



Dildora NIZOMOVA,

O'zR FA Mikrobiologiya instituti Stajyor-tadqiqotchisi

E-mail: nizomova9393@mail.ru

Rokhila JO'RAEVA,

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

E-mail: roxila-14@mail.ru

O'zR FA Genetika va o'simliklar eksperimental biologiyasi instituti yetakchi ilmiy xodimi, b.f.d. B. Adilov taqrizi asosida

CANDIDA AVLODIGA MANSUB ACHITQILARNI UZOQ MUDDATLI SAQLASHDA HAYOTCHANLIGI VA AYRIM FIZIOLOGIK XUSUSIYATLARI

Аннотация

Ushbu maqolada Mikroorganizmlar to'plamida vazelin moyi ostida uzoq muddatda saqlanayotgan *Candida* avlodiga mansub achitqi shtamlarining hayotchanligi va ayrim fiziologik xususiyatlari o'rganilgan. Tadqiqotlar natijasida achitqi shtamlari 10 yil davomida saqlanganda yuqori hayotchanligini saqlab qolganligi, morfologik va kul'tural xususiyatlari o'zgarmaganligi aniqlangan. O'rganilayotgan shtamlar asosan glyukoza, sahara va galaktozani o'zlashtirishi va spirtlardan etil spirti, glitserin, mannit va sorbitni assimilyatsiya qilishi aniqlangan. Shuningdek, mahalliy shtamlarni 5% va 10% NaCl ozuqa muhitlarida o'sishi kuzatilgan. Vazelin moyi ostida achitqi shtamlarini saqlash shuni ko'rsatdiki, bu usul to'plamda saqlanayotgan *Candida* avlodiga mansub achitqi shtamlariga +4 °C haroratda saqlash uchun mos keladi.

Kalit so'zlar: Achitqilar, *Candida*, hayotchanligi, uzoq muddatda saqlash.

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ДРОЖЖЕЙ РОДА CANDIDA

Аннотация

В данной статье изучена жизнеспособность и влияние на некоторые физиологические свойства в коллекции микроорганизмов штаммов дрожжей, относящихся к роду *Candida* при длительном хранении под вазелиновым маслом. В результате исследований установлено, что штаммы дрожжей сохраняли высокую жизнеспособность при хранении в течение 10 лет, а их морфологические и культуральные признаки не изменялись. Исследуемые штаммы в основном усваивают глюкозу, сахарозу и галактозу, а из спиртов усваивают этиловый спирт, глицерин, mannit и сорбит. Также наблюдался рост местных штаммов на питательных средах с 5% и 10% NaCl. Хранение штаммов дрожжей под вазелином маслом показало, что этот метод подходит для хранения штаммов дрожжей, принадлежащих к роду *Candida* при температуре +4 °C.

Ключевые слова: Дрожжи, *Candida*, выживаемость, длительное хранение.

VIABILITY AND SOME PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF LONG-TERM STORAGE OF YEAST OF THE GENUS CANDIDA

Abstract

In this article, the viability and influence on some physiological properties in the collection of microorganisms of yeast strains belonging to the genus *Candida* during long-term storage under mineral oil are studied. As a result of the research, it was found that yeast strains retained high viability during storage for 10 years, and their morphological and cultural characteristics did not change. The studied strains mainly assimilate glucose, sucrose and galactose, and ethyl alcohol, glycerin, mannitol and sorbitol are assimilated from alcohols. The growth of local strains on nutrient media with 5% and 10% NaCl was also observed. Storage of yeast strains under mineral oil has shown that this method is suitable for storing yeast strains belonging to the genus *Candida* at a temperature of +4 °C.

Keywords: Yeast, *Candida*, survival, long-term, storage.

Kirish. Ma'lumki, hozirgi kunda biotexnologik jihatdan faol va yuqori produsentga ega mikroorganizmlar sanoat va ishlab chiqarishda keng qo'llanilib kelinmoqda. Ko'p yillar davomida *Candida* avlodiga mansub achitqilaridan asosan oziq-ovqat, kosmetika ishlab chiqarishda ishlatiladigan etanol, limon kislotasi, lipolitik fermentlar, hujayradan tashqari polisaharidlar va biosurfaktanlarni olish uchun ham ishlatilishi aniqlangan [1]. Shuningdek, ishlab chiqarish uchun barqarorligi yuqori, faol shtamlar bilan doimiy ravishda ta'minlanishi muhim ahamiyatga ega. Ta'kidlash joizki, so'nggi yillarda ko'p miqdordagi mikroorganizmlarni uzoq muddatli saqlash, ularning hayotchanligini, genetik va fenotipik barqarorligini ta'minlash uchun juda ko'p samarali usullar ishlab chiqilgan [2-3].

