq ozuqa muhitlarida o‘shishi, kislotali pH muhiti va safroga chidamliligi, jelatinaza, katalaza, gemolitik, amilaza, proteaza va lipaza kabi fermentativ faolligini baholash va ozuqa qo‘shimchalari sifatida xavfsizligi o‘rganildi.

Kalit so‘zlar: *Kalanchoe degremona*, bakteriya, endofit, probiotik, mikroorganizm, izolyat, *Bacillus amyloliquefaciens*, shtamm, jelatinaza, katalaza, gemolitik, amilaza, proteaza, lipaza, safro.

Kirish. Ma‘lumki, dorivor o‘simliklarda turli xil endofit mikroorganizmlar birga yashaydi. Adabiyotlarda keltirilgan tadqiqotlarga ko‘ra, endofit mikroorganizmlar asosan biologik faol birikmalar sintezlashi aniqlangan [1]. Ayniqsa, dorivor o‘simliklardan endofit bakteriyalarni ajratib olish va ularning biofaol ikkilamchi metabolitlar sintezlash qobiliyatlarini, qolaversa probiotik xususiyatlarini o‘rganish hamda ulardan chorva mollari va yosh jo‘jalarning ovqat hazm qilish tizimida normal mikroflorani ta‘minlash, probiotik bilan boyitilgan ozuqa tayyorlashda qo‘shimcha sifatida foydalanish borasida keng ko‘lamli izlanishlar olib borilmoqda [2-5].

Probiotiklar – tirik mikroorganizmlar asosida tayyorlangan preparatlar bo‘lib, ular odam yoki hayvonlar organizmiga kirganda ichak mikroflorasi tarkibini maqbullashtirish orqali xo‘jayin organizmidagi fiziologik, biokimyoviy va immun reaksiyalarga ijobiy ta‘sir ko‘rsatadi [2, 5]. Shundan kelib chiqqan holda, tibbiyot va veterinariya uchun yanada kengroq va faol antagonistik ta‘sirga ega biopreparatlarga talabning ortishi II avlod probiotiklari yaratilishiga sabab bo‘ldi. II avlod probiotiklari asosan *Bacillus*, *Clostridium* va *Brevibacillus* avlodlariga mansub spora hosil qiluvchi bakteriyalar asosida ishlab chiqiladi [6-7].

Ushbu tadqiqot maqsadi - chorva mollarining ichak mikroflorasi tarkibini maqbullashtirish maqsadida dorivor o‘simliklardan ajratilgan *Bacillus amyloliquefaciens* - UzMU 22 shtamning probiotik xususiyatlarini aniqlashdan iborat deb belgilandi.

Tadqiqotlar va usullar. Ushbu tadqiqotni bajarish uchun, dorivor o‘simliklardan ajratib olingan *B. amyloliquefaciens* - UzMU22 shtamning patogenlik omillari sifatida hosil bo‘ladigan fermentlar: lipaza, jelatinaza, katalaza hosil qilish va gemoliz faolligiga ega ekanligi va metabolizmida ishtirok etadigan (amilaza va proteaza) fermentlarni hosil qilish faolligi o‘rganildi.

Jelatinaza fermenti faolligini tekshirish uchun faollashtirilgan *B. amyloliquefaciens-1* va *B. amyloliquefaciens-2* shtammlar na‘munasi 15% jelatin tutuvchi ozuqa muhitiga ukol usulida ekilib, 24 soat 37°C termastatda inkubatsiya qilindi.

Lipaza fermenti faolligini tekshirishda foydalanilgan ozuqa muhiti tarkibi, g/l: Tvin 80-10 g, pepton-10 g, NaCl-5g, SaSl₂N₂O-1, agar – 18 g. Ozuqa muhiti Petri likopchalariga solinib, ustiga faollashtirilgan shtammlardan tomchi usulida ekildi va 2- 7 kun mobaynida hosil bo‘lgan zonalar o‘lchanadi.

Katalaza fermenti faolligini tekshirish uchun *B. amyloliquefaciens-1* va *B. amyloliquefaciens-2* shtammlar go‘sh peptonli qattiq ozuqa muhitida shtrix usulida ekilib, o‘shib chiqqan koloniyalardan buyum oynasiga surtma tayyorlandi va ustidan tarkibida 10% vodorod peroksidi eritmasidan foydalanildi.

Gemolitik faollikni tekshirishda *B. amyloliquefaciens-1* va *B. amyloliquefaciens-2* shtammlari GPA ozuqa muhitiga shtrix usulida ekilib, gemoglobinni o‘zlashtirishi ozuqa muhitida o‘shib chiqqan koloniyalar agarning rangini o‘zgartirishi asosida baholandi [5, 7].

