



UDK: 579.66

Ikrom MARDONOV,

O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi Mikrobiologiya instituti tayanch doktoranti

E-mail: ikrom07021992@gmail.com

Nodira AZIMOVA,

O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi Mikrobiologiya instituti katta ilmiy xodimi, b.f.n

Zair SHAKIROV,

O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi Mikrobiologiya instituti yetakchi ilmiy xodimi, b.f.d., professor

Fazliddin QOBILOV,

O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi Mikrobiologiya instituti kichik ilmiy xodimi

Muhammad NAZIROV,

G'o'za seleksiyasi, ko'chatchiligi va yetishtirish agrotexnologiyalari ilmiy tadqiqot instituti kichik ilmiy xodimi

O'zMU dotsenti, PhD Sh.Qo'ziyev taqrizi asosida

HYPHOMICROBIUM FACILE BAKTERIYASINI AJRATISH VA IDENTIFIKATSIYA QILISH

Аннотация

Ushbu maqolada Toshkent qog'ozni qayta ishlash korxonasining oqava suvlaridan metilotrof bakteriyalarni ajratib olishga qaratilgan tadqiqot natijalari keltirilgan. Namunalardan *Hyphomicrobium facile* bakteriyasi ajratib olingan bo'lib, sarg'ish-qaymoq rangli, bo'rtma yuzali, grammanfiy tayoqchasimon bakteriya ekanligi ma'lum bo'lgan. 16S rRNK genlari asosida molekulyar genetik usulida identifikatsiya qilingan va NCBI GenBank ma'lumotlari ba'zasidagi *H. facile* turiga 100 % o'xshashligi ma'lum bo'lgan.

Kalit so'zlar. Metilotrof bakteriyalar, *Hyphomicrobium facile*, metanol, 16S rRNA, molekulyar identifikatsiya, metanol, metabolism, biotexnologik produsent, filogenetik tahlil, SCP (bir hujayrali organizm oqsili)

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИИ *HYPHOMICROBIUM FACILE*

Аннотация

В данной статье приведены результаты исследования, направленного на выделение метилотрофных бактерий из сточных вод Ташкентского завода по переработке бумаги. Из образцов была выделена бактерия *Hyphomicrobium facile*, которая представляет собой граммотрицательную палочковидную бактерию с выпуклой поверхностью и желтовато-кремовым цветом колоний. С помощью молекулярно-генетического метода, основанного на анализе генов 16S рРНК, была проведена идентификация, и установлено 100%-ное сходство с видом *H. facile* по базе данных NCBI GenBank.

Ключевые слова: метилотрофные бактерии, *Hyphomicrobium facile*, метанол, 16S рРНК, молекулярная идентификация, метанол, метаболизм, биотехнологический продуцент, филогенетический анализ, SCP (белок одноклеточных организмов)

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *HYPHOMICROBIUM FACILE* BACTERIUM

Annotation

This article presents the results of a study aimed at isolating methylotrophic bacteria from the wastewater of the Tashkent paper recycling plant. From the collected samples, the bacterium *Hyphomicrobium facile* was isolated. It was identified as a Gram-negative, rod-shaped bacterium with a convex surface and yellowish-cream colored colonies. Identification was carried out using a molecular genetic method based on the analysis of 16S rRNA genes, revealing a 100% similarity to *H. facile* according to the NCBI GenBank database.

Keywords: methylotrophic bacteria, *Hyphomicrobium facile*, methanol, 16S rRNA, molecular identification, methanol, metabolism, biotechnological producer, phylogenetic analysis, SCP (Single Cell Protein)

Kirish. Bugungi global oziq-ovqat xavfsizligi sharoitida oqsilga bo'lgan talab tobora ortib bormoqda. Aholi sonining o'sishi, urbanizatsiya, chorvachilik mahsulotlariga bo'lgan ehtiyojning ko'payishi oqibatida an'anaviy oqsil yetarli bo'lmay qolmoqda. Ayniqsa, chorvachilikda ozuqa sifatida qo'llaniladigan arzon va samarali ozuqa oqsili manbalarini topish muammosi dolzarb bo'lib qolmoqda.

Mikroorganizmlardan olingan oqsil - ya'ni mikrobial oqsil (Single-Cell Protein, SCP) zamonaviy biotexnologiyaning istiqbolli yo'nalishi bo'lib, u oziq-ovqat, dori-darmon va ayniqsa, chorva ozuqasi sanoatida keng qo'llanilmoqda [1]. Ushbu yo'nalishda foydalanish uchun *Hyphomicrobium facile* bakteriyasi alohida ahamiyatga ega hisoblanadi. *H. facile* - metilotrof bakteriyalardan biri bo'lib, metanol va boshqa bir karbonli birikmalarni o'zlashtirish xususiyatiga ega. Bu bakteriya metanol va formiat kabi arzon uglerod manbalarini samarali metabolizatsiya qilib, hujayrasida 60–70% gacha yuqori sifatli oqsil to'playdi [2].