Hozirgi vaqtda mikroorganizm kulturalarini saqlashning uchta usuli keng tarqalgan – bu davriy qayta ekish, mineral moyi ostida va liofil qurutilgan usulda saqlash [4]. Shuningdek, kamroq qo'llaniladigan usullardan kriogenli saqlash, adsorbentlarda saqlash, spora shaklida hamda distillangan suv yoki fiziologik eritmalarida saqlash usullari mavjud [5-6]. Achitqi turlarining biologik xususiyatlarining farqi tufayli, turli xil achitqi kulturalari uchun bitta umumiy saqlash usulini qo'llash mumkin emas. Shu sababli, mikroorganizmlar to'plam fondining xavfsizligini oshirish uchun uzoq muddatli saqlash usullarini aniqlash, ushbu usullar kulturalarning barqarorligi, biokimyoviy xususiyatlari va fiziologik darajasini saqlab turishiga ta'sirini o'rganish muxim ahamiyatga ega.

Mavzuga oid adabiyotlar tahlili. *Candida* avlodiga mansub achitqilar 20-asrning oxirlarida kelib aniqlangan, ularning taxminan 200 dan ortiq turi mavjud bo'lib aksariyati patogen emas [7]. Biotexnologik jihatdan limon kislotasini mikrobiologik usulda asosiy ishlab chiqaruvchi *Aspergillus niger* zamburug'i hisoblanadi. Biroq, *Candida* avlodiga mansub *C. tropicalis*, *C. oleophila*, *C. hitachinica*, *C. guilliermondii* va *Yarrowia lipolytica* (sin. *C. lipolytica*) achitqi shtamlari ham limon kislotasining mikrobiologik sintezida muqobil bo'lishi mumkin [8-9]. Ma'lumku, sanoatda *Saccharomyces cerevisiae* achitqi kulturasini etanolni fermentatsiya qilishi bo'yicha ko'pgina tadqiqotlar o'tkazilgan va adabiyotlarda keltirilgan, ammo bu turlar arabinoza yoki laktoza kabi uglevodlarni fermentatsiya qilish qobiliyatiga ega emas [10]. *Candida* avlodining ba'zi turlari ushbu uglevodlarni fermentatsiya qilishi adabiyotlarda keltirilgan masalan: *C. shehatae* [11], *C. pseudotropicalis* [12], *C. arabinofementans* va *C. kefir* [13]. *Candida* avlodining ushbu xususiyatlariga ko'ra etanol ishlab chiqarishda substratlarning kengroq spektridan, shu jumladan arzon chiqindilardan olingan xom-ashyolardan foydalanish mumkin bo'ladi. Lipolitik fermentlar sanoatning ko'plab sohalarida qo'llaniladi. *Candida* achitqilari lipolitik fermentlarini va ularning faolligini asosan sintez sharoitlari uglerod va azot asosli substratlardan foydalanishi va ularning xususiyatlari sababli sintezni tezlashtiradigan faollashtiruvchi moddalari mavjudligi bilan belgilanadi [14]. Shuningdek, *Candida* achitqilari boy fermentativ tizimi sababli uglerod va azot manbai bo'lgan ko'plab moddalarni, shu jumladan isrof qilingan turli xil xom ashyolarni o'zlashtira oladi.

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

Tadqiqot metodologiyasi. Tadqiqotlar davomida 10 yildan buyon 4°C haroratda vazelin moyi ostida saqlanayotgan quyidagi shtamlarda tajribalar olib borildi: *Candida tropicalis* 81, *Candida tropicalis* 83, *Candida mycoderma* 85, *Candida mycoderma* 87, *Candida mycoderma* 89, *Candida krusei* 99, *Candida melinii* 94.

