



**METILOTROF BAKTERIYALARNI AJRATIB OLISH, SKRINING QILISH
VA XUSUSIYATLARINI O‘RGANISH**

<https://doi.org/10.70728/a.series.v08.i02.078>

Sa‘dullayev Sh.T., Maxsumxanov A.A., Alimova B.X., Pulatova O.M.

*O‘zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi
Mikrobiologiya instituti, Toshkent sh., O‘zbekiston,
e-mail: shohruhsadullayev95@gmail.com*

Annotatsiya.Maqolada o‘zbekiston hududidan ilk bor metilotrof bakteriya izolyatlari ajratib olingan. Faqat metanol qo‘shilgan meniral ozuqa-muhitida o‘sib rivojlanadigan metilotrof bakteriya izolyatlarining xususiyatlari tasnifi bayon qilingan. Bakteriya izolyatlari gram-manfiy bakteriyalar guruhiga mansubligi, uglevod va ko‘p atomli spirtlarni o‘zlashtirmasligi, kislota hamda gaz hosil qilmasligi aniqlangan. 1% NaCl qo‘shilgan ozuqa-muhitida o‘sib rivojlanishi, boy ozuqa-muhitida o‘smasligi, L-tirozinni parchalash xususiyatiga ega emasligi, nitratlarni nitritlarga qaytarishi ko‘rsatilgan. Izolyatlar uchun o‘stirishning harorati 30°C va ozuqa-muhitining pH ko‘rsatkichi 7,0-7,5 bo‘lishi optimal ekanligi aniqlangan.

Kalit so‘zlar: metilotrof, izolyat, o‘stirish, ozuqa-muhiti, morfologiya, fiziologiya.

Abstract.This article highlights the research conducted on methylotrophic bacteria including their first ever isolation in Uzbekistan. The characteristics of these bacteria capable of growing only methanol added mineral media supplement are also described. It was determined that the isolates belong to the Gram – negative bacterial group; they do not utilize carbohydrates or polyhydric alcohols and do not produce gas or acid. The study also demonstrates the ability of growing on media containing 1% NaCl of the bacteria but failing to do so on enriched media. Furthermore, they lack the ability to decompose L-tyrosine and are capable of reducing nitrates to nitrites. The optimal growth conditions for these isolates were found to be a temperature of 30°C and a medium pH of 7.0–7.5.

Key words: methylotrophe, isolate, cultivation, nutrient medium, morphology, physiology.

Аннотация.В данной статье первые описаны метилотрофные бактериальные изоляты, выделенные из территории Узбекистана. Описана характеристика метилотрофных бактериальных изолятов, которые растут и развиваются только в минеральной метанолсодержащей среде. Установлено, что бактериальные изоляты относятся к группе грамотрицательных бактерий, не поглощают углеводы и

многоатомные спирты, не продуцируют кислоты и газы. Показано, что они растут в среде с добавлением 1% NaCl, не растут в богатых питательными веществами средах, не обладают способностью разлагать L-тирозин и восстанавливать нитраты до нитритов. Выявлено, что оптимальная температура культивирования этих изолятов составляет 30°C, а pH среды — 7,0–7,5.

Ключевые слова: метилотроф, изолят, культивирование, питательная среда, морфология, физиология.

KIRISH. Jahon aholisining tez o‘shishi va an’anaviy oqsil manbalarining cheklanganligi yangi, barqaror va iqtisodiy samarali oqsil manbalarini izlashni taqozo etmoqda [1.2]. So‘nggi yillarda mikroorganizmlar tomonidan ishlab chiqariladigan ozuqaviy oqsillar, xususan single-cell protein (SCP) konsepsiyasiga bo‘lgan qiziqish keskin ortmoqda. SCP mikroorganizmlar - bakteriyalar, achitqilar, mikroskopik zamburug‘lar va suvo‘tlari biomassasidan olinadigan yuqori oqsilli mahsulot bo‘lib, u inson va hayvonlar oziqlanishida qo‘shimcha yoki alternativ oqsil manbai sifatida qo‘llanilishi mumkin [3]. SCP ning asosiy afzalliklari sifatida uning yuqori oqsil miqdori, aminokislotalar tarkibining muvozanatligi, tez biomassa to‘plash qobiliyati va yil fasllariga bog‘liq emasligi qayd etiladi. SCP ishlab chiqarishda turli mikroorganizmlar qo‘llanilsa-da, so‘nggi tadqiqotlarda metilotrof bakteriyalar alohida e‘tiborga sazovor bo‘lmoqda. Metilotrof bakteriyalar metanol, metan, format va boshqa bir uglerodli (C1) birikmalarni yagona uglerod va energiya manbai sifatida o‘zlashtira oladigan mikroorganizmlar hisoblanadi [4.5]. Ushbu xususiyat ularni arzon va mavjud substratlar asosida biomassa ishlab chiqarish uchun juda qulay obyektga aylantiradi. Metilotrof bakteriyalar tez o‘shishi, yuqori biomassa hosil qilishi va oqsil miqdorining 60–80% gacha yetishi bilan ajralib turadi. Shu bilan birga, ularning sanoat chiqindilari, metan yoki metanol asosida o‘stirilishi ekologik jihatdan ham maqbul hisoblanadi. Shu sababli, metilotrof bakteriyalar SCP ishlab chiqarish uchun istiqbolli mikroorganizmlar sifatida qaralmoqda va ular asosida biotexnologik jarayonlarni ishlab chiqish bo‘yicha keng ko‘lamli ilmiy tadqiqotlar olib borilmoqda [6.7]