H. facile - grammanfiy, tayoqchasimon shakldagi aerob bakteriya bo'lib, suv va tuproq muhitlarida keng tarqalgan. Uning eng muhim biokimyoviy xususiyati - bu metanol va formiat kabi oddiy uglerod birikmalarini metabolizatsiya qilish orqali o'sib, yuqori sifatli oqsil to'plash qobiliyatidir. Bakteriya 30–35 °C harorat va 6.5–7.5 pH sharoitida yaxshi rivojlanadi, bu esa uni sanoat miqyosida yetishtirish uchun qulay holga keltiradi [3].

H. facile - bu *Hyphomicrobium* avlodining eng ko'p o'rganilgan vakillaridan biri bo'lib, ularning genetik va metabolik xususiyatlari haligacha to'liq o'rganilmagan. Ushbu tadqiqotning maqsadi - *H. facile* bakteriyasini ajratib olish, morfologik-kultural xususiyatlarini o'rganish, molekulyar genetik usulda identifikatsiya qilish va uning filogenetik o'rni haqidagi ma'lumotlarni taqdim etishdan iboratdir.

Tadqiqot materiallari va usullar. Metilotrof *H. facile* bakteriyasini ajratib olish uchun Toshkent qog'ozni qayta ishlash korxonasi oqava suv namunalaridan foydalanildi. Bakteriya izolyatlarini ajratib olish uchun "K" (g/l): KH_2PO_4 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; NaCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; H_2O dist. – 1 l.; metanol – 1%; pH-7,2 tarkibli ozuqa muhiti tayyorlandi [4]. Suv namunalari 1 ml dan olinib, 1% li metanol solingan "K" ozuqa muhitida, 35°C haroratda, chayqatgichda (200 rpm) aylanish tezligida 5 kun davomida o'stirildi. So'ngra suyuq ozuqa muhitida o'stirilgan namunalar Petri chashkasiga 1% metanolli, agarli "K" ozuqasiga ekib olindi. O'sgan bakteriya koloniyalari alohida – alohida kolbalarda xuddi shu ozuqa muhitida va sharoitda o'stirildi. Shu usulda sof bakteriya izolyatlari ajratib olindi. Uglerod manbai sifatida foydalanilgan metanolli muhitda yaxshi o'sadigan bakteriyalarni tanlab olish uchun ozuqa muhiti tarkibidagi metanol miqdori 2% gacha oshirildi. 2% metanolli "K" ozuqasida 24 soat mobaynida faol o'sib, ko'p miqdorda biomassa to'plagan bakteriyalar tanlab olindi.

Alohida ajratib olingan izolyatlar koloniyasining morfologiyasi va mikroskopik ko'rinishi o'rganildi. Bakteriyalar Gramm usulida [5] bo'yaldi. Bakteriya hujayrasining morfologiyasini o'rganish "AxioLab 5" Zeiss (Germaniya) fazali kontrast optik mikroskop yordamida (10x100 marta kattalashtirilgan) amalga oshirildi.

Molekulyar genetik usulda identifikatsiya qilish. Bakteriya "K" suyuq ozuqa muhitida o'stirildi, DNK ajratish va 16S rRNA genini PCR orqali ko'paytirish amalga oshirildi.

DNK ajratish: *H. facile* bakteriyasining genom DNKsi modifikatsiyalangan Marmur usuli asosida [6] ajratildi. PCR uchun universal primerlar: Boshlang'ich praymer (27F): AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, tugallangan praymer (1492R): GGTTACCTTGTTACGACTT PCR reaksiyasi tarkibi (20 μL hajmda, GenPak® PCR MasterMix yordamida): 10 μL MasterMix, 8,2 μL ikki marotaba distillangan suv, 0,4 μL har bir primer, 1 μL DNK namuna, PCR sharoitlari:

- 1) Boshlang'ich denaturatsiya: 94 °C da 3 daqiqa, 2) Denaturatsiya: 94 °C da 40 soniya
- 3) Primer birikishi: 55 °C da 40 soniya, 4) Uzaytirish: 70 °C da 90 soniya (35 sikl)
- 5) Yakuniy uzaytirish: 70 °C da 7 daqiqa, 6) Natijani aniqlash: PCR mahsulotlari 1% agaroz gelida, etidium bromid bilan bo'yali elektroforez qilindi.