Achitqilarni uzoq muddatda vazelin moyi ostida (10 yildan so'ng) saqlanganda ularning hayotchanligi, hujayra miqdori va ayrim fiziologik xususiyatlari aniqlandi. *Candida* shtamlari vazelin moyidan tozalandi va 10^4 - 10^6 hujayra hisobida suyultirilib Sabura va susla-agar (7° Balling) ozuqa muhitlariga ekildi. Kulturalarning koloniyalar miqdori 28°C da 48 soat davomida o'stirildi va hisoblandi. Achitqilarning yashovchanligini tirik va o'lik hujayralarni aniqlashning oddiy va tezkor usuli qo'llanildi [15]. 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 aniqlandi.

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 mezon hisoblandi. Turli xil uglevodlarni fermentatsiya qilish qobiliyatini aniqlash uchun an'anaviy usul bo'yicha uglevodlar qo'shilgan suyuq ozuqa muhitida aniqlandi. Achitqilarni galotolerantlik xususiyatlari Sabura oziqa muhitiga 5-10% NaCl qo'shish orqali kuzatildi.

Natijalar va uning muhokamasi. O'zR FA Mikrobiologiya instituti mikroorganizmlar to'plamida O'rta Osiyoda etishtiriladigan mevali va rezavor o'simliklardan ajratib olingan 150 dan ortiq achitqi shtamlari davriy qayta ekish, vazelin moyi ostida va lifofil qurutilgan usulda saqlanadi. Tadqiqotlar davomida *Candida* avlodiga mansub achitqilarni 10 yil davomida vazelin moyi ostida saqlash usulida ularning hayotchanligi va fiziologik xususiyatlari aniqlandi.

Olingan natijalarga ko'ra o'rganilayotgan achitqi shtamlari hayotchanligini saqlab qolganligi, morfologik va kul'tural xususiyatlari o'zgarmaganligi aniqlandi. Vazelin moyi ostida uzoq muddatli saqlashdan so'ng, hujayralar shaklini tiklash uchun 2-3 marta qayta ekishni amalga oshirish kerak, shundan so'ng, shtamlar morfologik va kul'tural xususiyatlarini to'liq tiklaydi.

Bundan tashqari, *Candida tropicalis* 83, *Candida mycoderma* 87, *Candida mycoderma* 89 achitqi shtamlari eng yaxshi o'sish sur'ati va yuqori darajada biomassa to'planishi bilan o'rganildi. *Candida tropicalis* 83 shtammi 4 soat ichida hujayra titri 6×10^6 KHQB, *Candida melinii* 94 va *Candida krusei* 99 mos ravishda 6×10^7 - 9×10^7 KHQB da yetganligi kuzatildi.

Candida shtamlarining morfologik xususiyatlari aniqlanganda barcha o'rganilgan shtamlarning hujayralari yumaloq, oval, silindrsimon shaklda uchrashi va ularning o'lchami (2,5-5,5 x 3,5-8,5) va (3,5-7x7-12) mkm da bo'lib, ko'p qirrali shoxchalarga ega hamda psevdomitseliy hosil qiladi. Psevdomitseliy, psevdogifa va blastosporalarga bo'linadi (1-jadval, 1-rasm).