ADABIYOTLAR TAHLILI VA METODLAR

Mazkur tadqiqot ishida, metilotrof bakteriya shtamlarini ajratib olish uchun tadqiqot obekti sifatida Respublikamizning turli hududlaridan jami 78 ta har xil tuproq, suv, issiq buloq suvi, balchiq, neft qoldiqlari, neft koni atrofidagi balchiq, daryo balchiqlari, eski baliq ko‘li havzalari, sholi dalalari tuproqlaridan olingan namunalar tabiiy manba sifatida foydalanildi.

Datlab metilotrof bakteriyalarni yig‘ma kulturalarini o‘stirish uchun “NMS” mineral ozuqa muhitidan [8]. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,0 g/l; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 g/l; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ - 0,05 g/l; KH_2PO_4 - 0,05 g/l; CaCl_2 - 0,2 g/l, Трилон Б ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) - 0,005 g/l, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,002 g/l, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 mg/l, CoCl_2 - 0,2 mg/l, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,03 mg/l, CuCl_2 -

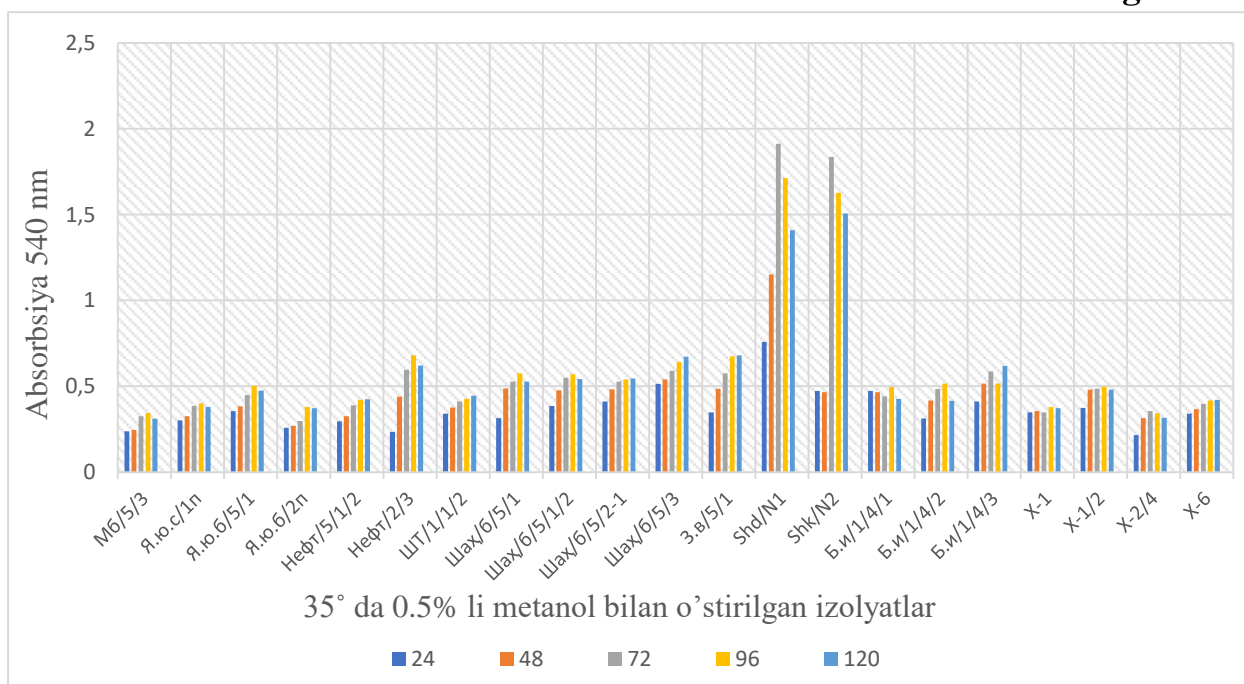
0,01 mg/l, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,02 mg/l, Na_2MoO_4 - 0,03 mg/l. 0.5% metanol pH=6,8-7,0 keyinchalik metilotrof bakteriyalarni ajratish uchun quyidagi tarkibga ega “K” ozuqa muhitidan foydalanildi. KH_2PO_4 2.0 g/l; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 2.0 g/l; Na Cl 0.5 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g/l; pH=7,0-7,2 uglerod manbai sifatida 0.5% metanol ishlatilgan [9].