PCR mahsulotini tozalash va ketma-ketlikni aniqlash. PCR mahsuloti geldan ajratib olinib, QIAquick® Gel Extraction Kit yordamida tozalandi. Tozalangan DNK miqdori NanoPhotometer® N60 (Implen) qurilmasida o'lchandi. Sekvenlash jarayoni BigDye Terminator v3.1 va Applied Biosystems 3130 sekvenator (Thermo Fisher Scientific, AQSH) yordamida bajarildi. Olingan ketma-ketlik NCBI BLAST bazasi bilan solishtirildi. 16S rRNA geniga asoslangan fylogenetik daraxt MEGA-X dasturi (v10.1.8) yordamida tuzildi (7).

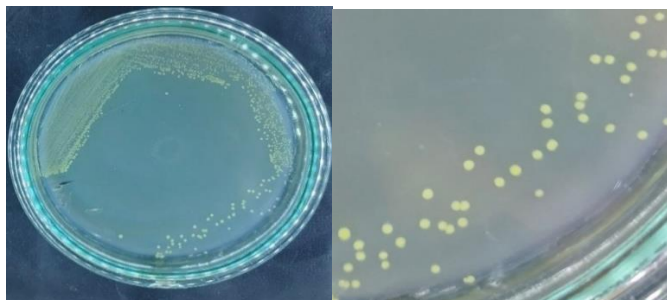
Tadqiqot natijalari. Olib kelingan suv namunalaridan jami 10 ta izolyat ajratib olindi, shulardan 1ta bakteriya izolyati metanolni yaxshi o'zlashtirish qobiliyatiga ega ekanligi ma'lum bo'ldi. Chunki ushbu bakteriya 2% metanolli ozuqa muhitida ham juda yaxshi o'sishi ya'ni 48 soat davomida o'stirilganda, hujayralar titri 10^9 KHB/ml ni tashkil qilishi aniqlandi.

Ajratib olingan bakteriya koloniyasining morfologiyasi o'rganilganda, doirasimon, sarg'ish-qaymoqrangda ekanligi, chetlari tekis, usti silliq, yuza qismi bo'rtganligi ma'lum bo'ldi. Mikroskop ostida o'rganilganda, hujayra shakli tayoqchasimon, o'ziga xos ipga o'xshash shaklli grammanfiy ekanligi aniqlandi (1-jadval, 1-2 rasmlar).

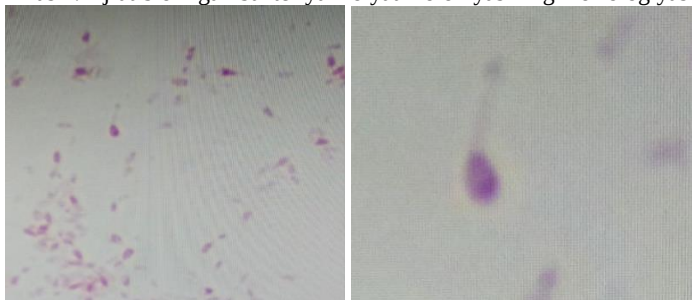
1-jadval

Ajratib olingan bakteriya izolyatining morfologik xususiyatlari

Izolyat raqami	Koloniyasi				Hujayrasi		
	Shakli	Rangi	Relyefi	Koloniyaning cheti	Struktu rasi	Shakli	Gram bo'yicha bo'yalishi
T-1	oval	sarg'ish-qaymoq	bo'rtgan	tekis	kichik donador	tayoqcha simon	manfiy



1-rasm. Ajratib olingan bakteriya izolyati koloniyasining morfologiyasi.



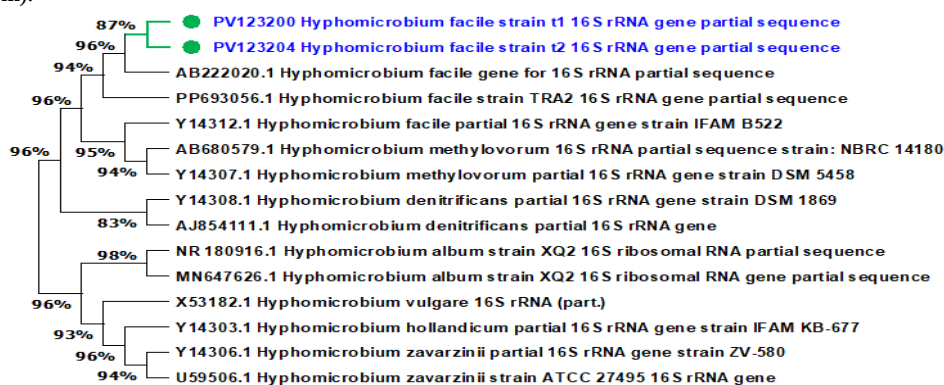
2-rasm. Ajratib olingan bakteriya izolyatining mikroskopik ko'rinishi (100x10 marta kattalashtirilgan)