1-jadval

Uzoq muddatli saqlashda achitqilarning morfologik xususiyatlari

№	Achitqi kulturalari	Koloniya tuzilishi	Hujayra tuzilishi
1	<i>Candida tropicalis</i> 81	Koloniyalari burishgan, oq sariq rangda uchradi. Agarli ozuqa muhitida <i>Candida</i> tipidagi zanjir shaklida psevdomitseliy hosil qiladi	Hujayra oval 5,6x8,5 mkm, ellipsoid shaklga ega
2	<i>Candida tropicalis</i> 83	Sabura ozuqa muhitida oq silliq, moysimon koloniyalar hosil bo'ldi. <i>Candida</i> tipidagi zanjir shaklida psevdomitseliy hosil qiladi	Hujayra yumaloq, oval, silindrsimon 5,2x6,0 mkm, ellipsoid shaklga ega
3	<i>Candida mycoderma</i> 85	Koloniyalari burishgan, oq sariq rangda. Sabura ozuqa muhitida <i>Mycocandida</i> kabi shoxchalar shaklida psevdomitseliy hosil qiladi	Ikki kunlik kulturaning hujayralari oval va cho'zilgan shaklida 2,5x5,5 mkm. Spora hosil qilmaydi asporogen
4	<i>Candida mycoderma</i> 87	Sabura ozuqa muhitida burishgan, oq sariq rangda koloniya uchradi. <i>Mycocandida</i> kabi shoxcha shaklida psevdomitseliy hosil qiladi	Hujayra oval yoki uzun silindrsimon shaklda, o'lchamlari 4-6x2-5 mkm. Spora hosil qilmaydi asporogen
5	<i>Candida mycoderma</i> 89	Agarli ozuqa muhitida bir oz burishgan, oq sariq rangda koloniya hosil qildi. <i>Mycocandida</i> kabi shoxchalar shaklida psevdomitseliy hosil qiladi	Ikki kunlik kulturaning hujayralari oval va cho'zilgan 1,5x2,5 mkm. Spora hosil qilmaydi asporogen
6	<i>Candida melinii</i> 94	Agarli ozuqa muhitida koloniyalari oq rangda va bir oz burishgan shaklda, chetlari bir tekis. <i>Mycotoruloides</i> kabi psevdomitseliy hosil qiladi	Hujayra yumaloq, oval shaklda, o'lchami 3,5-8,5 mkm
7	<i>Candida krusei</i> 99	Sabura ozuqa muhitida koloniyalari bir oz burishgan, oq sariq rangda, chetlari to'liqsimon. <i>Mycotoruloides</i> kabi psevdomitseliy hosil qiladi	Ikki kunlik kulturaning hujayralari oval va cho'zinchoq shaklda 3,5x7,5 mkm

O'rganilayotgan shtamlar asosan glyukoza, saharoza va galaktozani o'zlashtiradi va spirtlardan etil spirti, glitserin, mannit va sorbitni assimilyatsiya qilishi aniqlandi. *Candida krusei* 99 shtammi glyukoza va mal'tozani yaxshi o'zlashtirdi va boshqa uglerod manbalarini oksidlanish orqali o'zlashtirdi (2-jadval).

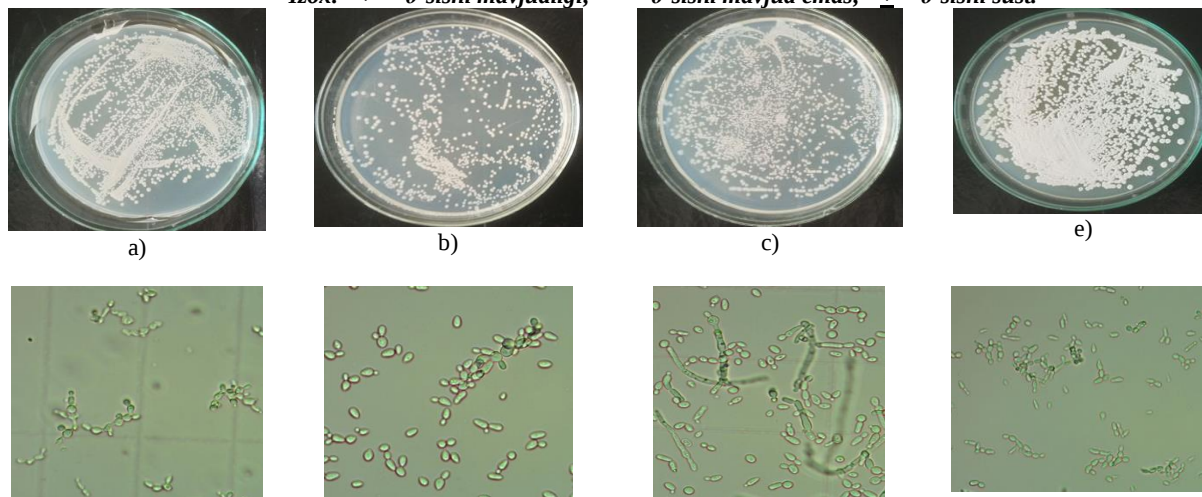
2-jadval

***Candida* achitqilarining ba'zi uglevod manbalarini o'lashtirishi**

Uglerod manbalari	Achitqi kulturalari						
	<i>Candida</i>	<i>Candida tropicalis</i> 83	<i>Candida</i>	<i>Candida mycoderma</i>	<i>Candida mycoderma</i> 89	<i>Candida melinii</i>	<i>Candida krusei</i>