Bunda erlenmeyer kolbalarda tayyorlangan 90 ml “NMS” va “K” suyuq ozuqa muhitiga olib kelingan namunalardan 10 ml yoki 10 gr dan ekilib, kolbalar sheyker inkubatorida 180 ayl./daq. tezlikda, 35°C da 7 kun o‘stirildi. 7 kundan so‘ng “NMS” va “K” suyuq ozuqa muhitiga ekilgan namunalarda o‘zgarish kuzatildi, ya’ni kolbalardagi ozuqa muhiti xiralashgani kuzatildi. Kolbalarda o‘sgan kulturalarni fiziologik eritmada 10^{-5} marta suyultirilib, Petri chashkasiga tayyorlangan “NMS” va “K” qattiq ozuqa muhitiga ekildi, alohida ajralib o‘sib chiqqan koloniyalardan bakteriologik xalqa yordamida olib fiziologik eritmada suyultirilib yangi chashkalarga ekildi. Ajratib olingan izolyatlar mikroskopda va gram usulida bo‘yash yo‘li bilan tadqiq qilindi.

NATIJAR VA MUHOKAMA

Olib borilgan tadqiqotlarda 78 ta namunadan suyultirib ekish natijasida 54 ta bakteriya izolyatlari agarli “K” mineral ozuqa muhitida inkubatsiya qilib ajratib olindi. Ajratib olingan bakteriya izolyatlardan 21 tasi gram-manfiy tayoqchalar va metilotroflarga xos morfologik xususiyatlarga ega kokklar ekanligi aniqlandi. Bu metilotroflarga xos belgilardan biri hisoblanadi [10]. Ajratib olingan 21 ta izolyatlar “K” suyuq ozuqa muhitida 35°C da 0.5% li metanol bilan o‘stirildi, biomassa hosil qilishi, hujayra suspenziyasining optik zichligini o‘lchash bilan tadqiq qilindi (1-diagramma).

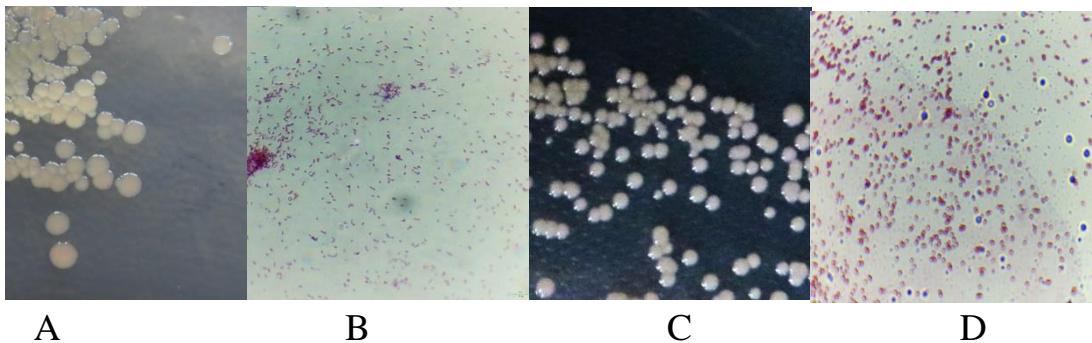
1-diagramma



1- diagramma izolyatlarning 0.5% li metanol bilan “K” mineral suyuq ozuqa muhitida o‘sishi.

