O‘ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI XABARLARI, 2024, [3/1/1]
ISSN 2181-7324

BIOLOGIYA
http://journals.nuu.uz
Natural sciences

UDK 579.222

Begali ALIKULOV,
Samarqand davlat universiteti Biokimyo instituti doktoranti
E-mail: balikulov87v@gmail.com
Diyora NARBAYEVA,
Samarqand davlat universiteti Biokimyo instituti magistranti
Sanjar TILLAYEV,
Samarqand davlat universiteti Biokimyo instituti dotsenti
Zafar ISMAILOV,
Samarqand davlat universiteti Biokimyo instituti professori

Samarqand davlat universiteti professori, b.f.d Z.Rajamuradov taqrizi asosida

VOLATILE SECONDARY METABOLITES OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM HALOPHYTES

Annotation

Today, when assessing the potential of bacteria isolated from plants, special attention is paid to studying their properties as a source of secondary metabolites. The purpose of this study is to identify and characterize volatile secondary metabolites of promising strains resistant to salinity and phytopathogens isolated from some halophytic plants. Data obtained from gas-liquid chromatography showed that the studied endophytic bacteria have the ability to secrete useful substances that can be used in practice.

Keywords. Halophyte, endophyte, bacteria, metabolite, gas chromatography.

ЛЕТУЧИЕ ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ГАЛОФИТОВ

Аннотация

Сегодня при оценке потенциала бактерий, выделенных из растений, особое внимание уделяется изучению их свойств как источника вторичных метаболитов. Целью данного исследования является выявление и характеристика летучих вторичных метаболитов перспективных штаммов, устойчивых к засолению и фитопатогенам, выделенных из некоторых галофитных растений. Данные, полученные на основе газожидкостной хроматографии, показали, что исследованные эндофитные бактерии обладают способностью выделять полезные вещества, которые можно использовать на практике.

Ключевые слова. Галофит, эндофит, бактерии, метаболит, газовая хроматография.

GALOFITLARDAN AJRATIB OLINGAN ENDOFIT BAKTERIYALARNING UCHUVCHAN IKKILAMCHI METABOLITLARI

Annotatsiya

Bugungi kunda o‘simliklardan ajratib olingan bakteriyalarning potensialini baholashda ularning ikkilamchi metabolitlar manbayi sifatidagi xususiyatlarini o‘rganishga alohida e’tibor qaratilmoqda. Mazkur tadqiqot ishida ayrim galofit o‘simliklardan ajratib olingan istiqbolli sho‘rlanish va fitopatogenlarga chidamli shtammlarning uchuvchan ikkilamchi metabolitlarini aniqlash va tavsiflash maqsad qilingan. Gaz suyuqlik xromatografiyasi asosida olingan ma’lumotlar tadqiq qilingan endofit bakteriyalar amaliyotda qo‘llash mumkin bo‘lgan foydali moddalar ajratish imkoniyatiga ega ekanligini ko‘rsatdi.

Kalit so‘zlar: Galofit, endofit, bakteriya, metabolit, gaz xromatografiya.

Kirish. Keyingi yillarda xorijiy mamlakatlar va mahalliy sharoitda o‘simliklar mikroflorasining biologik potensialidan foydalanishning innovatsion yo‘nalishlari bo‘yicha olib borilgan tadqiqotlarda ekstremal sharoitda o‘suvchi o‘simliklarni obyekt sifatida tanlash va tadqiq etish tendensiyasi ortib bormoqda. Ushbu tadqiqotlarda o‘simliklar, jumladan, kserofit va galofit o‘simliklardan ajratib olingan bakteriyalarning potensiali ularning o‘simliklar rivojlanishini stimullovchi yoki fitopatogenlardan himoyalovchi vositalar, foydali ikkilamchi metabolitlar manbayi sifatidagi xususiyatlaridan kelib chiqqan holda baholanmoqda [6]. Ma’lumki, mikroorganizmlar hayotiy jarayonlari davomida o‘zlarining hayot faoliyati va rivojlanishida ishtirok etmaydigan moddalar ajratadi. Ushbu moddalar xo‘jayin organizmga raqobat muhitida boshqa mikroorganizmlar va antigenlarga nisbatan ustunlik taqdim qiladi. Ko‘pchilik mikroorganizmlarning metabolitlari antibiotiklik, fungisid, insektisid, fitotoksik va antibakterial xususiyatlari orqali namoyon bo‘ladigan keng biologik faollikka ega bo‘ladi [9]. Amaliyotda keng qo‘llanilayotgan bakterial shtammlarning stress omillar ta’sirida o‘simliklar o‘sishini rag‘batlantirishi va fitopatogenlarga chidamliligining mexanizmlari bevosita ular tomonidan ajratiladigan metabolitlarning kimyoviy xossalariga asoslangan [1]. Shu bois, istiqbolli bakteriyalar sifatida tanlab olingan shtammlarning ikkilamchi metabolitlarini aniqlash va tavsiflash muhim ilmiy-amaliy ahamiyat kasb etadi.

