

**BACILLUS 5R НИ ИЗОЛЯЦИЯСИ ВА ХАРАКТЕРИСТИКАСИ. БАЛИҚ ПАТОГЕН
БАКТЕРИЯЛАРИГА ҚАРШИ АНТАГОНИСТИК ФАОЛЛИГИ**

¹Хушвақтов Э.М., ²Хидирова М.А., ³Маматраимова Ш.М., ⁴Бекмуродова Г.А.,
⁵Миралимова Ш.М.

^{1,2,3,4,5}ЎзРФА Микробиология институти кичик илмий ходими

<https://doi.org/10.5281/zenodo.8372447>

Аннотация. Балиқчилик соҳасини янада ривожлантириши, балиқ маҳсулотлари турларини кўпайтириши, экспорт салоҳиятини ошириши, мавжуд ҳавзалар имкониятларидан самарали фойдаланиши, интенсив технологиялар асосида балиқ етиштириши ҳажмларини кўпайтириши ҳамда балиқчилик хўжалиklarининг озуқа базасини мустаҳкамлаш мақсадида Республикамизда олиб борилаётган ишлар эътиборга лойиқдир. Аммо балиқ касалликлари ҳар йили аквакултурада тахминан 15% йўқотишга олиб келади. Турли профилактик чоралар, жумладан кимёвий бирикмалардан фойдаланиши глобал миқёсда озиқ-овқат хавфсизлиги учун жиддий муаммо тугдиради. Шу сабабли хавфсиз ва фойдали таъсирга эга, профилактик ва даволовчи воситаларини қидириши, асосийси биологик курашини жорий қилиши бугунги кунда балиқчиликда кузатилаётган муаммоларнинг ечими бўлиши мумкин. Шу мақсадда *Bacillus* авлодига тегишли 4 та *Bacillus subtilis*, 2 та *Bacillus pumilis* ва 1 тадан *Bacillus sivalis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mojavensis* штаммлари ажратилиб уларнинг биологик қўрсаткичлари таҳлил қилинди. Натижада ажратилган *Bacillus* турига мансуб изолятлар Ўзбекистонда учрайдиган балиқ патогенларга қарши кучли антагонистик таъсирга эга эканлиги аниқланди.

Калит сўзлар: *Bacillus*, антмикроб фаоллик, каталаза, гемолиз, изолят.

Аннотация. Работа, проводимая в нашей республике в целях дальнейшего развития рыбной отрасли, увеличения видов рыбной продукции, увеличения экспортного потенциала, эффективного использования возможностей существующих бассейнов, увеличения объемов рыбоводства на основе интенсивных технологий, укрепления кормовой базы рыбохозяйственных предприятий заслуживает внимания. Но болезни рыб ежегодно вызывают около 15% потерь в аквакультуре. Различные профилактические меры, в том числе использование химических соединений, создают серьезную проблему для безопасности пищевых продуктов в глобальном масштабе. Поэтому поиск безопасных и эффективных профилактических и лечебных средств, главным образом, внедрение биологического контроля, может стать решением проблем, наблюдаемых сегодня в рыбоводстве. С этой целью нами были выделены 4 изолята *Bacillus subtilis*, 2 изолята *Bacillus pumilis* и по 1 изоляту *Bacillus sivalis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mojavensis*, принадлежащие к роду *Bacillus*, и проанализированы их биологические параметры. В результате установлено, что изоляты, относящиеся к виду *Bacillus*, обладают выраженным антагонистическим действием в отношении патогенов рыб, обнаруженных в Узбекистане.

Ключевые слова: *Bacillus*, антимикробная активность, каталаза, гемолиз, изолят

Балиқчилик соҳасини янада ривожлантириш, балиқ маҳсулотлари турларини кўпайтириш, экспорт салоҳиятини ошириш, мавжуд ҳавзалар имкониятларидан самарали фойдаланиш, интенсив технологиялар асосида балиқ етиштириш ҳажмларини кўпайтириш

