



UDK 579.25:663.12

Rokhila JO'RAEVA,

O'zR FA Mikrobiologiya instituti katta ilmiy xodimi, b.f.n

E-mail: rokhilajuraeva@gmail.com

Dildora NIZOMOVA,

O'zR FA Mikrobiologiya instituti tayanch doktoranti

Muxlisa MATIRZAYEVA,

O'zbekiston Milliy universiteti magistranti

Sunnat ABDUNABIYEV,

Samarqand davlat universiteti magistranti

PhD E.Baymurzaev taqrizi asosida

TO'PLAMDA UZOQ MUDDATDA SAQLANAYOTGAN ACHITQI KULTURALARINING O'ZGARUVCHILIGI VA BARQARORLIGI

Аннотация

Ushbu maqolada Mikrobiologiya instituti mikroorganizmlar to'plamida turli usullar bilan saqlanayotgan *Candida* va *Wickerhamomyces* avlodiga mansub achitqilarini hayotchanligi va barqarorligi o'rganilgan. O'rganilayotgan achitqi kulturalari uzoq muddatli saqlashdan keyin ham turli darajada o'z faolligini saqlab qolgan. Barcha saqlash usullaridan *Candida* va *Wickerhamomyces* avlodiga mansub achitqilar uchun eng yaxshisi usul davriy qayta ekish hamda liofil quritilgan usullida kuzatilgan. Ushbu saqlash usullarida yuqori hayotchanlikni ko'rsatdi hamda mineral moyi ostida saqlash achitqilar faolligi pasayishi aniqlandi. Ammo, mineral moyi ostida uzoq muddatli saqlashdan so'ng, hujayralar shaklini tiklash uchun 2-3 marta qayta ekishni amalga oshirilishi kulturalar morfologik va kultural xususiyatlarini to'liq tiklashi aniqlangan.

Kalit so'zlar: to'plam, saqlash usullari, achitqilar faolligi, hayotchanligi.

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ И ИЗМЕНЧИВОСТИ ДРОЖЖЕЙ КОЛЛЕКЦИОННОГО ФОНДА В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

Аннотация

Представлены результаты оценки жизнеспособности и стабильности дрожжей *Candida* и *Wickerhamomyces*, хранящихся различными методами в коллекционном фонде Института микробиологии АН РУз. Все исследованные штаммы сохранили активность после длительного хранения. Наиболее эффективными для культур *Candida* и *Wickerhamomyces* оказались регулярный пересев и хранение в лиофильно высушенном состоянии — именно эти методы обеспечивали высокую жизнеспособность и стабильность морфолого-культуральных признаков. При хранении под минеральным маслом отмечается снижение физиологической активности клеток и частичная вариабельность морфологических признаков. Проведение 2 - 3 последовательных пассажей полностью восстанавливает морфологию, размеры клеток и культуральные свойства дрожжей. Полученные данные подтверждают, что для штаммов *Candida* и *Wickerhamomyces* наиболее надёжными методами долговременной консервации являются регулярный пересев и лиофильное высушивание, обеспечивающие стабильность культуральных и морфологических характеристик. Хранение под минеральным маслом может использоваться как вспомогательный метод, однако перед практическим применением таких культур необходим этап регенерации.

Ключевые слова: коллекция, методы хранения, активность дрожжи, жизнеспособность.

EVALUATION OF STABILITY AND VARIABILITY OF COLLECTION YEAST FUND UNDER LONG-TERM STORAGE CONDITIONS

Annotation

The results of the assessment of the viability and stability of *Candida* and *Wickerhamomyces* yeasts stored by various methods in the collection fund of the Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan are presented. All studied strains retained activity after long-term storage. Regular subculture and freeze-dried storage proved to be the most effective for *Candida* and *Wickerhamomyces* cultures - these methods ensured high viability and stability of morphological and cultural characteristics. When stored under mineral oil, a decrease in physiological cell activity and partial variability in morphological characteristics are observed. Two to three consecutive passages completely restore the morphology, cell size, and cultural properties of the yeast. The data obtained confirm that regular subculture and freeze-drying are the most reliable methods for long-term preservation of *Candida* and *Wickerhamomyces* strains, ensuring the stability of their cultural and morphological characteristics. Storage under mineral oil can be used as an auxiliary method; however, a regeneration step is necessary before practical use of such cultures.

