



UDK:579.67:615.281

Sulaymon MADAMINOV,

TIQXMMI milliy tadqiqot universiteti Biotexnologiya mutaxassisligi magistranti

E-mail: madaminovsulaymon3@gmail.com

Siroj ABDULLAYEV,

O'zMU Mikrobiologiya va virusologiya mutaxassisligi magistranti

No'monjon SULTANOV,

O'zMU Mikrobiologiya va virusologiya mutaxassisligi magistranti

Sunnat O'RINOV,

O'zMU Biokimyo va biofizika mutaxassisligi magistranti

Farhod ESHBOEV,

O'zR FA S.Yu. Yunusov nomidagi O'simlik moddolari kimyosi instituti, O'zbekiston Fanlar akademiyasi kat.i.x.

O'zMU dotsenti, PhD S. Abdusamatov taqrizi asosida

FERULA KUHISTANICA O'SIMLIGIDAN AJRATILGAN ENDOFIT ZAMBURUG'LAR IKKILAMCHI METOBOLITLARINING ANTIMIKROBIAL FAOLLIKLARINI O'RGANISH

Аннотация

Mazkur maqolada *Ferula kuhistanica* (kovrak) o'simligining turli organlari - ildiz, poya va barglaridan besh xil sof holatdagi endofit zamburug' ajratib olindi. Tanlab olingan izolyatlar suyuq ozuqa muhitida yetishtirildi va ularning ikkilamchi metabolitlari qutbli erituvchi yordamida ekstraksiya qilindi. Ajratib olingan ikkilamchi metabolitlarning antibakterial va antifungal faolligi turli patogen mikroorganizmlar ishtirokida baholandi hamda yuqori faollikka ega izolyatlar aniqlab olindi. Olingan natijalar shuni ko'rsatadiki, *Ferula kuhistanica* o'simligidan ajratilgan endofit zamburug'larning ikkilamchi metabolitlari farmatsevtika sohasida antibiotiklarning muqobil manbai sifatida qo'llanish imkoniyatiga ega.

Kalit so'zlar: *Ferula kuhistanica*, kovrak, endofit zamburug'lar, ikkilamchi metabolitlar, antimikrobia faollik.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ЭНДОФИТНЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЯ FERULA KUHISTANICA

Аннотация

В данной статье из различных органов растения *Ferula kuhistanica* - корня, стебля и листьев - были выделены пять чистых штаммов эндофитных грибов. Отобранные изоляты культивировали в жидкой питательной среде и экстрагировали их вторичные метаболиты с использованием полярного растворителя. Антибактериальная и антимикотическая активность выделенных вторичных метаболитов была оценена с применением различных патогенных микроорганизмов, и были определены изоляты с высокой биологической активностью. Полученные результаты показывают, что вторичные метаболиты эндофитных грибов, выделенных из растения *Ferula kuhistanica*, могут рассматриваться как альтернативный источник антибиотиков для применения в фармацевтической области.

Ключевые слова: *Ferula kuhistanica*, куврак, эндофитные грибы, вторичные метаболиты, антимикробная активность.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC FUNGI FROM FERULA KUHISTANICA AND EVALUATION OF THEIR ANTIMICROBIAL SECONDARY METABOLITES

Annotation

This article describes the isolation of five pure endophytic fungi from various organs - roots, stems, and leaves - of the plant *Ferula kuhistanica*. The selected isolates were cultivated in a liquid nutrient medium, and their secondary metabolites were extracted using a polar solvent. The antibacterial and antifungal activities of the extracted secondary metabolites were evaluated against various pathogenic microorganisms, and the isolates with high biological activity were identified. The obtained results indicate that the secondary metabolites of the endophytic fungi isolated from *Ferula kuhistanica* have the potential to serve as alternative sources of antibiotics in the pharmaceutical field.

Key words: *Ferula kuhistanica*, galbanum, endophytic fungi, secondary metabolites, antimicrobial activity.

