



UO*K: 579.61:543.51:575.17

Luiza TAGAYEVA,

Tayanch doktorant, O'zbekiston Milliy universiteti, Toshkent, O'zbekiston
E-mail: tagaevaluiza646@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0003-6676-9584>

Maftuna TOJIYEVA,

Tayanch doktorant, O'zR FA Mikrobiologiya instituti, Toshkent, O'zbekiston
<https://orcid.org/0009-0005-4598-6648>

Shermat JABBAROV,

Katta ilmiy xodim, PhD, Chorvachilik va parrandachilik ilmiy tadqiqot instituti, Toshkent, O'zbekiston
<https://orcid.org/0009-0007-7819-9557>

Qunduz NORMURODOVA,

Prof.v.b., b.f.d., O'zbekiston Milliy universiteti, Toshkent, O'zbekiston
<https://orcid.org/0000-0002-6946-4482>

O'zbekiston Milliy universiteti professori M.Abdullayeva taqrizi asosida

BACILLUS SUBTILIS-IH 25 SHTAMMINING BIOKIMYOVIY VA FERMENTATIV XUSUSIYATLARINI BAHOLASH

Annotatsiya

Ushbu maqolada *Inula helenium* dorivor o'simligidan ajratilgan endofit *B.subtilis*-IH 25 shtammining ferment va antimikrob faolligi, amilaza va proteaza fermentlarini lipaza fermentiga nisbatan yuqori darajada sintezlashi, patogen bakteriyalardan *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.marcescens*, *B.subtilis*ni ingibirlash zonalarini qayd etdi. Shartli patogen *C.albicans* zamburug'iga qarshi antagonistik faolligi o'rganilgan. *Bacillus subtilis* – IH 25 shtammi vankomisin antibiotigiga o'rtacha chidamli, siprofloksasin, levomisin, imipenem, meropenem, eritromisin, klindamisin, linezolid va norfloksasinlarga sezgirligini aniqlangan.

Kalit so'zlar: *Inula helenium*, dorivor o'simlik, endofit bakteriya, antibiotik, ferment, antimikrob, shtamm, *Bacillus subtilis*-IH 25.

ОЦЕНКА БИОХИМИЧЕСКИХ И ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СВОЙСТВ ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS*-IH 25

Аннотация

В данной статье сообщается об ферментативной и антимикробной активности эндофитного штамма *Bacillus subtilis*-IH 25, выделенного из лекарственного растения *Inula helenium*. Было установлено, что штамм синтезирует ферменты амилазу и протеазу в больших количествах, чем липазу, и демонстрирует зоны ингибирования против патогенных бактерий, таких как *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.marcescens* и *B.subtilis*. Также была исследована его антагонистическая активность против условно-патогенного гриба *C.albicans*. Было установлено, что штамм *Bacillus subtilis*-IH 25 обладает умеренной устойчивостью к ванкомицину, но чувствителен к ципрофлоксацину, левомицину, имипенему, меропенему, эритромицину, клиндамицину, линезолиду и норфлоксацину.

Ключевые слова: *Inula helenium*, лекарственное растение, эндофитные бактерии, антибиотик, фермент, противомикробное средство, штамм, *Bacillus subtilis*-IH 25.

EVALUATION OF THE BIOCHEMICAL AND ENZYMATIC PROPERTIES OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN – IH 25

Annotation

This article reports on the enzymatic and antimicrobial activity of the endophytic strain *Bacillus subtilis* – IH 25, isolated from the medicinal plant *Inula helenium*. It was found that the strain synthesizes the enzymes amylase and protease in greater quantities than lipase and exhibits zones of inhibition against pathogenic bacteria such as *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.marcescens*, and *B.subtilis*. Its antagonistic activity against the opportunistic fungus *C.albicans* was also investigated. It was determined that the *Bacillus subtilis*-IH 25 strain exhibits moderate resistance to vancomycin but is susceptible to ciprofloxacin, chloramphenicol, imipenem, meropenem, erythromycin, clindamycin, linezolid, and norfloxacin.