Keywords: collection, storage methods, yeast activity, viability.

Kirish. To'plamlarda mikroorganizmlar kulturalarini saqlashning asosiy maqsadi hayotchanligini saqlash, taksonomik jihatdan muhim xususiyatlarining barqarorligini va ilmiy-amaliy qiziqish uyg'otadigan iqtisodiy jihatdan foydali xususiyatlarini saqlash hisoblanadi. Laboratoriya va sanoat sharoitlarida foydali xususiyatlarini saqlab qolishdan tashqari, uzoq muddatli saqlash

paytida shtammlarning hayotchanligini ta'minlash ham zarur [1,2]. Achitqilar oziq-ovqat va kimyo sanoatida, tibbiyot va qishloq xo'jaligida keng qo'llaniladi [3]. Shuning uchun achitqi kulturalarini to'plamda hayotchanligini saqlab qolishi muhim vazifalardan biridir. Ta'kidlash joizki, so'nggi yillarda ko'p miqdordagi mikroorganizmlarni uzoq muddatli saqlash, ularning hayotchanligini, genetik va fenotipik barqarorligini ta'minlash uchun samarali usullar ishlab chiqilgan [4,5]. So'nggi yillarda mikroorganizmlarni kolleksiyalarda saqlash asosan liofilizatsiya, kriokonservatsiya va past haroratda muzlatish usullaridan foydalanadi [6]. Achitqi turlarining biologik xususiyatlarining farqi tufayli, turli xil achitqi kulturalari uchun bitta umumiy saqlash usulini qo'llash mumkin emas. Shu sababli, mikroorganizmlar to'plam fondida uzoq muddatli saqlash usullarida achitqi kulturalarning hayotchanligi, biokimyoviy xususiyatlarini aniqlash muhim ahamiyatga ega.

Mavzuga oid adabiyotlarning tahlili. *Candida* turkumiga mansub achitqilarning shartli patogen holatiga qaramay, ulardan qimmatli fermentlar, organik kislotalar (masalan, limon kislotasi), vitaminlar, oziq-ovqat qo'shimchalari (ksilitol, oqsillar) ishlab chiqarilishi, shuningdek, fermentatsiya qilish va turli sharoitlarga moslashish qobiliyati tufayli neftni tozalash uchun bioremediatsiyada hamda genetik tadqiqotlarda model organizmlar sifatida ishlatilishi bilan muhim biotexnologik potentsialga ega [7,8].

Wickerhamomyces turkumiga mansub achitqilar esa ko'pincha hasharotlar va o'simliklar bilan tabiiy ravishda bog'liq bo'lib, biotexnologiya uchun qiziqarli bo'lgan bir qator xususiyatlarga ega, masalan, uchuvchan organik kislotalar, aldegidlar va ketonlarni ishlab chiqarishi hamda bu turkumdagi ko'plab shtammlar yuqori fungitsid va antibakterial faolligni namoyon etishi aniqlangan. Shuningdek, ularning ba'zilar ozuqa oqsili ishlab chiqarishda, ba'zilar esa qishloq xo'jaligi mahsulotlarini saqlashda biokontrol agentlari sifatida foydalaniladi [9].

So'nggi yillarda genetik muhandislik usullaridan foydalangan holda beta-glyukanaza [10], fitaza [11], ksilanaza [12] va mannanaza [13] kabi ozuqa fermentlarini ishlab chiqarishi bir qator achitqilarda amalga oshirilgan.

Tadqiqot ob'ekti. O'zR FA Mikrobiologiya instituti "Mikroorganizmlar namunalari to'plamida" uzoq muddatda saqlanayotgan *Candida* va *Wickerhamomyces* avlodiga mansub achitqilari hisoblanadi.

Tadqiqot metodologiyasi. Tadqiqotlar davomida 10-15 yildan davomida +4°C haroratda qayta ekish, mineral moyi ostida, liofil quritilgan usullarida saqlanayotgan *Candida tropicalis* 81, *Candida mycoderma* 85, *Wickerhamomyces anomalus* 90, *Wickerhamomyces anomalus* 93, *Candida melinii* 94, *Candida krusei* 99 shtammlarida tajribalar olib borildi.