Kirish. Zamonaviy tibbiyotda endofit zamburug'larning biologik faol ikkilamchi metabolitlari muhim ahamiyat kasb etib, ayniqsa *Penicillium chrysogenum* tomonidan sintez qilingan penitsillinning kashf etilishi antibiotik terapiyasining rivojlanishida tub burilish yasanagan. Endofit zamburug'larning antibiotik sintez qilish salohiyati ularning klinik samaradorligi, iqtisodiy jihatdan qulay ishlab chiqarish imkoniyati va antibiotiklarga rezistentlik muammosiga qarshi kurashishdagi ahamiyati bilan ajralib turadi. Shu bois farmatsevtik tadqiqotlarda ularning yangi antibakterial preparatlar manbai sifatida qo'llanilishi dolzarb bo'lib qolmoqda.

Bu mikroorganizmlar tomonidan sintez qilinadigan flavonoidlar, alkaloidlar, terpenoidlar, peptidlar va boshqa moddalarning xilma-xil kimyoviy tuzilmalari ularning antibakterial, antifungal, antivirus, antioksidant va antitumor xususiyatlarini belgilab, tibbiy qo'llanilish imkoniyatlarini kengaytiradi. Antibiotik samaradorligining pasayishi va chidamli patogenlarning ko'payishi fonida ilgari yetarlicha o'rganilmagan endofitlar, ayniqsa zamburug'lar, istiqbolli bioaktiv manba sifatida farmatsevtika tadqiqotlarining markazida turibdi.

Bunday izlanishlar O'zbekiston Respublikasining 2019-yilda tasdiqlangan qishloq xo'jaligini rivojlantirish strategiyasi doirasida tabiiy resurslardan oqilona foydalanish, mahsulot sifati va qo'shilgan qiymatni oshirishga yo'naltirilgan davlat siyosati bilan ham uyg'unlashadi [1].

Xususan, qadimdan xalq tabobatida keng qo'llanilgan *Ferula kuhistanica* o'simligi va undan ajratilgan endofit zamburug'lar tomonidan sintez qilinadigan ikkilamchi metabolitlarning antibakterial, antifungal, antioksidant va antitumor faollikka ega ekani aniqlanib, bu o'simlikni nafaqat dorivor manba, balki bioaktiv mikroorganizmlarning tabiiy rezervoari sifatida ham muhim ilmiy obyektga aylantirmoqda. Ushbu metabolitlar patogenlarga qarshi samarali ta'sir ko'rsatishi sababli, ular kelajakda yangi dori vositalarini yaratishda istiqbolli yo'nalishlardan biri sifatida ko'rib chiqilmoqda.

Adabiyotlar sharhi. Ko'plab mikroorganizmlar o'simliklar bilan o'zaro foydali aloqada yashab, bu munosabat natijasida har ikkala organizm ham ma'lum darajada manfaat ko'radi. Bunday foydali mikroblar ham yer usti, ham edafik (tuproq) muhitlarda keng tarqalgan. Epifitlar o'simliklarning tashqi yuzasida joylashgan mikroorganizmlar bo'lsa, endofitlar esa o'simlikning ichki tuzilmalarida, asosan barg, poya va ildiz to'qimalarida hayot kechiradi [2].

Olib borilgan tadqiqotlar endofit zamburug'lar o'simliklarda stressga javoban himoya mexanizmlarini faollashtirishini, jumladan insektitsid xususiyatga ega metabolitlar sintezini ko'rsatmoqda. Masalan, *Paraconiophyrium variabile* zamburug'i *Fusarium oxysporum* ning zararli ta'sirini sezilarli kamaytirgan, *Neotyphodium typhnium* esa hasharotlarga qarshi samaradorlik ko'rsatgan [3].