Mazkur tadqiqotning maqsadi galofit o‘simliklardan ajratib olingan ayrim bakterial shtammlarning ikkilamchi metabolitlarini aniqlash va tavsiflashdan iborat.

Tadqiqot obyektlari va usullari. Tadqiqotda obyekt sifatida Samarqand davlat universiteti Molekulyar biotexnologiya ilmiy laboratoriyasi Mikroorganizmlar kolleksiyasida saqlanayotgan galofit o‘simliklardan ajratib olingan bakteriyalarning sho‘rlanish va fitopatogenlarga chidamli *B. amyloliquefaciens* HAPH2, *P. chlororaphis* HAST17 va *B. pumilus* SSU4 shtammlari olindi.

Bakterial shtammlar M9 minimal ozuqa muhitida (g/l: Na_2HPO_4 6, KH_2PO_4 3, NaCl 0,5, NH_4Cl 1; sterilizatsiyadan so‘ng 1M $MgSO_4*7H_2O$ 1 ml, 20%li glitserin 10 ml, vitamin B_1 1 gr) 28ºC da 72 soat o‘stirildi. O‘stirishdan so‘ng hosil bo‘lgan bakterial kulturalar tarkibidagi ikkilamchi metabolitlar Ajilogba va boshqalar (2019) tomonidan taklif qilingan usul asosida gaz suyuqlik xromatografiyasi yordamida o‘rganildi [2].

Tajribalarda SE-30 sistemasi to‘ldirilgan, BP-1 kapillyar kolonkasi bilan jihozlangan Xromatek-Analitik “Kristall-9000” gaz-suyuqlik xromatografiyasi (Rossiya) (30 m × 0,32 mm ichki diametr, 0,5 mkm plyonkaning qalinligi) yordamida, alanga-ionizatsion detektorda noma’lum uchuvchan moddalar aniqlandi. Moddalarning ajralish va aniqlash jarayoni parametrlari quyidagicha:

- kolonka harorati, minutiga 10°C tezlik bilan oshib borgan holda 60°C, 1 min; 130°C, 2 min.; 200°C, 3 min.; 260°C, 2 min.; 300°C, 2 minut;
- detektor harorati - 310°C;
- vodorod sarfi - 25 ml/min; havo sarf i-250 ml/min; purkaladigan gaz (podduvnoy) sarfi - 25 ml/min;
- tashuvchi gaz (azot), doimiy oqim tezligi - 1.9 ml/min. (namuna kiritish: bo‘laklarga ajratilgan holda, oqimning bo‘linish darajasi - 40; bosim: 65.243 kPa);
- namuna kiritish bo‘lmasi harorati - 290°C;
- kiritilgan namuna miqdori - 0.3 mkl;
- analiz uchun sarflangan vaqt – 10 minut.

Tadqiqot natijalari va ularning muhokamasi. Endofit bakteriyalarning metabolitlarini o‘rganishga qaratilgan bir qator xorijiy tadqiqotlar tahlili asosida, standart usul tarkibi uchun quyidagi moddalar tanlandi:

1.3-metil-1-butanol ($C_5H_{12}O$) - *Sclerotinia sclerotiorum, Colletotrichum gloeosporioides* va *Colletotrichum acutatum* larga nisbatan antibakterial xususiyatga ega, *Botrytis cinerea* va *Verticillium dahlia* fitopatogenlarining o‘sishini ingibirlaydi. Shuningdek, ushbu modda o‘simlikni havo orqali kelib chiqadigan ichki ifloslanishdan saqlaydi [4, 14].