Achitqilarni uzoq muddatda mineral moyi ostida, liofil quritilgan usulda (10-15 yildan so'ng) saqlanganda ularning hayotchanligi, hujayra miqdori va ayrim fiziologik xususiyatlari o'rganildi. *Candida* va *Wickerhamomyces* kulturalari mineral moydan tozalandi va 10⁴-10⁷ hujayra hisobida susyutirilib Sabura va susla-agar (7° Balling) ozuqa muhitlariga ekildi. Kulturalarning koloniyalar miqdori 28°C da 48°C soat davomida o'stirildi va hisoblandi. Achitqilarning yashovchanligini tirik va o'lik hujayralarning miqdori oddiy va tezkor usullardan foydalanildi [14]. Suyuq ozuqa muhitida rivojlangan achitqi hujayralarining umumiy miqdorini Goryaev kamerasi yordamida mikroskopda hamda parallel agarli ozuqa muhitlarida ekib aniqlandi. O'lik hujayralarning miqdorini an'anaviy usulda metilen ko'kning maxsus tayyorlangan eritmasi yordamida o'rganildi.

Hujayra morfologiyasi (hujayralarning shakli, kattaligi, vegetativ bo'linishi) CX21 FS1 (Xitoy) yorug'lik mikroskopi yordamida kuzatildi. Koloniyalarning morfotiplarini aniqlashda shakli, rangi, yuzasi, profili, chekkasi, tuzilishi asosiy mezonni hisoblandi. Turli xil uglevodlarni fermentatsiya qilish qobiliyatini aniqlash uchun uglevodlar qo'shilgan suyuq ozuqa muhitida aniqlandi.

Natijalar va uning muhokamasi. O'zR FA Mikrobiologiya instituti mikroorganizmlar to'plamida turli xil mevalar, rezavorlardan hamda boshqa substratlardan ajratib olingan 200 dan ortiq achitqi shtammlari davriy qayta ekish, mineral moyi ostida va liofil quritilgan usulda saqlanadi. Tadqiqotlar davomida *Candida* va *Wickerhamomyces* avlodlariga mansub achitqilarni 10-15 yil davomida mineral moyi ostida va liofil quritilgan saqlash usulida ularning hayotchanligi va fiziologik xususiyatlari aniqlandi (1-jadval).

1-jadval

Saqlash usullarida achitqi kulturalarining hayotchanligi

| Achitqi kulturalari | Saqlash usullari | | |
|------------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| | Davriy qayta ekish | Mineral moyi ostida | Liofil quritilgan usulda |
| <i>Candida tropicalis</i> 81 | +++ | ++ | ++ |
| <i>Candida mycoderma</i> 85 | +++ | ++ | +++ |
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i> 90 | +++ | ++ | +++ |
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i> 93 | +++ | + | +++ |
| <i>Candida melinii</i> 94 | +++ | ++ | ++ |
| <i>Candida krusei</i> 99 | +++ | ++ | +++ |

Izoh: +++ yaxshi o'sish, ++ o'rtacha o'sish, + zaif o'sish

Olingan natijalarga ko'ra o'rganilayotgan achitqi shtammlariga saqlash usullari turlicha hayotchanligini saqlab qolganligi, morfologik va kultural xususiyatlari o'zgartirilmaganligi aniqlandi. Mineral moyi ostida uzoq muddatli saqlashdan so'ng, hujayralar shaklini tiklash uchun 2-3 marta qayta ekishni amalga oshirish kerak, shundan so'ng, shtammlar morfologik va kultural xususiyatlarini to'liq tiklaydi.