Endofitlar o'ziga xos ekologik nishada yashab, xo'jayin o'simlik bilan o'zaro foydali, parazit yoki kommensal simbiozini muvozanatlashtiradi. Ushbu jarayon asosan kimyoviy moddalar bilan boshqarilib, noyob metabolitlarni ishlab chiqaradi [4]. So'nggi yillarda endofit mikroorganizmlarni, ayniqsa zamburug'lar guruhiga mansub turlarni chuqur o'rganish bo'yicha ilmiy qiziqish ortib bormoqda.

Endofit zamburug'lar ko'plab bioaktiv ikkilamchi metabolitlarni sintez qilish xususiyatiga ega bo'lib, ular antibiotik, antiparazit, agroximik, antitumor, immunosuppressiv va antioksidant faoliyat bilan ajralib turadi. Shu bois, ularni farmatsevtika, qishloq xo'jaligi va biotexnologiyada istiqbolli biologik resurs sifatida baholash mumkin [5]. Tadqiqotlar natijasida, endofitlar sintez qiladigan metabolitlarning 30% dan ortig'i antifungal va antibakterial faollikka ega ekani aniqlangan, bu esa ularning ilmiy va amaliy ahamiyatini yanada oshirmoqda [6].

Masalan, *Abies alba* dan ajratilgan *Pleurophomopsis* va *Cryptosporiopsis* turkumidagi izolyatlar antibiotik faollikka ega bo'lsa, keng bargli va ignabargli daraxtlardan ajratilgan *Pezicula* turiga mansub endofitlar biologik faol metabolitlar ishlab chiqarishi bilan ahamiyatlidir [7].

Tadqiqot metodologiyasi. O'simliklardan endofit zamburug'lar ajratib olish. *Ferula kuhistanica* o'simligining turli vegetativ organlaridan endofit zamburug'larni ajratib olish maqsadida Xorazm viloyatida yig'ilgan namunalar O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi O'simlik moddalari kimyosi instituti Molekulyar genetika laboratoriyasiga yetkazildi. Ajratish ishlari ilgari tavsiflangan standart metodologiya asosida amalga oshirildi [8]. O'simlikning ildiz, poya va barg qismlari dastlab steril suv bilan yuvilib, quritilgach, steril sharoitda mayda bo'laklarga ajratildi. Sirt sterilizatsiyasi bosqichma-bosqich 70% etanol (1 daqiqa) va 1,3 mol/l natriy gipoxlorit (30 soniya) bilan amalga oshirilib, har bir bosqichdan keyin uch martalik yuvish bilan yakunlandi. Tayyorlangan to'qima bo'laklari 1 mg/ml ampitsillin qo'shilgan kartoshka-dekstrozi agar (KDA) muhitiga ekildi.

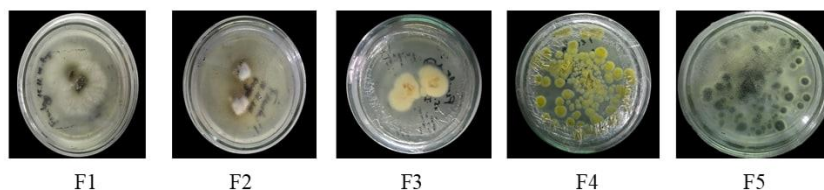
Inkubatsiyadan so'ng o'sib chiqqan miseliyalardan morfologik belgilari asosida farqlangan izolatlar tanlab olinib, bir necha marotaba subkultura orqali toza izolyatlar ajratildi. Olingan sof izolyatlar raqamlanib, -20 °C da keyingi tahlillar uchun saqlab qo'yildi.