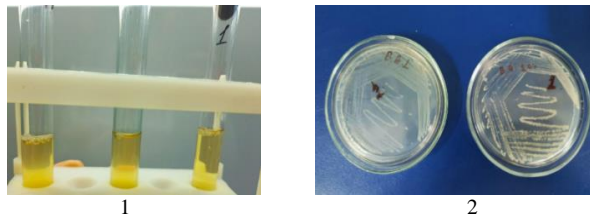
Amilaza fermenti faolligini tekshirish uchun foydalanilgan ozuqa muhiti tarkibi, g/l: pepton-10 g, kraxmal-2 g, KH_2PO_4 -5 g, agar- 18 g. Tayyor ozuqa muhitiga yangi faollashtirib olingan *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlari tomchi usulida ekildi va 2-10 kun davomida kuzatildi. 10 kundan keyin Lyugol eritmasi asosida hosil bo'lgan zonalar aniqlandi.

Proteaza fermenti faolligini tekshirishda 3% sut qo'shilgan ozuqa muhitidan foydalanildi, sterillangan ozuqa muhiti Petri likopchalariga quyildi va faollashtirilgan *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlari tomchi usulida ekildi. Inkubatsiya davri 2-10 kun davom ettirildi va trixlor uksus kislotasi quyildi, so'ngra zonalar tahlil qilindi [5, 7].

Ovqat hazm qilish yo'lining stress omillariga chidamliligini aniqlash uchun shtammlarining turli xil pH ko'rsatkichlari va safroga chidamliligi o'rganildi [5, 7].

Shtammlarning qoramol safrosi ta'siriga chidamliligini aniqlash uchun 0,1 gr pankreatin, 0,3 g qoramol safrosi, 0,5% NaCl (sterillangan), pH muhitini to'g'rilash uchun 0,1n HaON, tayyor aralashmani 0,22 nmli membranali filtdan o'tkazilgan aralashmasidan foydalanildi [5, 7].

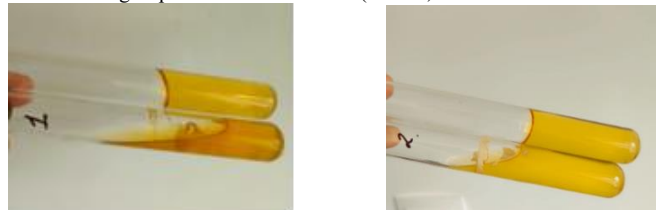
Olingan natijalar va ularning tahlili. *Bacillus amyloliquefaciens- UzMU 22* shtammining morfologik va fiziologik xususiyatlarini aniqlashda ushbu shtammning har xil ozuqa muhitlarida o'sishi va farqlarini o'rganish belgilandi. Suyuq ozuqa muhitida *B.amyloliquefaciens - UzMU 22* shtammi tajribada 1- shtamm, ya'ni *Bacillus amyloliquefaciens - UzMU 22* shtamm deb olingan. Bunda, 1-shtamm loyqalanish hosil qilmay o'sishi kuzatildi. Ushbu shtamm qattiq ozuqa muhitida chetlari tekis, ba'zi hollarda notekisroq, shaffofligi tiniq, gidroliz zona o'lchami 6-10 mm, yuza qismi zich va yaltiroq ko'rinishdagi tiniq sutrang yoki oq rangdagi koloniyalar hosil qiladi. O'sishi va rivolanishi esa, 10°Cdan 55°C harorat oraliklarida erkin o'sadi. Shu bilan birgalikda, MRS, MPB va TSE kabi ozuqa muhitlarida ham yaxshi o'sishi aniqlandi. *B.amyloliquefaciens - 2* shtammi, nafaqat qattiq ozuqa muhitida, balki suyuq ozuqa muhitida ham loyqalanish kuzatildi. *B.amyloliquefaciens -2* shtammi qattiq ozuqa muhitida chetlari notekis, lekin shaffofligi tiniq, gidroliz zona o'lchami 5-8 mm, yuza qismi yaltiroq ko'rinishdagi oq rangdagi koloniyalar hosil qiladi. O'sishi va rivolanishi esa, 10°Cdan 55°C harorat oraliklarida o'sishi aniqlandi (1-rasm).



1-Rasm. *B.amyloliquefaciens -1* va *B.amyloliquefaciens -2* shtammlarining qattiq ozuqa muhiti va suyuq ozuqa muhitlarida o'sishi

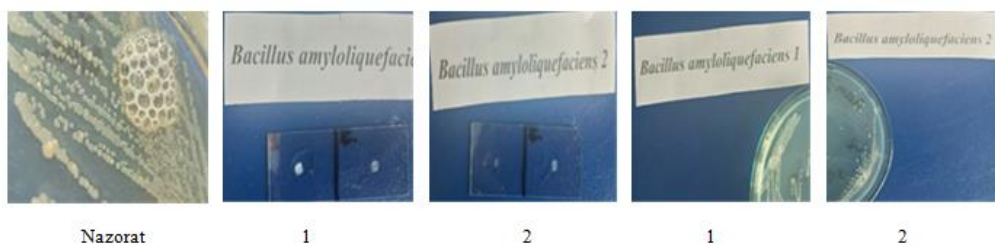
Navbatdagi tadqiqotimizda, *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlarining jelatinaza, katalaza, gemolitik, amilaza, proteaza va lipaza kabi fermentlarni sintezlash qobiliyatlari aniqlandi.