2.2,4-di-tret-butilfenol ($C_{14}H_{22}O$) – antioksidantlik, sitotoksik, insektisid, nematotsid, antibakterial, antifungal va fitotoksik faollikka ega bo‘lgan zaharli modda. Bir qator tadqiqotchilar tomonidan *B. licheniformis, B. subtilis. A. oryzae, P. polymuxa, P. monteilii* va *S. mutabilis* kabi bakteriyalardan ajratib olingan va faolligi tekshirilgan [18].

3.Butanol-1 ($C_4H_{10}O$) - mikrobial fermentatsiya natijasida hosil bo‘lgan muhim kimyoviy modda. Biroq, uning mikroblarga toksikligi hujayraviy ishlab chiqarishni ma’lum darajada cheklaydi [8]. *O. heracleoticum* L. o‘simligidan ajratib olingan *Arthrobacter* sp. OHF5, *Priestia* sp. OHF7, Pseudarthrobacter sp. OHF15, *Bacillus* sp. OHL23 va *Arthrobacter* sp. OHL24 shtammlaridan ikkilamchi metabolit sifatida ajralishi aniqlangan va patogenlarga nisbatan faollikka ega bo‘lgan modda sifatida tavsiflangan [17].

4.Atsetofenon (C_8H_8O) – yog‘ tabiatli aromati keton bo‘lib, ayrim manbalarda metilfenilketon tarzida ham beriladi. *Beta vulgaris* va *B. maritima* o‘simligidan ajratilgan *Streptomyces* sp. B86, *Pantoea* sp. Dez632, *Pseudomonas* sp. Bt851 va *Stenotrophomonas* sp. Sh622 endofit bakteriyalari shtammlar tomonidan ishlab chiqarilgan uchuvchan moddalar, jumladan, atsetofenon ushbu shtammlarning qand lavlagi ildiz chirishi kasalligining qo‘zg‘atuvchisi *Bacillus pumilus* Isf19 ga chidamli bo‘lishini ta’minlaganligi qayd qilingan [17].

5.Tetrametilpirazin ($C_8H_{12}N_2$) – tarkibida azot saqlaydigan geterosiklik birikma. Antioksidantlik xususiyatiga ega bo‘lgan mazkur modda hayvonlarda muhim funksiyalarni bajarishda ishtirok etish bilan bir qatorda, o‘simliklarda stress omillar ta’sirida vujudga keladigan oksidativ stress jarayonini yengishga yordam ko‘rsatadi [7, 10].

6.Tetradekan ($C_{14}H_{30}$) – asiklik uglevodorod (alkan) bo‘lib, Dhouib va boshqalar (2019) tomonidan pomidor o‘simligida vilt kasalligini keltirib chiqaruvchi zamburug‘ga nisbatan antifungal xususiyatga ega endofit bakteriyalar tomonidan ajratilgan metabolitlardan biri sifatida tavsiflangan [3].

7.Ftal kislota ($C_8H_6O_4$) – turli birikmalar holida yuqori antifungal xususiyat namoyon qiluvchi modda hisoblanadi. Ilmiy manbalarda *G. uralensis* o‘simligidan ajratib olingan *B. atrophaeus* XEGI50 shtammining *V. dahlia* fitopatogeniga chidamligigini ta’minlashda bakteriyadan ajraladigan ftal kislota birikmalarining ahamiyati yuqoriligi qayd qilingan [11].

8.Geksadekan ($C_{16}H_{34}$) – asiklik uglevodorod (alkan) hisoblaadi. *Lotus corniculatus* and *Oenothera biennis* o‘simliklaridan ajratib olingan endofit bakteriyalarning *Rhodococcus* sp. shtammlaridan uchuvchan metabolit sifatida geksadekan ajralganligi to‘g‘risida ma’lumotlar mavjud [13].

Tajribalarda nazorat sifatida, bakteriyasiz M9 oziqa muhiti va *E. coli* kultural suyuqligidan foydalanildi. Tajriba natijalari 1-jadvalda keltirilgan.