Keywords: *Inula helenium*, medicinal plant, endophytic bacteria, antibiotic, enzyme, antimicrobial agent, strain, *Bacillus subtilis*-IH 25.

Kirish. Bugungi kunda, dunyo miqyosida dorivor o'simliklardan endofit bakteriya izolyatlarini ajratib olish, ularning turli xil xususiyatlarini o'rganish mikrobiologiya, biotexnologiya, farmatsevtika va chorvachilik sohalarida dolzarb ilmiy-amaliy yo'nalishlaridan biri hisoblanadi [1, 4, 7]. Xususan, endofit bakteriyalar o'simlik ichki to'qimalarida kasallik alomatlarini yuzaga keltirmasdan yashashi, biologik faol metabolitlar, fermentlar, antibiotik moddalar va o'sishni rag'batlantiruvchi birikmalar sintezlashi bilan alohida ahamiyatga ega. O'simlikning ichki to'qimalaridan ajratib olingan bakteriyalardan antimikrob, antioksidant, antifungal, fitostimullovchi va probiotik xususiyatlarga ega istiqbolli shtammlarni aniqlash yangi biologik preparatlar, veterinariya vositalari va tabiiy farmatsevtik mahsulotlarni yaratish imkonini beradi. Shu sababli, tog' va tog' oldi hududlarining namlik yetarli bo'lgan, unumdor va organik moddalarga boy tuproqlarda o'suvchi, xalq tabobatida nafas yo'llari yallig'lanishi,

oshqozon-ichak va teri kasalliklarini davolashda keng qo'llanilib kelinayotgan dorivor o'simliklardan biri - *Inula helenium* o'simligidir [2].

Inula helenium L. - dorivor o'simligi ko'p yillik, mayda gullardan tashkil topgan savatcha to'pgul hosil qiladigan Astradoshlar turkumiga mansub bo'lib, yirik va tik o'suvchi o'tsimon o'simliklardan biri [1-2]. Asosan, uning bargi, barg bandi, guli va ildizlari tarkibida fruktooligosaxaridlar, ichak mikrobiotasini modulyatsiyalovchi, yallig'lanish mediatorlarini kamaytiradigan va hazmni yaxshilaydigan, erkin radikalarni neytrallaydigan, immunitetni rag'batlantiruvchi immunomodulyator polisaxaridlari mavjud. *Inula helenium* L. o'simligi tarkibidagi ko'plab biologik faol birikmalar keng o'rganilganiga qaramasdan, ushbu o'simlikning endofit mikrobiotasi hali to'liq tadqiq etilmagan.

Shundan kelib chiqqan holda, ushbu tadqiqot maqsadi *Inula helenium* L. (IH) - dorivor o'simligining bargidan ajratib olingan, morfo-kultural xususiyatlari o'rganilgan, Maldi tof va molekulyar-genetik tavsiflangan, NCBI Genbankida PZ593820 raqami bilan ro'yxatga olingan [6] *Bacillus subtilis*-IH 25 shtamining biokimyoviy va fermentativ xususiyatlariga ko'ra probiotiklik potentsiallarini baholashga qaratilgan.

Tadqiqotlar va usullar. Tadqiqot ob'ekti *Bacillus subtilis*-IH 25 shtamining biokimyoviy va fermentativ xususiyatlarini baholashda lipaza, jelatinaza, katalaza sintezi, gemoliz faolligi, metabolizmida ishtirok etadigan (amilaza va proteaza) fermentlarni hosil qilish faolligi, turli xil antibiotiklarga sezgirlik kabi parametrlarni o'z ichiga olgan.

Jelatinaza fermenti faolligini tekshirish uchun tadqiqot shtammi namunasi 10ml standart probirkalarga 15% jelatin tutuvchi ozuqa muhitiga ukol usulida ekilib, 24 soat 37°C termastatda inkubasiya qilinadi [3].