Bundan tashqari, *Candida tropicalis* 81, *Candida mycoderma* 87, *Candida mycoderma* 89, *Wickerhamomyces anomalus* 93 achitqi shtammlari eng yaxshi o'sish sur'ati va yuqori darajada biomassa to'planishi bilan o'rganildi. *Candida tropicalis* 81 shtammi 4 soat ichida hujayra titri 6x10⁶ KHQB, *Wickerhamomyces anomalus* 93 7x10⁶, o'sish davomida *Candida melinii* 94 5x10⁵-3x10⁷ va *Candida krusei* 99 mos ravishda 6x10⁷ - 9x10⁷ KHQB da yetganligi kuzatildi (2-jadval).

2-jadval

Mineral moyi ostida uzoq muddatli saqlashdan keyin achitqilarning hujayra titri

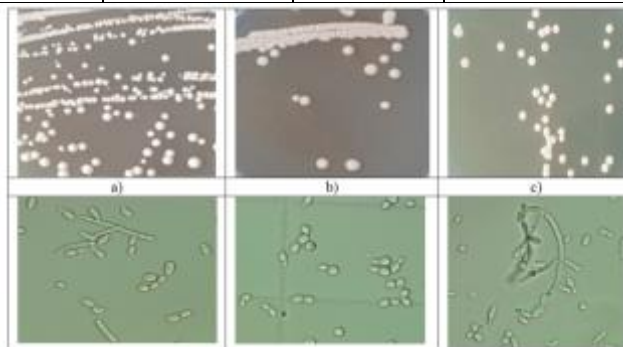
| Achitqi kulturalari | Vaqt, s. | | |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | 4 | 8 | 24 |
| <i>Candida tropicalis</i> 81 | 4x10 ⁴ | 7x10 ⁵ | 5x10 ⁵ |
| <i>Candida mycoderma</i> 85 | 6x10 ⁵ | 5x10 ⁷ | 9x10 ⁷ |
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i> 90 | 5x10 ⁶ | 3x10 ⁷ | 6x10 ⁷ |
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i> 93 | 7x10 ⁶ | 9x10 ⁷ | 11x10 ⁷ |
| <i>Candida melinii</i> 94 | 5x10 ⁵ | 8x10 ⁶ | 3x10 ⁷ |
| <i>Candida krusei</i> 99 | 6x10 ⁷ | 8x10 ⁷ | 9x10 ⁷ |

Candida mycoderma 85 shtammida koloniyalari burishgan, oq sariq rangda. Sabura ozuqa muhitida *Mycocandida* kabi shoxchalar shaklida psevdomitseliy hosil qiladi. *Wickerhamomyces anomalus* 93 achitqi shtamm sabura qattiq ozuqa muhitida silliq kremsimon yoki oq rangli koloniyalarni hosil qiladi, psevdomitseliy hosil qilishi kuzatildi. *Candida melinii* 94 agarli ozuqa muhitda koloniyalari oq rangda va bir oz burishgan shaklda, chetlari bir tekis. *Mycotoruloides* kabi psevdomitseliy hosil qilishi aniqlandi. *Candida krusei* 99 shtammi Sabura ozuqa muhitida koloniyalari bir oz burishgan, oq sariq rangda, chetlari to'liqinsimon. *Mycotoruloides* kabi psevdomitseliy hosil qilishi kuzatildi (3-jadval).

3-jadval

Mineral moyi ostida uzoq muddatli saqlashdan keyin o'rganilayotgan achitqilarning ho'jayra tuzilishi

| Ozuqa muhittari | O'lchami | Profil shakli | Yuza qismi | Rangi | Koloniya chetlari |
|-----------------|--------------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------------|
| Sabura agar | O'rtacha 3-4 mm | Yumaloq, qavariq | Yaltiroq | Oq silliq | Chetlari notekis |
| Susla agar | O'rtacha 3-4 mm | Yumaloq, qavariq | Yaltiroq, nursiz | Oq silliq, moysimon | Chetlari bir tekis |
| YEPD | Yirik 5 mm | Yumaloq, konussimon | Yaltiroq nursiz | Oq silliq, moysimon | Chetlari to'liqinsimon |



Rasm.1. Achitqi kulturalarining qattiq ozuqa muhitda koloniyalar hosil qilishi va hujayralar tuzilishi (kattalashtirish ko'rsatkichi x400)

a) *Candida mycoderma* 85; b) *Wickerhamomyces anomalus* 93; c) *Candida melinii* 94.