ҳамда балиқчилик хўжалиқларининг озуқа базасини мустаҳкамлаш мақсадида Республикада олиб борилаётган ишлар эътиборга лойиқдир. Аммо балиқ касалликлари ҳар йили аквакултурада тахминан 15% йўқотишга олиб келади. Балиқларда *Aphanomyces invadans*, *Aeromonas veronii*, *Pseudomonas fluorescens* ва *Streptococcus iniae* патоген бактериялари таъсирида сазан ва сом балиқларида эпизоотик ярали синдром, аэромонад септисемия, балиқ геморрагик септисемия ва стрептококкоз касалликлар тез-тез кузатилмоқда [1, 2]. Турли профилактик чоралари, жумладан кимёвий бирикмалардан фойдаланиш глобал миқёсида озиқ-оват хавфсизлиги учун жиддий муаммо туғдиради. Шу сабабли хавфсиз ва фойдали таъсирга эга, профилактик ва даволовчи воситаларини қидириш, асосийси биологик курашни жорий қилиш бугунги кунда балиқчиликда кузатилаётган муаммоларнинг ечими бўлиши мумкин. Биологик кураш - бу зараркунандаларга ва патогенларни инсон ва атроф-муҳитга таъсир қилмасдан табиий йўл билан назорат қилиш ёндашувидир. Ҳар қандай ҳайвон патогенини ўлдирадиган ёки ўсишини бостирадиган восита ёки биологик назорат агенти биологик кураш воситаси бўлиши мумкин [3]. Сўнгги йилларда *Bacillus* турлари биологик кураш воситаси сифатида фойдаланиб келинмоқда [4], бу авлод бактериялари грамм-мусбат, спора ҳосил қилувчи, таёқчасимон, ҳаркатчан бактериялар бўлиб, улар турли хил муҳит шароитларида, лекин асосан тупроқда мавжуд. Уларнинг турли хил оғир шароитларда узоқ муддатли яшовчанлиги эндоспора ҳосил қилиши билан боғлиқдир [3]. Улар балиқларни микробиал инфекциялардан антибиотик, ферментлар, учувчан бирикмалар ва бошқа моддаларни секреция қилиши орқали ҳимоя қилади [6,7,9]. Тадқиқотларда *Bacillus* турлари томонидан ишлаб чиқарилган метаболитлар балиқ касалликларига қарши потенциал антибиотиклар манбаи сифатида фойдаланиш мумкинлигини кўрсатди [10]. Айнан *Bacillus* авлодига тегишли қайси турлар балиқчиликда самарали таъсирга эга эканлиги ва патогенларга қарши биологик восита сифатида фойдаланиш мумкинлиги қўшимча тадқиқотларни талаб қилади.

Тадқиқотимизнинг мақсади, балиқчилик учун мослашган *Bacillus* авлоди бактерияларини ажратиш ва балиқларни патогенларига қарши антагонизмини ўрганиш.

Бактерияларни ажратиш. Тадқиқотда *Bacillus* авлодига тегишли изолятларни ажратиш учун сув ва балиқ намуналари балиқ касалликлари тарқалмаган Қашқадарё вилояти Шахрисабз тумани “Ғаров чашма” фермер хўжалигидан олиб келинди. *Bacillus* авлодига тегишли изолятларни ажратиш учун сув намуналари физиологик эритма ёрдамида суюлтириш (10^1 дан 10^9 гача) асосида, балиқ намуналарининг турли қисмлари гомогенлаш орқали 100 мкл миқдорида Дрегалский усулида озуқа ағари (МПА) га экилди ва 37°C да 24 соат давомида инкубация қилинди. Озуқа муҳити юзасидаги колониялар ташқи морфологик кўринишига асосан сараланди [8].

***Bacillus* турларини биокимёвий аниқлаш.** Ўзаро фарқланган колониялар грам усулида бўяб микроскоп остида таҳлил қилинган ва гемолиз, желатиназа, каталаза тестлари асосида идентификацияга тайёрланди [8]. MALDI TOF Масс Спектрометрия усулида турларнинг номи аниқланди.

Антагонистик фаоллигини баҳолаш. Антимикроб фаоллик агарли қудуқчага диффузияланиш усулида амалга оширилди [8]. Индикатор патоген ва шартли патоген *Aeromonas caviae*, *Chryseobacterium gleum*, *Pseudomonas jessenii*, *Aeromonas viridans*, *Staphylococcus hominis*, *Micrococcus flavus*, *Pseudomonas japonica*, *Pseudomonas libanensis* ва *Shewanella baltica* штаммларининг ўсишини ингибирланиш зоналари аниқланди. Барча

фойдаланилган индикатор штаммлар “Пробиотиклар микробиологияси ва биотехнологияси” лабораторияси коллекциясида -80°C да музлатгичда сақланди.

Олинган натижалар: келтирилган намуналардан 20 дан ортиқ изолятлар ажратилди, улардан 9 таси MALDI TOF Мас Спектрометрия усулида идентификацияланди. Ҳар бир ажратилган *Bacillus* авлодига тегишли бактерия штаммлари морфологик таҳлил қилинди ва патоген вирулент ферментлари фаоллиги ўрганилди (1, 2-жадвал).