Lipaza fermenti faolligini tekshirishda foydalanilgan ozuqa muhiti tarkibi, g/l: Tvin 80-10 g, pepton-10 g, NaCl-5g, $\text{SaSl}_2 \cdot \text{N}_2\text{O}-1$, agar - 18 g. Ozuqa muhiti Petri likopchalariga 20 mldan solinib, ustiga faollashtirilgan shtamlardan tomchi usulida ekildi va 2-7 kun mobaynida hosil bo'lgan zonalar o'lchanadi [3].

Katalaza fermenti faolligini tekshirish uchun shtamlar go'sht peptonli agar (GPA) qattiq ozuqa muhitida shtrix usulida ekilib, o'sib chiqqan koloniyalardan buyum oynasiga surtma tayyorlandi va ustidan tarkibida 10%li vodorod peroksidi eritmasidan 1 tomchi qo'yib aniqlanadi [5].

Gemolitik faollikni tekshirishda shtamlar GPA ozuqa muhitiga shtrix usulida ekilib, gemoglobinni o'zlashtirishi ozuqa muhitida o'sib chiqqan koloniyalar agarning rangini o'zgartirishi asosida baholanadi [3].

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 shtamlar tomchi usulida ekildi va 2-10 kun davomida kuzatildi. 10 kundan keyin 5ml Lyugol eritmasi asosida hosil bo'lgan zonalar aniqlanadi [3].

Proteaza fermenti faolligini tekshirishda 3% sut qo'shilgan ozuqa muhitidan foydalanildi, sterillangan ozuqa muhiti 20 mldan Petri likopchalariga quyiladi va faollashtirilgan shtamlar tomchi usulida ekiladi. Inkubasiya davri 2-10 kun davom ettirildi va 5% trixlor uksus kislotasi quyiladi, so'ngra zonalar tahlil qilinadi. Ovqat hazm qilish yo'lining stress omillariga chidamliligini aniqlash uchun shtamlarining turli xil pH ko'rsatkichlari va safroga chidamliligi o'rganiladi [3].

Shtamlarning ot 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 foydalaniladi [3].

Antibakterial faolligini aniqlashda, Gram-musbat bakteriyalardan: *Staphylococcus aureus* va *Bacillus subtilis*, gramm manfiy bakteriyalardan: *Pseudomonas aeruginosa* va *Escherichia coli*, achitqilardan *Candida albicans* foydalanildi. Barcha bakteriya suspenziyalari MakFarland Standard bo'yicha $0,5 (1,5 \times 10^8 \text{ KHB/ml})$ qilib olindi. Bakterial suspenziyalar 0,5ml miqdorida likobchadagi GPA ozuqa muhiti yuzasiga ekib chiqildi va 15 minut inkubasiya qilindi. Petri likobchalari termostatta 37°C haroratda 24 soat davomida inkubasiya qilinganidan so'ng test mikroorganizmlar o'sishini ingibirlash maydoni o'lchandi. Har bir tajriba uch martadan qaytariladi [3].

Probiotik tabiatli bakteriyalarning oshqozon-ichak trakti (OIT) muhitiga chidamliligi va antibiotikga sezgirlikni aniqlash usullari asosan in vitro (laboratoriya sharoitida) simulyasiya modellari orqali amalga oshiriladi. Bu tekshiruvlar probiotiklarning organizmda tirik qolishi va xavfsizligini ta'minlash uchun zarurdir. Oshqozon-ichak muhitiga chidamlilikni aniqlash usulida tadqiqot bakteriyaning oshqozondagi kislotali muhiti pH 2.0-3.0 va ot ichagidagi o't suyuqligi ta'siriga chidamliligini o'lchaydi [3].

Antibiotikga sezgirlikni aniqlashda, disko-diffuzion usulidan (Disc Diffusion Method) foydalanildi. Bakteriya GPA ozuqa muhitiga ekiladi va ustiga antibiotik diskalari joylashtiriladi. Natija: 24-48 soatdan keyin bakteriya o'sishi to'xtagan zona (zona diametri) o'lchanadi. Zona qancha katta bo'lsa, bakteriya antibiotikka shuncha sezgir [3].