Suyuq ozuqa muhitida 0.5% metanol bilan o‘stirish natijasida 2 ta eng yuqori biomassa hosil qilgan Shd-N1 va Shk-N2 izolyatlar tanlab olindi. O‘rganilgan Shd-N1 bakteriya izolyati metanolli qattiq agarli ozuqa muhitida koloniyalarining shakli dumoloq qaymoq va krem rangdagi yumshoq konsistensiyali koloniyalar hosil qildi, hamda Shk-N2 shakli dumoloq, yaltiroq, silliq, cheti tekis, ko‘tarilgan pushti rangdagi qavariq yumshoq konsistensiyali koloniyalar hosil qildi [10]. Koloniyalar o‘sib borishi bilan ular hajmi kattalashadi. Polimorf shakllarini hosil qilishi kuzatilmadi. Gram usulida bo‘yash va KOH-testi asosida o‘tkazilgan tadqiqotlarda Shd-N1 va Shk-N2 bakteri izolyatlari gram-manfiy bakteriyalar guruhiga kirishi va bu bilan u *Methylobacillus* va *Hansschlegelia* avlodi bakteriyalariga taksonomik jihatdan yaqinligi aniqlandi (1-rasm). Dastlabki natijalar boshqa mualliflarning tadqiqotlarida keltirilgan xuddi shunday morfologik-kultural xususiyatlarga ega bo‘lgan, *Methylobacillus* va *Hansschlegelia* avlodi bakteriyalariga mos kelishini ko‘rsatdi hamda ular o‘z biomassasida ko‘p miqdorda ozuqaviy oqsil to‘plashi to‘g‘risida ma‘lumotlar berilgan [11].

1-rasm



1- rasm Shd-N1 bakteriya izolyatining (A) agarli ozuqa muhitida o‘sgan koloniyasi (B) Gram usulida bo‘yalgan hujayralari Shk-N2 (C) agarli ozuqa muhitida o‘sgan koloniyasi (D) Gram usulida bo‘yalgan hujayralari

Shd-N1 va Shk-N2 bakteriya izolyatining fiziologik-biokimyoviy xususiyatlarini o‘rganish uchun izolyatlar, Glyukoza, Saxaroza, Laktoza, Ramnoza, Rafinoza, Mannit, Glitserin, Galaktoza va Arabinoza kabi uglevod va ko‘p atomli spirtlar 1% qo‘shilgan “K” mineral ozuqa muhitida o‘stirildi 1-jadvalda keltirilgan natijalardan ko‘rinib turibdiki, bakteriya izolyatlarini biron-tasida ham biomassa, kislota va gaz hosil qilmasligi kuzatilgan. Ushbu bakteriya shtammi 1%-li NaCl qo‘shilganda muhitda o‘sishi, peptonli boy ozuqa muhitida o‘smasligi va L-tirozinni parchalamasligi aniqlangan. Nitratlarni nitritlarga qaytarilishini nitratreduktaza fermentiga ega va azot manbai sifatida nitratlardan foydalanadigan mikroorganizmlar amalga oshiradi [12]. Olingan natijalar shuni ko‘rsatdiki Shd-N1 va Shk-N2 izolyatlari ham nitratlarni nitritlarga qaytarar ekan.

1-jadval

Shd-N1 va Shk-N2 bakteriya izolyatlarining ayrim fiziologik-biokimyoviy xususiyatlari

Uglevod va ko‘p atomli spirtlar nomi	Bakteriya izolyatlari					
	Shd-N1			Shk-N2		
	Kultura o‘sishi	Kislota hosil qilishi	Gaz hosil qilishi	Kultura o‘sishi	Kislota hosil qilishi	Gaz hosil qilishi
Glyukoza	-	-	-	-	-	-
Saxaroza	-	-	-	-	-	-
Laktoza	-	-	-	-	-	-
Ramnoza	-	-	-	-	-	-
Rafinoza	-	-	-	-	-	-
Mannit	-	-	-	-	-	-
Glitserin	-	-	-	-	-	-
Galaktoza	-	-	-	-	-	-
Arabinoza	-	-	-	-	-	-
Metanol(nazorat)	+++	-	-	+++	-	-