B.amyloliquefaciens-1 va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlar jelatinaza fermenti faolligini tekshirishda *B.amyloliquefaciens-1* shtammi jelatinaza fermentini ko'proq sintezlashi, ya'ni jelatinaza faolligi yuqori va ozuqaning pastki qismida bir oz loyqalanish kuzatildi. *B.amyloliquefaciens-2* shtammida esa jelatinaza faolligi past ekanligini ko'rish mumkin. Chunki ozuqa muhitining faqat yuqori qismida suyuq holatga o'tishi va ozuqaning tepasida kulturaning to'planib o'sishi kuzatildi (2-rasm).



2-Rasm. *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlarining jelatinaza fermenti faolliklari

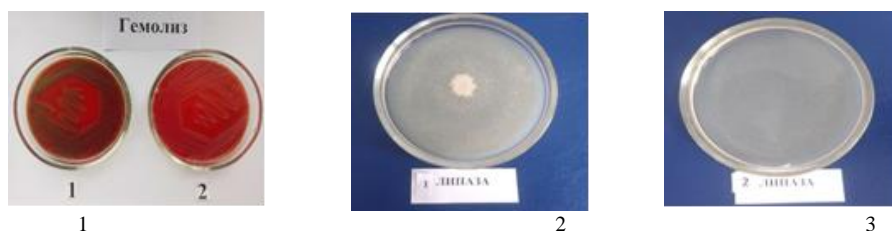
Katalaza fermenti faolligini tekshirish *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlarining o'sgan shtrixlari ustiga 10%li perekis eritmasidan 1 tomchi qo'yildi. *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlarning ikkalasida ham katalaza faolligi kuzatilmadi (3-rasm).



3-Rasm. *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlarining katalaza fermenti faolliklari

Gemolitik faollikni tekshirish uchun *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlari 5% GPA ozuqa muhitiga shtrix usulida ekildi. Gemoglobinni o'zlashtirishi ozuqa muhitida o'sib chiqqan koloniyalar agarning rangini o'zgartirishi asosida baholandi (4-rasm).

Lipaza fermenti faolligini tekshirish uchun esa, Petri likopchalariga Tvin 80-10gr., pepton-10gr., NaCl-5gr., $SaSi_2 \cdot N_2O$ -1gramdan iborat ozuqa muhitidan 20ml solinib, ustiga faollashtirilgan shtammlardan tomchi usulida ekildi va 2-7 kun moboynda hosil bo'lgan zonalar o'lchandi (5-rasm).



4-5-Rasmlar. *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlarining gemoliz (4-rasm, 1) va lipaza fermenti faolliklari (5-rasm, 2-3)

Olingan tadqiqot natijalari shuni ko'rsatdiki, *B.amyloliquefaciens-1* shtammida α -gemoliz kuzatilib, yashil rang pigmentini sintez qilishi kuzatildi. *B.amyloliquefaciens-2* shtammida esa gemoliz holati kuzatilmadi. *B.amyloliquefaciens-1* shtammni lipaza fermentini sintez qilish qobiliyatiga ko'ra esa, gidroliz zona o'lchami 35-40mmni tashkil etgan bo'lsa, *B.amyloliquefaciens-2* shtammida lipaza ozuqa muhitida o'sishi kuzatilmadi.

Navbatdagi tadqiqotimizda, *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlarining amilaza va proteaza fermentlari faolliklari kuzatildi. Bunda, Petri likopchalariga pepton-10gr, kraxmal-2gr, KH_2PO_4 -5gramdan iborat tayyor ozuqa qo'yildi va kaplya usulida ekildi va 2-10 kun davomida kuzatildi. 10kundan keyin 5ml lyugolning spirtidagi eritmasi asosida hosil bo'lgan zonalar aniqlandi (6-rasm).

Proteaza fermenti faolligini tekshirish uchun 3%li suvli agar va sutdan foydalanildi. Tayyor bo'lgan aralashmadan 20ml dan Petri likopchalariga quyildi va faollashtirilgan *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlari tomchi usulida ekildi. Inkubatsiya davri 2-10 kun davom ettirildi va 5% uchxlor uksus kislotasi qo'shib, hosil bo'lgan zonalar tahlil qilindi (7-rasm).