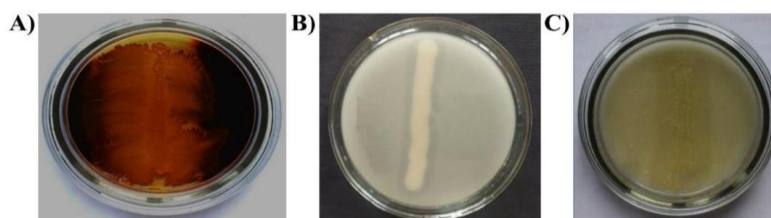
Olingan natijalar va ularning tahlili. Tadqiqotlarni amalga oshirish uchun, birinchi bo'lib, *Inula helenium* L. (IH)-dorivor o'simligining bargidan ajratilgan bakteriya izolyati molekulyar-genetik tavsiflangan [6] va NCBI Genbankida PZ593820 raqami bilan ro'yxatga olingan *Bacillus subtilis*-IH 25 shtamining probiotiklik potentsiallarini o'rganishga qaratildi. Xususan, probiotik sifatida ishlatiladigan bakteriya shtamlari quyidagi fermentativ faollikka ega bo'lishlari talab etiladi. Shunga ko'ra, *B. subtilis* - IH 25 shtamining katalaza, letinaza, jelatinaza va gemoliz faolliklari, pH muhiti va otning o't safrosiga chidamliligi o'rganildi (1-jadval).

1-Jadval

Bacillus subtilis - IH 25 shtamining probiotiklik potentsiallari

Tadqiq etilayotgan shtamlar	Katalaza	Letinaza	Jelatinaza	Gemoliz	pH	O't safrosa
<i>Bacillus subtilis</i> - IH 25	musbat	manfiy	manfiy	manfiy	3.5	musbat

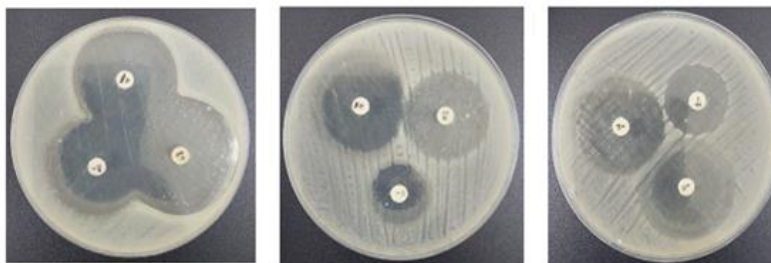
Olingan natijalardan ko'rinib turibdiki, *Bacillus subtilis* - IH 25 letinaza, jelatinaza va gemoliz - manfiy, katalaza-musbat ekanligi, pH-3.5 muhiti va otning o't safrosiga chidamli ekanligini ko'rsatdi. Keyingi tadqiqotimizda, *Bacillus subtilis* - IH 25 shtamining amilaza, proteaza va lipaza fermentlarini sintezlashi o'rganildi (1-rasm).



1-Rasm. *Bacillus subtilis* - IH 25 shtamining amilaza (A), proteaza (B) va lipaza (C) fermentlarini sintezlashi

Olingan tadqiqot natijalari shuni ko'rsatdiki, *Bacillus subtilis* - IH 25 shtammi amilaza va proteaza fermentlarini lipaza fermentiga nisbatan yuqoriroq sintezlashi aniqlandi. Demak, *B.subtilis* - IH 25 shtammi gidrolitik fermentlarni sintezlashi, gemoliz hodisasi kuzatilmaganligi, pH muhiti 3.5ni tashkil etishi, o't safrosiga chidamli ekanligini inobatga olib, ushbu shtammni probiotiklik xususiyatiga ega deb hisoblash mumkin. Bundan tashqari, probiotik sifatida tavsiya etiladigan bakteriya shtamlari turli xil antibiotiklarga sezgir bo'lishi kerak.