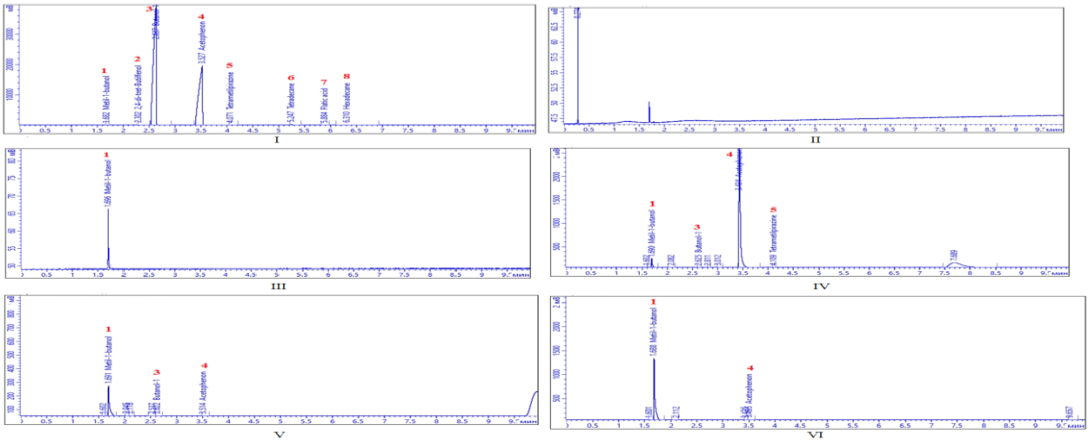
1–jadval

Mirob preparati uchun asos bo‘ladigan shtammlarning uchuvchan ikkilamchi metabolitlari

№	Metabolitlarning nomi	Yutilish (minut)	Nazorat (Minamal ozuqa muhiti)	*E. coli*	*B. amyloliquefaciens* HAPH2	*P. chlororaphis* HAST17	*B. pumilus* SSU4
1.	3-metil-1-butanol	1.685	-	+	+	+	+
2.	2,4-di-tret-butilfenol	2.302	-	-	-	-	-
3.	Butanol-1	2.637	-	-	+	+	-
4.	Atsetofenon	3.527	-	-	+	+	+
5.	Tetrametilpirazin	4.071	-	-	+	-	-
6.	Tetradekan	5.547	-	-	-	-	-
7.	Ftal kislota	5.884	-	-	-	-	-
8.	Geksadekan	6.310	-	-	-	-	-
9.	Standartga kiritilmagan moddalar (soni va yutilish vaqti)		1 (0.274)	-	5 (1.602; 2.082; 2.811; 3.012; 7.689)	4 (1.602; 2.045; 2.118; 2.537)	4 (1.601; 2.112; 3.425; 9.657)

Nazorat sifatida tekshirilgan minimal ozuqa muhiti (M9) GSX xromatogrammasi tahliliga ko‘ra, ushbu namunada standartdagi moddalar uchramadi. Faqat unda yutilish vaqti 0.274 minutga teng bo‘lgan, standartga kiritilmagan modda mavjudligi qayd qilindi (1-rasm, II). *E. coli* kultural suyuqligining GSX xromatogrammasi mazkur bakteriya kultural

suyuqligida standartga kiritilgan moddalardan faqat bittasi, ya’ni yutilish vaqti 1.685 minutga teng bo‘lgan 3-metil-1-butanol uchrashini ko‘rsatdi (1-rasm, III).



1-rasm. Bakterial kultural GSX xromatogrammasi (I - Standart namunalar; II - Minimal ozuqa muhiti (M9); III – *E. coli*; IV - *B. amyloliquefaciens* HAPH2; V- *P. chlororaphis* HAST17; VI - *B. pumilus* SSU4)

B. amyloliquefaciens HAPH2 shtammi kultural suyuqligining GSX xromatogrammasi tahlil qilinganda, ushbu bakteriya o‘zidan 3-metil-1-butanol, butanol-1, atsetofenon va tetrametilpirazin kabi moddalarni ajratish mumkinligi qayd qilindi. Shuningdek, ushbu bakterial shtamm kultural suyuqligida yutilish vaqti 1.602; 2.082; 2.811; 3.012; 7.689 minut bo‘lgan, jami 5 ta standartga kiritilmagan moddalar mavjudligi aniqlandi (1-rasm, IV). *P. chlororaphis* HAST17 shtammi kultural suyuqligining GSX xromatogrammasiga ko‘ra, mazkur bakterial shtamm hayotiy faoliyati natijasida 3-metil-1-butanol, butanol-1 va atsetofenon bilan birgalikda standartga kiritilmagan jami 4 ta boshqa moddalar (yutilish vaqti 1.602; 2.045; 2.118; 2.537 minut) ham hosil qiladi (1-rasm, V). *B. pumilus* SSU4 shtammi kultural suyuqligining GSX xromatogrammasi tahlil qilinganda, ushbu bakteriya o‘zidan 3-metil-1-butanol va atsetofenon kabi moddalarni ajratish mumkinligi qayd qilindi. Shuningdek, mazkur bakterial shtamm kultural suyuqligida yutilish vaqti 1.601; 2.112; 3.425; 9.657 minut bo‘lgan, jami 4 ta standartga kiritilmagan moddalar mavjudligi aniqlandi (1-rasm, VI).