1-жадвал

***Bacillus* авлодига тегишли бактерия штаммларининг морфологик таҳлил ва идентификациялаш натижалари**

№	Ажратиш манбаси	Грамм бўялиш	Морфологик белгилари	МАЛДИ –ТОФ Мас Спектрометрияси идентификацияси натижаси
1	№ 1 ховуз суви	+	Ўрта катталиқда, думалок, оқ рангли, қабарик	<i>Bacillus pumilis</i>
2	№ 2 ховуз суви	+	Ўрта катталиқда, думалок, оқ рангли, қабарик, четлари нотекис	<i>Bacillus subtilis</i> ³
3	№ 4 ховуз суви	+	Ўрта катталиқда, думалок, оқ рангли, ўрта қисми кўтарилиб ўсган	<i>Bacillus subtilis</i> 7
4	Карп жабраси	+	Ўрта катталиқда, думалок, оқ рангли, қабарик	<i>Bacillus mojavensis</i>
5	Толстолоб жабраси	+	Ўрта катталиқда, думалок, оқ рангли, чети нотекис кенг	<i>Bacillus subtilis</i>
6	Балиқ тери юзаси	+	Ўрта катталиқда, думалок, оқ рангли, қабарик, четлари нотекис	<i>Bacillus siralis</i>
7	Балиқ ичаги	+	Катта, агар юзаси буришган колония	5R <i>Bacillus subtilis</i>
8	Ховузга сув кириши	+	Катта, агар юзаси кўтарилиб ўсган	<i>Bacillus pumilis</i> 2/7
9	Ховуздан сув чиқиши	+	Катта, агар юзаси буришган колония, шилимшиқ ҳосил қилган	<i>Bacillus licheniformis</i> 2/7

Тадқиқот давомида *Bacillus* авлодига тегишли *Bacillus subtilis* (4 та), *Bacillus pumilis* (2 та), *Bacillus mojavensis*, *Bacillus siralis* ва *Bacillus licheniformis* ажратилди.

Ажратилган бактерия штаммларининг патоген омилларга вирулентлигини баҳолаш мақсадида гемолиз, желатиназа, каталаза тестлари амалга оширилди.

Жадвал 2

***Bacillus* авлодига тегишли бактерия штаммларининг ферментив фаоллиги**

№	Синов штаммлари	каталаза	гемолиз	желатиназа
1	<i>Bacillus pumilis</i> 1	+	β	-
2	<i>Bacillus subtilis</i> 3	+	-	-
3	<i>Bacillus subtilis</i> 7	++	-	-
4	<i>Bacillus mojavensis</i>	+++	-	-

5	<i>Bacillus subtilis 4</i>	++	-	-
6	<i>Bacillus sralis 1</i>	+	β	-
7	<i>5R Bacillus subtilis</i>	+++	-	-
8	<i>Bacillus pumilis 2/7</i>	++	-	-
9	<i>Bacillus licheniformi 2/7</i>	+	β	-

Эслатма: + = ижобий, -= салбий.

Текширилган *Bacillus* авлоди вакиллари дан 4 тасида *Bacillus sralis 1*, *Bacillus subtilis 5R* ва *Bacillus licheniformis 2/7* да β гемолиз кузатилди ва қолган 7 та *Bacillus pumilis 1*, *Bacillus subtilis 3*, *Bacillus subtilis 5*, *Bacillus subtilis 7*, *Bacillus mojavensis* ва *Bacillus subtilis 4* штаммлари да гемолиз кузатилмади.

Каталазага нисбатан ўтказилган тестда барча текширилган штаммлар фаоллик кўрсатди, нисбатан юқори каталаза фаолликка эга штаммлар деб *Bacillus mojavensis* ва *Bacillus subtilis 5R* топилди.

Желатиназа фаоллик текширилган штаммларда кузатилмади.

Bacillus бактериялари микробларга қарши фаоллиги билан машхур, яъни улар бактериялар, замбуруғлар ва вируслар каби микроорганизмларнинг ўсишини ингибирлаш ёки ўлдириш қобилиятига эга [11].

3-жадвал

Bacillus авлодига тегишли бактерия штаммларининг антимикроб фаоллиги

№		Ингибирланиш зонаси (мм)								
		<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Chryseobacterium gleum</i>	<i>Pseudomonas jessenii</i>	<i>Aeromonas viridans</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Pseudomonas japonica</i>	<i>Pseudomonas libanensis</i>	<i>Shewanella baltica</i>
1	<i>Bacillus pumilis 1</i>	10	10	8	8	7	7	8	7	0
2	<i>Bacillus subtilis 3</i>	8	14	14	15	10	8	8	7	0
3	<i>Bacillus subtilis 7</i>	8	7	10	8	7	9	7	7	0
4	<i>Bacillus mojavensis</i>	9	9	8	9	7	8	8	7	0
5	<i>Bacillus subtilis 4R</i>	15	8	10	15	8	7	8	0	0
6	<i>Bacillus sralis 1</i>	10	8	10	8	7	8	10	8	0
7	<i>Bacillus subtilis 5R</i>	15	8	12	15	10	12	10	8	0
8	<i>Bacillus pumilis 2/7</i>	8	10	8	7	8	7	8	10	0
9	<i>Bacillus licheniformis 2/7</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Тадқиқот натижаларига кўра, текширилган штаммларда индикатор патоген ва шартли патоген *Aeromonas caviae*, *Chryseobacterium gleum*, *Pseudomonas jessenii*, *Aeromonas viridans*, *Staphylococcus hominis*, *Micrococcus flavus*, *Pseudomonas japonica* ва *Pseudomonas libanensis* штаммларига нисбатан *Bacillus pumilis 1*, *Bacillus subtilis 7*, *Bacillus sralis 1* ва *Bacillus pumilis 2/7* штаммлари 7 мм дан 10 мм гача, *Bacillus subtilis 3*, *Bacillus subtilis 4* ва *Bacillus subtilis 5R* штаммлари 7 мм дан 15 мм гача, *Bacillus mojavensis* да эса 7 мм дан 9 мм гача ингибирланиш кузатилди (3-жадвал).