Shunga ko'ra, *B.subtilis* - IH 25 shtamining siprofloksasin, vankomisin, levomisin, imipenem, meropenem, eritromisin, klindamisin, linezolid va norfloksasin antibiotiklariga sezgirligi tekshirildi. Bunda, tadqiq etilayotgan *B.subtilis* - IH 25 kulturasining antibiotikka sezgirligi MUK 4.2.2602-10 da berilgan ko'rsatmalar asosida amalga oshirildi. *B.subtilis* - IH 25 shtamlari MRS sho'rvasiga 24-36 soat davomida 37°Cda inkubasiya qilindi. McFarland standartiga muvofiq 10^7 KHB/ml saqlagan suspenziya MRS agar yuzasiga ekildi. Inokulyasiya qilingan muhit yuzasiga, quyidagi antibiotik shimdirilgan siprofloksasin, levomisin, imipenem, meropenem, eritromisin, klindamisin, linezolid va norfloksasin disklar quyildi (HiMedia, Hindiston) va 37°C da 24 soat davomida o'stirildi (2-rasm).



2-Rasm. *Bacillus subtilis* - IH 25 shtamining antibiotiklarga nisbatan sezgirligi

2-Rasmdan ko'rinib turibdiki, *Bacillus subtilis* - IH 25 shtammi vankomisin antibiotigiga o'rtacha chidamli, siprofloksasin, levomisin, imipenem, meropenem, eritromisin, klindamisin, linezolid va norfloksasinlarga sezgirligini ko'rsatdi.

Tadqiq etilayotgan shtamlarni antibiotiklarga nisbatan sezgirligi qarab, immunitetni oshiruvchi biologik faol qo'shimcha va yallig'lanishga qarshi yuqori faollikga ega mahalliy shtamm sifatida tavsiya qilish mumkin.

Navbatdagi tadqiqotimizda, *B.subtilis* - IH 25 shtamining og'iz bo'shlig'i va oshqozon ichak mikroflorasida uchraydigan *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* patogen bakteriyalariga, shartli patogen *Candida albicans* zamburug'iga nisbatan antagonistik faolligi o'rganildi (2-jadval).

2-Jadval

B.subtilis - IH 25 shtamining antagonistik faolligi (M $\pm$ m, n=3)

Tekshirilayotgan shtamm	O'sishni cheklash zonasi, zona diametri, mm					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>B.subtilis</i> - IH 25	30 $\pm$ 0,30	34 $\pm$ 0,24	35 $\pm$ 0,20	26 $\pm$ 0,22	36 $\pm$ 0,23	34 $\pm$ 0,24

Olingan natijalarga ko'ra, *B.subtilis* - IH 25 shtammida patogen bakteriyalardan *S.aureus*ni 30.2mmgacha, *P.aeruginosa*ni 34.1mmgacha, *E. coli*ni 35.1mmgacha, *S.marcescens*ni 26.1mmgacha, *B.subtilis*ni 36.2mmgacha ingibirlash zonalarini qayd etdi. Shartli patogen *C.albicans* zamburug'iga qarshi 34.2mmgacha antagonistik faolligini namoyon qildi.

Olingan natijalarga ko'ra, o'rganilayotgan shtammida ingibirlash zonasining diametri katta bo'lib, yuqori antagonistik faollik namoyon qildi. Jumladan, *S.aureus* 25dan 30mmgacha, *P.aeruginosa* 30dan 34mmgacha, *E.coli* 32dan 35mmgacha, *S.marcescens* 25mmdan 26 mmgacha, *B.subtilis* 35dan 36mmgacha ingibirlash zonalarini qayd etildi va bu ushbu shtamming ta'sirchanligi yuqoriligini ko'rsatdi. *C.albicans* zamburug'iga qarshi 30 - 34mmgacha antagonistik faolligini namoyon qildi. Antagonistik faollik mexanizmlariga organik kislotalar, vodorod peroksid, bakteriosinlar ishlab chiqarishi va ozuqa moddalar uchun raqobatdoshligi tufayli patogen bakteriyalarni o'sishi va tirik qolishini cheklaydi. *C.albicans* oddiy antifungal agentlar tomonidan osongina o'ldirilmaydi.