Ajratilgan endofit zamburug'larni ko'paytirish va ulardan biologik faol moddalarni ekstraksiya qilish. Ajratilgan endofit zamburug'lar biologik faol metabolitlarni olish maqsadida o'stirilib, ularning metabolik mahsulotlari ekstraksiya qilindi [9]. Dastlab, zamburug'lar kartoshka-dekstrozi agar (KDA) muhitida +25 °C da 7 kun davomida statik sharoitda inkubatsiya qilinib, morfologik xususiyatlari kuzatildi. Keyingi bosqichda 5 mm diametrli mitseliy diskleri kartoshka-dekstrozi bulyon bilan to'ldirilgan Erlenmeyer kolbalariga ko'chirilib, +26 °C da 160 ayl/min tezlikda orbital chayqatkichda 21 kun davomida inkubatsiya qilindi. Fermentatsiyalangan suyuqlikdan bioaktiv moddalarni ajratib olish uchun etil asetat bilan suyuqlik-suyuqlik ekstraksiyasi usuli qo'llanildi. Aralashtirishdan so'ng organik faza ajratib olingan bo'lib, u BUCHI Rotavapor-R bug'latgich qurilmasida +40 °C da konsentrlashtirildi. Natijada, zamburug'lar tomonidan sintez qilingan ikkinchi darajali metabolitlar (biologik faol ekstraktlar) quruq shaklda olinib, keyingi bioaktivlik tahlillari uchun saqlandi.

Endofit zamburug'lar ekstraktlarining antibakterial va antifungal faolligini in vitro aniqlash. Endofit zamburug'lardan ajratilgan ekstraktlarning antibakterial va antifungal faolligi *in vitro* sharoitda baholandi. Antibakterial sinovlarda *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* va *Escherichia coli* shtammlari ishlatildi. Bakterial suspenziyalar LB agarga ekilib, bioekstraktlar bilan namlangan steril diskler joylashtirildi. 3 soat sovitkichda diffuziya amalga oshirilgach, idishlar 37 °C da inkubatsiya qilindi. Natijalar ekstrakt atrofida hosil bo'lgan ingibitsiya zonalari diametri bilan baholandi.

Antifungal faollik *Candida albicans* ga qarshi modifikatsiyalangan agar-diskli usulda tekshirildi. SDA muhitiga inokulyatsiya qilingan zamburug'ga bioekstrakt tomizilgan diskler joylashtirildi va 29 °C da inkubatsiya qilindi. Ingibitsiya zonalari ekstraktlarning antifungal ta'sirini ko'rsatdi. Har bir sinov uch marotaba takrorlanib, o'rtacha qiymatlar asosida natijalar chiqarildi [8].

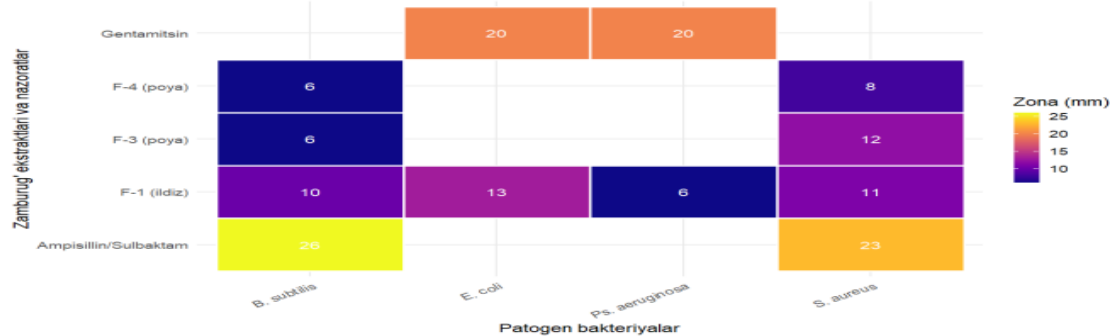
Tadqiqot natijalari va tahlili. *Ferula kuhistanica* o'simligining ildiz, poya va barg kabi turli organlaridan mikroskopik zamburug'larni ajratish natijasida jami 5 ta endofit zamburug' izolyati ajratib olindi.



1-rasm. *Ferula kuhistanica* o'simligidan ajratib olingan endofit zamburug'lar

Ajratilgan izolyatlar morfologik belgilari, o'sish xususiyatlari va kulturaviy xususiyatlariga ko'ra dastlabki tavsiflandi hamda ular keyingi bosqichlarda biologik faollikni baholash uchun saralab olindi.