Bakterial shtammlar kultural suyuqligida nazorat sifatida tekshirilgan oziqa muhiti va *E. coli* kultural suyuqligidan farqlanuvchi moddalarning aniqlanganligi, galofitlardan ajratib olingan endofit bakteriyalar yuqori biologik faollikka ega bo‘lgan metabolitlar hosil qilishini asoslaydi, ularning biologik faol moddalar sintezi yo‘nalishda ham ma’lum darajada potensialga ega ekanligini ko‘rsatadi.

Bir qator tadqiqotlarda o‘simliklardan ajratib olingan endofit bakteriyalarning ikkilamchi metabolitlari o‘rganilgan. Aniqlangan metabolitlarning aksariyati alkaloidlar, steroidlar, terpenoidlar, peptidlar, poliketonlar, flavonoidlar, fenollar, antibiotiklar va boshqa guruhga kiradi. Endofit bakteriyalar ikkilamchi metabolitlarni sintezlash bilan bir qatorda, organik sintez jarayonlarini boshqarishda ishtirok etadigan birikmalar ham hosil qilishi mumkin [12]. Semenzato va boshqalar (2024) tomonidan olib borilgan tadqiqotlarda *O. heracleoticum* L. dorivor o‘simligidan ajratib olingan endofit bakteriyalarning *Bacillus* sp. va *Pseudomonas* sp. shtammlari ikkilamchi metabolitlar sifatida 2-etil-1-geksanol, 2-propanol, 2-butanon, 1-butanol, 3-metil-1-butanol, atseton, izopirin kabi uchuvchan moddalarni hosil qilganligi aniqlangan [18]. Kai (2020) ning ma’lumotlariga ko‘ra, *Bacillus subtilis* ning turli manbalardan ajratilgan 24 ta shtammining uchuvchan metabolitlari o‘rganilganda, ulardan 10 ta shtamm benzaldegid, 7 ta shtamm atsetofenon, 6 ta izolyat trimetilpirazin, 5 ta izolyat asetoin, 1-butanol va 4 ta izolyat tetradekan, 3-metil-1-butanol, geksadekan hosil qilish xususiyatiga ega ekanligi qayd qilingan [5].

Xulosa. Tahlil qilingan ma’lumotlardan kelib chiqqan holda, *B. amyloliq*uefaciens HAPH2, *P. chlororaphis* HAST17 va *B. pumilus* SSU4 shtammlari fitopatogenlarga nisbatan antagonistik xususiyatlarini namoyon qilish va stress omillar ta’siri ostidagi sharoitda o‘simliklar o‘sishini stimullash uchun o‘zlarining ikkilamchi metabolitlaridan foydalanishga asoslangan mexanizmlarga ega, deb hisoblaymiz.

ADABIYOTLAR

1. Ahmad I, Pichtel J, Hayat S (eds.). Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth. John Wiley & Sons, NY. USA.
2. Ajilogba, C.F., Babalola, O.O. 2019. GC–MS analysis of volatile organic compounds from Bambara groundnut rhizobacteria and their antibacterial properties. World J Microbiol Biotechnol 35, 83. DOI: 10.1007/s11274-019-2660-7.
3. Dhouib, H., Zouari, I., Abdallah, D. B., Belbahri, L., Taktak, W., Triki, M. A., et al. 2019. Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against *Verticillium wilt* disease. Biol. Control. 139, 104092. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.104092
4. Diem-Kieu Nguyen, Tri-Phuong Nguyen, Yi-Rong Li, Masaru Ohme-Takagi, Zin-Huang Liu, Thach-Thao Ly, Van-Anh Nguyen, Ngoc-Nam Trinh, Hao-Jen Huang. 2024. Comparative study of two indoor microbial volatile pollutants, 2-Methyl-1-butanol and 3-Methyl-1-butanol, on growth and antioxidant system of rice (*Oryza sativa*) seedlings. Ecotoxicology and Environmental Safety, 272, 116055. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.116055
5. Kai M. 2020. Diversity and Distribution of Volatile Secondary Metabolites Throughout *Bacillus subtilis* Isolates. Front. Microbiol. 11:559. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00559
6. Khalaf EM, Raizada MN. 2018. Bacterial Seed Endophytes of Domesticated Cucurbits Antagonize Fungal and Oomycete Pathogens Including Powdery Mildew. Front. Microbiol 9: 42. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00042
7. Kosuge T, Kamiya H. 1962. Discovery of a Pyrazine in a Natural Product : Tetramethylpyrazine from Cultures of a Strain of *Bacillus subtilis*. Nature 193, 776. DOI: 10.1038/193776a0