Bizning tadqiqotimizda *B.subtilis* - IH 25 bakteriya shtammi *C.albicans*ga qarshi yuqori antifungal faollikni ko'rsatdi. Bunday natija antifungal dorilarga chidamliligini isbotlaydi. Shuning uchun, *Bacillus subtilis* - IH 25 shtammi vankomisin antibiotigiga o'rtacha chidamli, siprofloksasin, levomisin, imipenem, meropenem, eritromisin, klindamisin, linezolid va norfloksasinlarga sezgirligini ko'rsatdi.

B.subtilis - IH 25 shtamining antibakterial va antifungal metabolitlari sezgir patogenlar keltirib chiqaradigan *S.aureus*ni, *P.aeruginosa*ni, *E. coli*ni, *S.marcescens*ni, *B.subtilis* bakteriyalari va *C.albicans* kandidozni davolashda istiqbolli alternativ bo'lishi mumkin. Bu olingan natijalar ham ushbu bakteriya shtamidan chorvachilikda probiotik sifatida foydalanish mumkin degan xulosani beradi.

Xulosa. B.subtilis-IH 25 shtamining ferment va antimikrob faolligi, amilaza va proteaza fermentlarini lipaza fermentiga nisbatan yuqori darajada sintezlashi, patogen bakteriyalardan *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.marcescens*, *B.subtilis*ni ingibirlash zonalarini qayd etdi. Shartli patogen *C.albicans* zamburug'iga qarshi antagonistik faolligini namoyon qildi. *Bacillus subtilis* – IH 25 shtammi vankomisin antibiotigiga o'rtacha chidamli, siprofloksasin, levomisin, imipenem, меропенем, eritromisin, klindamisin, linezolid va norfloksasinlarga sezgirligini ko'rsatdi.

Tashakkurnoma. Ushbu tadqiqot natijalari "Ichakning yallig'lanish kasalliklarini davolashda probiotik nanozimlar ishlab chiqarishga mo'ljallangan mikroavod" (№ AL-8724052956) ilmiy loyihasi doirasida amalga oshirilgan.

ADABIYOTLAR

1. G'aybullayeva O.O., Xusainova G.H. O'zbekiston sharoitida o'stirilgan *Inula helenium* L. o'simligining morfo-biokimyoviy tavsifi va dorivorlik xususiyatlari // Oriental Renaissance: Innovative, educational, natural and social sciences (E) ISSN: 2181-1784 5(9), 2025, Research BIB / Index Copernicus www.oriens.uz. P. 232-238.
2. Salixov Sh.I., Turayev A.S., Islomov A.X., G'aybullayeva O.O. Qora andiz o'simligini ildizi tarkibidagi mineral elementlarini miqdorini aniqlash va xalq tabobatida qo'llanilishi // Xalq tabobati plus Ilmiy amaliy ijtimoiy, tibbiy, ma'rifiy jurnal. 2022.-№ 4 (13).-B.7-10.
3. 4.2.2602-10-sonli uslubiy ko'rsatmalar (MUK) - Probiotiklar ishlab chiqarishda foydalaniladigan ishlab chiqarish shtammlarini tanlash, tekshirish va saqlash.
4. Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 1. – С. 19-32.
5. Квасников Е. И., Нестеренко О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. - Москва: Наука, 1975. С. 82.
6. Tagayeva L.X., Tojiyev B.B., Jabborov Sh.Sh., Bozorov N.I., Normurodova Q.T. *Inula helenium* dorivor o'simligidan ajratilgan endofit bakteriyalarning bio xilma xilligi. Xorazm ma'mun akademiyasi axborotnomasi. Xiva- 2026-7/1, 128-132 б.
7. Чеботарь В.К., Щербakov A.B., Щербakova E.H., Масленникова С.Н., Заплаткин A.H., Мальфанова Н.В. Эндофитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие // Сельскохозяйственная биология, 2015, том 50, С. 648-654. 631.8:632.9:579.64 doi: 10.15389.