Endofit zamburug'larning antibakterial faolligini *in vitro* baholash. Biofaollik agar-disk diffuziya usuli orqali, ikki gram-musbat (*Bacillus subtilis* RKMUz-5, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), ikki gram-manfiy (*Escherichia coli* RKMUz-221, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27879) bakteriyalar hamda *Candida albicans* RKMUz-247 ga nisbatan baholandi.



2-rasm. *Ferula kuhistanica* o'simligidan ajratilgan endofit zamburug'lar ikkilamchi metabolitlarining antibakterial faolliqi

Ferula kuhistanica o'simligining ildizidan ajratilgan F-1 ekstrakti keng spektrli antibakterial faollik namoyon etib, *Escherichia coli* ($13,12 \pm 0,32$ mm), *Staphylococcus aureus* ($11,42 \pm 0,35$ mm), *Bacillus subtilis* ($10,24 \pm 0,29$ mm) va *Pseudomonas aeruginosa* ($6,22 \pm 0,08$ mm) ga nisbatan ingibitiv zonalar hosil qildi. Ayniqsa, gram-manfiy bakteriyalar – xususan *E. coli* ga qarshi sezilarli faolliqi ushbu ekstrakt tarkibida tashqi membranani buzuvchi samarali bioaktiv komponentlar mavjudligini ko'rsatadi.

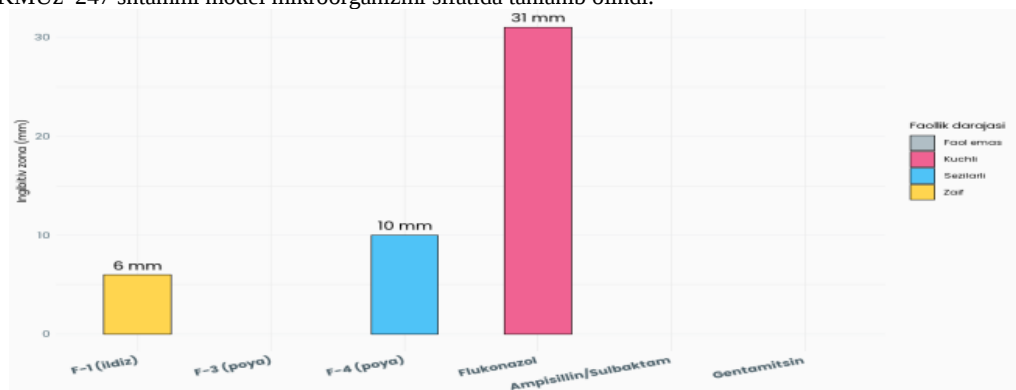
Poyadan olingan F-3 ekstrakti faqat gram-musbat bakteriyalarga, ya'ni *S. aureus* ($12,37 \pm 0,33$ mm) va *B. subtilis* ($6,26 \pm 0,17$ mm) ga nisbatan antibakterial faollikka ega bo'lib, gram-manfiy bakteriyalarga ta'siri kuzatilmadi. Bu selektivlik ekstraktidagi faol moddalarning aynan gram-musbat bakteriyalar hujayra devoriga xos tuzilmalarga nisbatan ta'sirchanligini anglatadi.

Shuningdek, F-4 ekstrakti ham faqat gram-musbat bakteriyalarga qarshi zaifdan o'rtachagacha bo'lgan antibakterial faollik ko'rsatib, *S. aureus* ($8,32 \pm 0,34$ mm) va *B. subtilis* ($6,19 \pm 0,21$ mm)ga qarshi ta'sir ko'rsatdi; gram-manfiy bakteriyalarga esa ta'sir kuzatilmadi.