Shuningdek, o'rganilayotgan kulturalar asosan glyukoza, saxaroza va galaktozani o'zlashtiradi va spirtlardan etil spirti, glitserin, mannit va sorbitni assimilyatsiya qilishi kuzatildi. Tadqiqot natijalari shuni ko'rsatadiki, foydalanilgan barcha usullar achitqi kulturalarini barqaror, hayotchanligini saqlashi aniqlandi.

To'plam fondida +4°C haroratda turli usullar, jumladan, qayta ekish, mineral moyi ostida, liofil quritilgan usullarida saqlanayotgan achitqi kulturalari biologik funktsiyalarini tiklash qobiliyatiga egaligi aniqlandi. Achitqi kulturalarining morfologik-kultural, fiziologik-biokimyoviy ko'rsatkichlarining saqlanishi, hayotchanligi, barqarorligi aniqlandi, bu ularning nazariy amaliy qo'llanilishi va ilmiy tadqiqotlarda, qishloq xo'jaligi, sanoat va tibbiyotda qo'llanilishi mumkinligini ko'rsatadi.

ADABIYOTLAR

- Poхиленко В. Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2009. № 4 (12). С. 99–121.
- Абдулгамидова, С.М. Сравнительная эффективность различных методов длительного хранения дрожжей рода *Candida* // Вестник Харьковского Национального Университета, №828. Серия: Биология. 2008. В.8. С.132-136.
- Rekha, K.S.M., Lakshmi, C.M.V., Sri Devi, V., Kumar, S.M., 2012. Production and optimization of lipase from *Candida rugosa* using groundnut oilcake under solid state fermentation. Int. J. Eng. Res. Appl. 1 (4), 571e577.
- Куплетская М.Б., Аркадьева З.А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ // Микробиология. 1997. Т. 66. № 2. С. 283-288.
- Абдулгамидова С.М. Хранение коллекционных дрожжевых культур под вазелиновым маслом // Труды Института Микробиологии НАН Азербайджана. Баку: Элм, 2007, т.5, С. 110-117.
- Espinell-Ingroff A. Long-Term Preservation of Fungal Isolates in Commercially Prepared Cryogenic Microbank Vials // J. of Clinical Microbiology. – 2004. –Vol. 42. – №3. – P. 1257–1259.
- Antonucci, S., Bravi, M., Bubbico, R., Michele, A.D., Verdone, N., 2001. Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. Enzyme Microb. Technol. 28, 189e195.
- Olempska-Beer Z.S., Merker R.I., Ditto M.D., DiNovi M.J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - a review. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2006, 45(2): 144-158 (doi: 10.1016/j.yrtph.2006.05.001).
- <https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov/cat3/>.
- Козлов Д.Г., Чеперегин С.Э., Малышева А.В., Санникова Е.П., Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Калинина А.Н., Агранович А.М., Федоров А.С., Синеокий С.П. Рекомбинантный штамм дрожжей *Komagataella kurtzmanii* – продуцент бета-глюкоказы. Патент RU 2701640C1, 19.12.1918, опубл. 30.09.2019, бюл. № 28.
- Гордеева Т.Л., Борщевская Л.Н., Калинина А.Н., Синеокий С.П., Воронин С.П., Каширская М.Д., Агранович А.М. Рекомбинантный штамм дрожжей *Pichia pastoris* – продуцент фитазы. Патент RU 2701498C1, 24.12.1918, опубл. 26.09.2019, бюл. № 27.
- Калинина А.Н., Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Агранович А.М., Синеокий С.П. Рекомбинантный штамм дрожжей *Pichia pastoris* – продуцент ксиланазы. Патент Ru 2701308C1. 19.12.1918, опубл. 25.09.2019, бюл. № 27.
- Таругина М.Г., Лазарева М.Н., Лаптева А.П., Коробов В.С., Федоров А.С., Синеокий С.П. Рекомбинантный штамм дрожжей *Ogataea haglerorum*, продуцирующий бета-маннаназу *Bacillus subtilis*. Патент RU 2747782C1, 18.06.2020, опубл. 14.05.2021, бюл. № 14.
- Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.:КМК, 2004, 222 с.