Olingan natijalardan ko'rinib turibdiki, *B.amyloliquefaciens-1* shtammida amilaza ferment faolligi bo'yicha gidroliz zona o'lchami 40mm dan 45mm gacha zona hosil qilishi aniqlandi. *B.amyloliquefaciens-2* shtammining amilaza fermenti faolligi kuzatilmadi.

B.amyloliquefaciens-1 shtammining proteaza fermentini sintez qilishi, ya'ni kazeinni parchalashiga ko'ra, gidroliz zona o'lchami 45-50mmni tashkil etgan bo'lsa, *B.amyloliquefaciens-2* shtammi esa ozuqa muhitida o'sishiga qaramasdan, kazeinni parchalashi kuzatilmadi.



6-7-Rasmlar. *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlarining amilaza (1-2) va proteaza fermenti faolliklari (3-4)

Navbatdagi tadqiqotimizda, *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlarining 0, 30, 60 va 90 daqiqa oralig'ida pH ko'rsatkichlariga chidamliligi o'rganildi (8-rasm).



8-Rasm. *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlarining (30, 60 va 90 daqiqa oralig'ida) pH -2 muhitiga chidamlilik ko'rsatkichlari

Tadqiqot natijasiga ko'ra, *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlari 30, 60 va 90 daqiqa oralig'ida pH -2 muhitiga chidamliligi kuzatilmadi.

Shtammlarning qoramol safrosi ta'siriga chidamliligini aniqlashga oid tadqiqotlarda *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlarining pH-8 muhitiga chidamliligi o'rganildi.

Tadqiqot natijasiga ko'ra, *B.amyloliquefaciens-1* shtammida qoramol safrosiga chidamlilik ko'rsatkichi 1soat ichida o'sish kuzatilgan bo'lsa, 2 soatda o'sishi kuzatilmadi. *B.amyloliquefaciens-2* shtammida esa umuman o'sish jarayoni aniqlanmadi (9-rasm).



9-Rasm. *B.amyloliquefaciens-1* va *B.amyloliquefaciens-2* shtammlarining qoramol safrosiga chidamlilik ko'rsatkichlari

Shunday qilib, Kalanxoe degremona dorivor o'simligidan yangi bakteriya izolyatlari ajratilib, uning probiotik xususiyatlari o'rganildi. Tanlab olingan faol shtammlarning qattiq va suyuq ozuqa muhitlarida o'sishi, jelatinaza, katalaza, gemolitik, amilaza, proteaza va lipaza kabi ferment sintezlash qobiliyatlari, kislotali pH muhiti va safga chidamliligi kabi parametrlari o'rganildi. *Bacillus amyloliquefaciens-1* shtammni jelatinaza, gemolitik, amilaza, proteaza va lipaza fermentlarini sintezlash qobiliyatlari, kislotali pH muhiti va safga chidamlilik xususiyatlarini inobatga olgan holda, chorva mollarining ichak mikroflorasi tarkibini maqbullashtirish uchun probiotik sifatida boyitilgan ozuqa tayyorlashda qo'shimcha mahsulot yoki probiotik xususiyatli mahalliy yangi shtamm sifatida foydalanishga tavsiya qilish mumkin.

ADABIYOTLAR

- Shoxiddinova M.N., Tojeyev B.B., Tojiyeva M.B. Search and isolation of endophytic bacteria from medicinal plants and determination of their morphological and cultural properties // Eurasian Journal of Research, Development and Innovation, 2021, 3, P. 23-25. (Impact Factor – 7.892).
- De Vrese M., Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics // Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. – 2008. – V. 111. – P. 1–66. – doi: 10.1007/10_2008_097.
- Patel R., DuPont H.L. New approaches for bacteriotherapy: Prebiotics, new generation probiotics, and synbiotics // Clin. Infect. Dis. – 2015. – V. 60, Suppl. 2. – P. S108–S121. – doi: 10.1093/cid/civ177.
- Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenço A., Gueimonde M., Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease // Mol. Nutr. Food Res. – 2017. – V. 61, No 1. – doi: 10.1002/mnfr.201600240.
- Poxilenko V.D., Pereilygin V.V. Probiotiki na osnove sporeobrazuyuyux bakteriy i ix bezopasnost // Ximicheskaya i biologicheskaya bezopasnost. – 2007. – № 2–3. – S. 20–41.
- Hong H.A., Ducle L.H., Cutting S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiol. Rev., 2005, vol. 29, no. 4, pp. 813–835. doi: 10.1016/j.femsre.2004.12.001.
- Morozova M.A., Gorovtsov A.V., Prazdnova E.V., Basankina V.M., Chistyakov V.A., Pepoyan A., Miralimova Sh., Grigoryev V.A. Bacteria of genus *Bacillus* as antagonists of pathogens in aquaculture. Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry. 2023. N. 1. RR 89 – 97.