8. Li, Q., Zhang, J., Yang, J. et al. Recent progress on n-butanol production by lactic acid bacteria. 2021. World J Microbiol Biotechnol 37, 205. DOI: 10.1007/s11274-021-03173-5
9. Mehnaz S. 2013. Secondary metabolites of Pseudomonas aurantiaca and their role in plant growth promotion, pp. 373-393. In Arora NK (ed.). Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances. Springer, Berlin-Heidelberg. Germany
10. Meng, W., Ding, F., Wang, RM. et al. 2020. Enhanced Production of Tetramethylpyrazine in *Bacillus licheniformis* BL1 through aldC Over-expression and acetaldehyde Supplementation. Sci Rep 10, 3544. DOI: 10.1038/s41598-020-60345-3
11. Mohamad OAA, Li L, Ma J-B, Hatab S, Xu L, Guo J-W, Rasulov BA, Liu Y - H, Hedlund BP, Li W-J. 2018. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Endophytic Bacterial Populations From Chinese Traditional Medicinal Plant Licorice and Characterization of the Bioactive Secondary Metabolites Produced by Bacillus atrophaeus Against Verticillium dahliae. Front. Microbiol. 9:924. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00924
12. Pandey SS, Singh S, Babu CSV, Shanker K, Shrivastava NK, Kalra A. 2016. Endophytes of opium poppy differentially modulate host plant productivity and genes for the biosynthetic pathway of benzylisoquinoline alkaloids. Planta 243: 1097–1114. DOI:10.1007/s00425-016-2467-9
13. Phillips, L. A., Germida, J. J., Farrell, R. E., Greer, C. W. 2008. Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. Soil Biol. Biochem. 40, 3054–3064. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.09.006
14. Rezende, D.C., Fialho, M.B., Brand, S.C., Blumer, S., Pascholati, S.F., 2015. Antimicrobial activity of volatile organic compounds and their effect on lipid peroxidation and electrolyte loss in Colletotrichum gloeosporioides and Colletotrichum acutatum mycelia. Afr. J. Microbiol. Res. 9, 1527–1535. DOI: org/10.5897/AJMR2015.7425.
15. Rovera M, Carlier E, Pasluosta C, Avanzini G, Andrés J, Rosas S. 2008. Pseudomonas aurantiaca SR1: plant growth promoting traits, secondary metabolites and crop inoculation response, pp. 155-163.
16. Safara S, Harighi B, Bahramnejad B, Ahmadi S. 2022. Antibacterial Activity of Endophytic Bacteria Against Sugar Beet Root Rot Agent by Volatile Organic Compound Production and Induction of Systemic Resistance. Front. Microbiol. 13: 921762. DOI: 10.3389/fmicb.2022.921762
17. Semenzato G, Bernacchi A, Amata S, Bechini A, Berti F, Calonico C, Catania V, Esposito A, Puglia AM, Piccionello AP, Emiliani G, Biffi S, Fani R. 2024. Antibacterial Properties of Bacterial Endophytes Isolated from the Medicinal Plant *Origanum heracleoticum* L. *Front. Biosci. (Landmark Ed*; 29(3): 111. DOI: 10.31083/j.fbl2903111
18. Zhao F, Wang P, Lucardi RD, Su Z, Li S. 2020. Natural Sources and Bioactivities of 2,4-Di-Tert-Butylphenol and Its Analogs. Toxins. 12(1): 35. DOI: 10.3390/toxins12010035