Адабиётларда келтирилишича, *Bacillus subtilis* бактериоцин, полимикцин ва субтилин каби турли хил микробларга қарши бирикмалар ишлаб чиқариб, ушбу бирикмалар бактериялар ва замбуруғларнинг кенг спектрига қарши самарадорлик кўрсатган [4, 9]. *Bacillus licheniformis* бу тур грамм-манфий бактерияларга қарши фаоллик кўрсатадиган лихеницин деб номланувчи, шунингдек, сулфактан ва бактериоцин каби бошқа натимикроб бирикмалар синтезлаш орқали антимикроб фаолликни намоён қилади [5]. *Bacillus pumilus* патогенларга қарши фаоллик кўрсатадиган пумилицидин ва пумилицин антимикроб бирикмалар ҳосил қилиб, самаралари ингибирланиш фаолликни кўрсатади [6]. Тадқиқотимизда кузатилган ингибирланиш зоналари тур доирасида фарқланиши адабиёт материалларига мослигини кўрсатади.

Хулоса. *Bacillus* авлодига тегишли 4 та *Bacillus subtilis*, 2 та *Bacillus pumilus* ва 1 тадан *Bacillus sralis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mojavensis* штаммлари ажратилди. Ажратилган барча штаммлар патоген вирулент фермент фаоллигига эга эмас. Барча ўрганилган балик патогенларга қарши энг юқори самарадорлик *Bacillus subtilis* 5R да кузатилди ва пробиотик штамм сифатида ўрганилишга тавия этилди.

REFERENCES

1. M.J. Foysal, M.M. Rahman, M. Alam. Antibiotic sensitivity and *in vitro* antimicrobial activity of plant extracts to *Pseudomonas fluorescens* isolates collected from diseased fish. // Int J Nat Sci, 1 (4) (2011), pp. 82-88
2. L.P. Garcia, E.E. Müller, J.C. Freitas, V.G. Silva. Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Brazilian Arch Biol Technol, 53 (1) (2010), pp. 87-92
1. W.L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H.J.S.P. Melosh. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments Microbiol Mol Biol Rev, 64 (3) (2000), pp. 548-572
2. M.J. Foysal, M.M. Rahman, M. Alam. Antibiotic sensitivity and *in vitro* antimicrobial activity of plant extracts to *Pseudomonas fluorescens* isolates collected from diseased fish. // Int J Nat Sci, 1 (4) (2011), pp. 82-88
3. L.P. Garcia, E.E. Müller, J.C. Freitas, V.G. Silva. Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Brazilian Arch Biol Technol, 53 (1) (2010), pp. 87-92
4. M.Amin, Z.A.Z. Rakhisi Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties Avicenna J Clin Microbiol Infect, 2(1) (2015), pp.10.
5. C. Ran, A. Carrias, M.A. Williams, N. Capps, B.C.T. Dan, J.C. Newton, *et al.* Identification of *Bacillus* strains for biological control of catfish pathogens PLoS ONE, 7 (9) (2012)
6. G. Santoyo, M.C. del Orozco-Mosqueda, M. Govindappa. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review Biocontrol Sci Technol, 22 (8) (2012), pp. 855-872
7. B.K. Shrestha, H.S. Karki, D.E. Groth, N. Jungkhun, J.H. Ham Biological control activities of rice-associated *Bacillus* sp. strains against sheath blight and bacterial panicle blight of rice // PLoS ONE, 11 (1) (2016), pp. 1-18

8. МУК 4.2.2602-10 Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков.
9. Амирсаидова Д.А., Маматраимова Ш.М., Бекмуродова Г.А., Хидирова М.А., Хушвақтов Э.М., Ш.М. Миралимова. Characterization of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from aquaculture objects of Uzbekistan. E3S Web of Conferences 381, 01078 (2023) <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202338101078> AQUACULTURE 2022. <https://www.researchgate.net/publication/370029461>.