Bakteriya molekulyar genetik usulda identifikatsiya qilindi va filogenetik daraxt tuzish uchun NCBI ma'lumotlar bazasidagi ma'lumotlar bilan solishtirildi. DNK ketma-ketligi Sanger usuli yordamida aniqlandi:

1 *H. facile*

AGACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTTCCCTATAGTACGGAATAGCCCAGGGAACCTTGGAGTAATACCGTATACGCCCCGAGAGGGGAAAGATTATCGCTATAGGATGGCCCCGCGTAGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCA
CCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTTTGAGAGAACGACGACACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCT
TAGGGTTGTAAAGCTCTTTTCCCGGGGACGATAATGACGGTACCCGGAAGAATAAGTCCCGGCTAACTTCGTGCCAG
CAGCCGCGTAATACGAAGGGGACTAGCGTTGTTCCGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGTGGATTGTAA
GTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAACCTGCCTTTGATACTGCAAGTCTTGAGTCCGATAGAGGTGGGT
GGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCCACTGGATCGG
TACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGG
ATGCTAGCCGTCGGATAGCTTGTCTGCTGGTGGCGCAGCTAACGCCATTAAAGCATCCCGCTGGGGAGTACGGCCG
AAGGTTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGA
AGAACCTTACCAGCTCTTGACATTCAGTATCGCTGGAGAGATCCGGGAATTCCAGCAATGGACAGTGGGACAG
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCATTA
GTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGGGACTGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
CATCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGCGCAGCCACCTAGCAATAGGG
CGCTAATCGCAAAAAGCCGTCTCAGTTCAGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
CGCGCATCGCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTCTT
ACCTTAAA.

16S rRNK geni ketma-ketligi tahlili shuni ko'rsatdiki, ajratilgan bakteriya *Hyphomicrobium* turkumiga mansub bo'lib, uning filogenetik yaqinligi *H. album* bilan DNK ketma-ketligini NCBI ma'lumotlar bazasida taqqoslanganda 98% o'xshashlik aniqlandi (3-rasm).



3-rasm. *H. facile* ning filogenetik daraxti Maksimal ehtimollik statistik usuli yordamida tuzilgan (Mega4 bioinformatika dasturi doirasida)

Xulosa. Tadqiqot natijalariga ko'ra, Toshkent qog'ozni qayta ishlash korxonasi oqava suvlaridan 2% metanolli ozuqa muhitida juda yaxshi o'sadigan, faol metilrotrof bakteriya ajratib olindi. Bakteriyaning morfologiyasi asosida uning *H. facile* turiga o'xshashligi tasdiqlandi. Molekulyar-genetik usulda identifikatsiya qilinganda *H. facile* turiga 100% o'xshashligi aniqlandi. Ajratib olingan bakteriyaning yagona uglerod manbai sifatida sanoat chiqindisi ko'rinishida to'planadigan, arzon xom-ashyo ya'ni metanolni yaxshi o'zlashtirish va ko'p biomassasi hosil qilish qobiliyatiga ega ekanligi muhim ko'rsatkich bo'lib, ushbu bakteriyadan kelgusida istiqbolli biotexnologik produsent sifatida foydalanish mumkin ekanligini ko'rsatadi.

ADABIYOTLAR

1. Raziq, Abdur et al. 02. Single cell protein (SCP) production and potential substrates: A comprehensive review. Pure and Applied Biology (PAB), [S.l.], v. 9, n. 3, p. 1743-1754, aug. 2020. ISSN 2304-2478. Available at: <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2020.90185>
2. Bratosin, B.C., Darjan, S. and Vodnar, D.C. (2021) Single Cell Protein: A Potential Substitute in Human and Animal Nutrition. *Sustainability*, 13, Article. 9284. <https://doi.org/10.3390/su13169284>.
3. Xun Wang, Foday Sahr, Ting Xue and Baolin Sun (2007) *Methylobacterium* *salsuginis*.sp. isolated from seawater. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.64877-0>.
4. Attwood, M. M., & Harder, W. (1972). A rapid and specific enrichment procedure for *Hyphomicrobium* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 38(1), 369–377. (<https://doi.org/10.1007/BF02328108>)
5. Manual of Methods for General Bacteriology PHILIPP GERHARDT, Editor-in-Chief Department of Microbiology and Public Health, Michigan State University, East Lansing, MI 48824 R. G. E. MURRAY, Editor, I. Morphology Department of Microbiology and Immunology University of Western Ontario, London, Ont., Canada N6A 5C1 1984
6. Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., & Goodfellow, M. (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Inc., New York. Pp. 115–176
7. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596–1599. doi:10.1093/molbev/msm092 (<https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>)