Taqqoslash uchun ishlatilgan antibiotiklardan ampisillin/sulbaktam (*S. aureus* – $23,41 \pm 0,95$ mm, *B. subtilis* – $26,54 \pm 0,72$ mm) va gentamitsin (*E. coli* va *P. aeruginosa* – $20,72 \pm 0,64$ mm) yuqori samaradorlik namoyon etdi. *Ferula kuhistanica* ekstraktlarining ushbu antibiotiklar bilan solishtirganda faolliqi mo'tadil bo'lishiga qaramay, ularning ma'lum bakteriyalarga nisbatan selektiv ta'siri mavjudligi, ekstraktsiya va tozalash texnologiyalarini takomillashtirish orqali istiqbolli tabiiy antibakterial vosita sifatida ishlab chiqish imkoniyatini ko'rsatadi.

Standart antibakterial vositalar nazorat sifatida qo'llanilgan bo'lib, ampisillin/sulbaktam kombinatsiyasi *Bacillus subtilis* ($26,18 \pm 0,75$ mm) va *Staphylococcus aureus* ($23,53 \pm 0,63$ mm) ga nisbatan yuqori darajadagi ingibitiv zonalar hosil qildi. Gentamitsin esa *Escherichia coli* va *Pseudomonas aeruginosa* ga qarshi $20,56 \pm 0,39$ mm lik ingibitiv zona bilan samarali antibakterial faollik ko'rsatdi.

Ferula kuhistanica o'simligidan ajratilgan endofit zamburug' ekstraktlarining antifungal faolligini aniqlashda *Candida albicans* RKMUz-247 shtammi model mikroorganizmi sifatida tanlanib olindi.



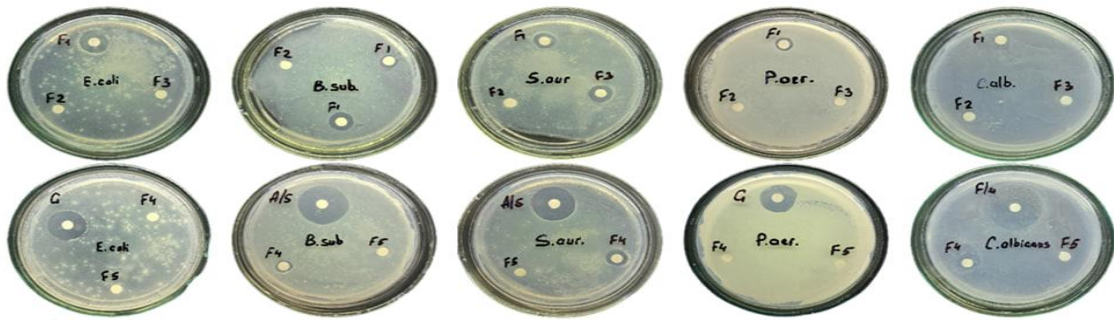
3-rasm. *Ferula kuhistanica* o'simligidan ajratilgan endofit zamburug'lar ikkilamchi metabolitlarining qarshi faolliqi

F-1 ekstrakti *Candida albicans* ga nisbatan $6,19 \pm 0,16$ mm ingibitiv zona hosil qilgan bo'lib, u zaif antifungal ta'sirga ega ekanini ko'rsatadi. Bu natija ekstrakt tarkibida past konsentratsiyadagi bioaktiv birikmalar mavjudligini, ammo ularning ta'siri cheklanganligini anglatadi.

F-3 ekstrakti antifungal faollik namoyon etmagan, bu esa tarkibida *Candida albicans* ga nisbatan ta'sir ko'rsatuvchi birikmalar mavjud emasligini yoki ularning biologik samaradorligi nihoyatda past ekanini bildiradi. Shu sababli, bu ekstrakt faqat tor spektrli yoki selektiv antibakterial faollikka ega bo'lishi mumkin.

F-4 ekstrakti *Candida albicans* shtammiga qarshi $10,27 \pm 0,33$ mm diametrli ingibitiv zona hosil qilgan bo'lib, bu o'rtacha darajadagi antifungal faollik sifatida baholandi. Ushbu ko'rsatkich ekstrakt tarkibida zamburug' hujayrasi tuzilmasi yoki metabolizmini nishonga oluvchi flavonoidlar, saponinlar yoki triterpenoidlar kabi moddalarning mavjudligini taxmin qilishga asos beradi.