	<i>tropicalis</i> 81		<i>mycoderma</i> 85	87		94	99
Glyukoza	+	+	+	+	+	+	+
Galaktoza	+	+	+	+	+	+	+
Laktoza	+	+	-	+	+	-	+
Mal'toza	+	+	+	+	+	+	+
Raffinoza	+	+	+	+	+	+	+
Sellobioza	+	+	-	+	-	+	+
Tregaloza	+	+	-	+	+	+	+
Saharoza	+	+	+	+	+	+	+
Etil spirt	+	+	+	+	+	+	+
Mannit	+	+	-	-	-	+	+
Sorbit	+	+	+	+	+	-	+
Dulsit	-	+	+	+	+	+	+
Gliserin	+	+	+	+	+	+	+

Izox: "+" - o'sishi mavjudligi; "-" - o'sishi mavjud emas; "+" - o'sishi sust.



Rasm.1. *Candida* shtammlari qattiq ozuqa muhitda koloniyalar hosil qilishi va hujayralarning bo'linishi (mikroskop (CX21 FS1 (Xitoy))

a) *Candida tropicalis* 83; b) *Candida mycoderma* 87; c) *Candida melinii* 94; e) *Candida krusei* 99.

Biz o'rganayotgan *Candida* avlodiga mansub mahalliy shtammlari NaCl va glyukoza miqdori yuqori bo'lgan ozuqa muhitlarida yaxshi o'sishi bo'yicha ma'lumotlar keltirilgan. Shu sababli, keyingi tajribalarimizda mahalliy shtammlarni 5% va 10% NaCl ozuqa muhitlarida o'sishi kuzatildi. *Candida mycoderma* 89 va *Candida melinii* 94 shtammlaridan tashqari barcha shtammlar 5-10% NaCl ozuqa muhitida yaxshi o'sdi. *Candida mycoderma* 89 va *Candida melinii* 94 shtammlari 5% NaCl da sust o'sishi, 10% NaCl ozuqa muhitida umuman o'sishdan to'xtagani aniqlandi.

Shunday qilib, vazelin moyi ostida uzoq muddatli saqlash, o'rganilayotgan *Candida* achitqi shtammlarining morfologik, kul'tural va biokimyoviy xususiyatlarini o'zgarishiga ta'sir qilmasligi aniqlandi. Ushbu achitqi shtammlari 10 yil davomida vazelin moyi ostida saqlanganda hujayra titri $10^5 - 10^7$ KHQB qayd etildi. Achitqi shtammlarini vazelin moyi ostida saqlash usulli to'plamda saqlanayotgan *Candida* avlodiga mansub achitqi shtamlariga +4 °C haroratda saqlash uchun mos keladi.

ADABIYOTLAR

- Arutchelvi, J.I., Bhaduri, S., Uppara, P.V., Doble, M., 2008. Mannosylerythritol lipids: a review. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 1559-1570.
- 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.
- Похиленко 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.
- Белясова, В.И. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2012. № 4 (12). С. 99-121.
- Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А., Чилина Г.А. *Candida*. Кандидозы. Лабораторная диагностика: учебное пособие. СПб.: Коста, 2010: 5-6. [Elinov N.P., Vasilyeva N.V., Stepanova A.A., Chilina G.A. *Candida*. Candidiasis. Laboratory diagnostics: a textbook. St. Petersburg: Costa, 2010: 5-6. (In Russ)].
- Antonucci, S., Bravi, M., Bubbico, R., Michele, A.D., Verdone, N., 2001. Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. Enzyme Microb. Technol. 28, 189-195.
- Anastasiadis, S., Rehm, H.J., 2006. Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation. Electron. J. Biotechnol. 9, 26-39.
- Richard, P., Verho, R., Putkonen, M., Londesborough, J., Penttilä, M., 2003. Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway. FEMS Yeast Res. 3, 185-189.
- Sun, W.L., Tao, W.Y., 2010. Comparison of cell growth and ethanol productivity on different pretreatment of rice straw hemicellulose hydrolysate by using *Candida shehatae* CICC 1766. Afr. J. Microbiol. Res. 4 (11), 1105-1109.

12. Jones, T.D., Havard, J.M., Daugulis, A.J., 1993. Ethanol production from lactose by extractive fermentation. *Biotechnol. Lett.* 15 (8), 871e876.
13. Koushki, M., Jafari, M., Azizi, M., 2012. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. *J. Food Sci. Technol.* 49 (5), 614e619.
14. 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.
15. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.:КМК, 2004, 222 с.