Izoh: +++ yaxshi o‘sgan, - o‘smagan, kislota va gaz hosil qilmagan

Shd-N1 va Shk-N2 izolyatlari davriy o‘stirish dinamikasida biomassa to‘plashiga o‘stirish haroratning ta‘sirini aniqlash 25°C dan 45°C gacha bo‘lgan haroratda va 96 soat davomida sheyker-inkubatorida 160-180 ayl./daq tezlikda o‘stirib o‘rganildi. O‘tkazilgan tadqiqotlar natijasida Shd-N1 va Shk-N2 izolyatlari 30°C haroratda o‘stirilganda eng yuqori miqdorda biomassa to‘plashi aniqlandi, biomassani optik zichligi Shd-N1 1,9±2,0 va Shk-N2 1,8±1,9 ni tashkil qildi. Shu bilan birga, ozuqa muhitining optimal pH ko‘rsatgichini aniqlash uchun Shd-N1 va Shk-N2 izolyatlarining pH ko‘rsatgichi 6,0 dan 9,0 gacha bo‘lgan ozuqa- muhitlarida o‘stirildi. Natijada ushbu izolyatlar ozuqa- muhitining keng pH ko‘rsatgichlarida yaxshi o‘sishi, lekin ko‘p miqdorda biomassa hosil qilishi 7,0-7,5 gacha bo‘lgan pH ko‘rsatgichlari namoyon bo‘ldi.

XULOSA

Tadqiqot natijalari shuni ko‘rsatdiki, ajratib olingan 20 dan ortiq izolyatlar orasida 2 ta izolyat metanol bilan o‘sishi va ko‘p miqdorda biomassa hosil qilishi bo‘yicha tanlab olindi. Tanlab olingan izolyatlar gram-manfiy tayoqchalar bo‘lib metilotroflarga xos morfologik xususiyatlarga ega kokklar ekanligi aniqlandi. Ushbu bakteriya izolyatlari 1%-li NaCl qo‘shilgan muhitda o‘sishi, peptonli boy ozuqa muhitida o‘smasligi, uglerod va ko‘p atomli spirtlarni o‘zlashtirmasligi, kislota hamda gaz hosil qilmasligini nomayon qildi, izolyatlar uchun o‘stirish harorati 30 °C va ozuqa muhitining pH ko‘rsatgichi 7,0-7,5 bo‘lishi optimal ekanligi aniqlandi.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR

1. Matassa, S., Boon, N., Pikaar, I., & Verstraete, W. (2016). Microbial protein: Future sustainable food supply route with low environmental footprint. *Environmental Science & Technology*, 50(6), 320–331.
2. Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M., & Wiebe, M. G. (2017). Single-cell protein—State-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. *Frontiers in Microbiology*, 8, Article 2009
3. Khosravi-Darani, K., & Zoghi, A. (2008). Comparison of pretreatment strategies of single-cell protein produced by microorganisms: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(7), 1224–1230.
4. Anthony, C. (1982). *The biochemistry of methyloprophs*. Academic Press, London.
5. Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 60(2), 439–471.
6. Schrader, J., Schilling, M., Holtmann, D., Sell, D., Filho, M. V., Marx, A., & Vorholt, J. A. (2009). Methanol-based industrial biotechnology: Current status and future perspectives of methyloprophic bacteria. *Trends in Biotechnology*, 27(2), 107–115.
7. Strong, P. J., & Clarke, W. P. (2012). Methane as a feedstock for the production of microbial protein. *Bioresource Technology*, 110, 1–9.
8. В.Ф. Гальченко. Метанотрофные бактерии. Москва: изд. ГЕОС. 2001. С. 500.
9. Чемодурова А.А., Капаруллина Е.Н., Мачулина А.В., Шпроер К., Ланг Э., Доронина Н.В. *Ancylobacter lacus* sp. Nov. и *Ancylobacter plantiphilus* sp. Nov. – новые аэробные факультативно-метилотрофные бактерии. *Микробиология*, 2020, том 89, № 1, с. 42–51
10. Определитель бактерий Берджи / Пер. с англ.; под ред. Дж. Хоулта и др.- М.:Мир, 1997.-Т. 1,2.
11. Xiao-lin Zou, Xiu-ai Li, Xu-Ming Wang, Qiang Chen, Miao Gao, Tian-lei Qiu, Jian-guang Sun and Jun-lian Gao. *Hansschlegelia beijingensis* sp. nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methyloprophic bacterium isolated from watermelon rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2013), 63, 3715–3719.
12. Қамбаралиева М.И. Нитрилгидратаза продуцентлари бўлган *rhodococcus* авлодига мансуб бактериялар скрининги ва тавсифи. Биол. фан. номз. (PhD) диссер. автореферати, Тошкент, 2022 й., 45 б.