Taqqoslovchi sifatida qo'llanilgan flukonazol (25 mkg/disk) esa *Candida albicans* ga nisbatan $31,24 \pm 0,72$ mm ingibitiv zona hosil qilib, yuqori darajadagi antifungal faollik namoyon etdi.



4-rasm. *Ferula kuhistanica* o'simligi endofit zamburug'laridan ajratib olingan ikkilamchi metabolitlarning antimikrobial faolligi

Xulosa va takliflar. Tadqiqot natijalari *Ferula kuhistanica* o'simligidan olingan ekstraktlarning ma'lum darajada antibakterial va antifungal faollikka ega ekanligini ko'rsatdi. Xususan, ildizdan ajratilgan F-1 ekstrakti keng spektrli antibakterial xususiyat namoyon etib, ayniqsa gram-manfiy bakteriya *Escherichia coli* ga qarshi sezilarli faollik ko'rsatdi. Poyadan olingan F-3 va F-4 ekstraktlari esa asosan gram-musbat bakteriyalarga selektiv ta'sir ko'rsatdi. Antifungal tahlillar natijasida F-1 ekstrakti *Candida albicans* ga nisbatan zaif, F-4 ekstrakti esa o'rtacha darajadagi faollikka ega ekanligi aniqlandi, F-3 ekstrakti esa sezilarli ta'sir ko'rsatmadi. Umuman olganda, *F. kuhistanica* ekstraktlari antibiotiklar va antifungal dorilar bilan solishtirilganda mo'tadil ta'sir ko'rsatgan bo'lsa-da, ularning ayrim bakteriya va zamburug'larga nisbatan selektiv faollikka egaligi, bioaktiv komponentlarning istiqbolli manbai sifatida baholanishi mumkinligini ko'rsatadi.

ADABIYOTLAR

1. O'zbekiston Respublikasi Prezidenti Shavkat Mirziyoyevning 2022-yil 20-maydagi PQ-251-sonli "Dorivor o'simliklarni madaniy holda etishtirish va qayta ishlash hamda davolashda ulardan keng foydalanishni tashkil etish chora-tadbirlari to'g'risida" gi qarori
2. Vishwakarma, K., Kumar, N., Shandilya, C., Mohapatra, S., Bhayana, S., & Varma, A. (2020). Revisiting plant-microbe interactions and microbial consortia application for enhancing sustainable agriculture: a review. *Frontiers in Microbiology*, 11, 560406.
3. Ju, Y., Sacalis, J. N., & Still, C. C. (1998). Bioactive flavonoids from endophyte-infected blue grass (*Poa ampla*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3785-3788.
4. Caruso, G., Abdelhamid, M. T., Kalisz, A., & Sekara, A. (2020). Linking endophytic fungi to medicinal plants therapeutic activity. A case study on Asteraceae. *Agriculture*, 10(7), 286.
5. Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, A. R. A. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 182(2), 314-330.
6. Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A. K., & Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological research*, 106(9), 996-1004.
7. Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural products*, 67(2), 257-268.
8. Eshboev, F., Karakozova, M., Abdurakhmanov, J., Bobakulov, K., Dolimov, K., Abdurashidov, A., Baymirzaev, A., Makhnyov, A., Terenteva, E., Sasmakov, S., Piyakina, G., Egamberdieva, D., Nazarov, P. A., & Azimova, S. (2023). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Secondary Metabolites of Endophytic Fungi Isolated from the Medicinal Plant *Hyssopus officinalis*. *Antibiotics*, 12(7), 1201.
9. Niyazmetov, A. R., Terent'eva, E. O., Khamidova, U. B., Khashimova, Z. S., Azimova, S. S., & Vinogradova, V. I. (2020). Synthesis of derivatives of the 2-arylquinoline alkaloid dubamine and their cytotoxicity. *Chemistry of Natural Compounds*, 56, 511-517.