

ДОМИНИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ ПРИРОДНЫХ НИШ АНДИЖАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Тилакова Ш.Х.

Институт Микробиологии АН РУз

Агзамова Ш.Ю.

Институт Микробиологии АН РУз

АННОТАЦИЯ

В данной статье образцы, привезенные из Андижанской области, были высажены на питательные среды и выделены в чистые культуры. изолированные культуры идентифицировали и определили, к какому виду они принадлежали. Дана информация о доминирующих бактериях.

Ключевое слово: видовой разнообразия, бактерия, питательный среды, **Bacillus, Pseudomonas.**

ВВЕДЕНИЕ

Фрагментом Национальной Программы по изучению «Биоразнообразия растений, животных и микроорганизмов», принятой в 1995 г., являются крупномасштабные исследования биоразнообразия микроорганизмов трёх физиологических групп (бактерий, дрожжей, актиномицетов) различных эколого-географических зон Республики Узбекистан.

Наибольшую физиологическую группу микроорганизмов составляют бактерии. Нами были изучены непотогенные бактерии природных ниш Андижанской области, которая входит в состав Восточной эколого-географической зоны Республики Узбекистан.

Непотогенные бактерии, в свою очередь, делятся на десятки физиологических подгрупп бактериальных микроорганизмов.

Целью настоящей статьи является глубокое изучение и описание количественного содержания и видовой разнообразия бактерий природных ниш Андижанской области по трём сезонам года – весеннему, летнему, осеннему.

Отбор проб производился следующим образом.

Отбор проб в весенний сезон года

С целью отбора проб для микробиологического анализа из природных ниш и производств Андижанской области в эту область была совершена научная

экспедиция. В первую очередь пробы отобрали с плодовых и фруктовых плантаций Андижанского филиала Научно-исследовательского института садоводства и виноградарства, а также из природных ниш.

Места отбора проб были следующими:

1. Естественные водоемы.
2. Искусственные водоемы.
3. Почва под виноградными плантациями.
4. Почва под яблонной плантацией.
5. Почва под плодовыми и фруктовыми плантациями.
6. Ассоциации плодовых деревьев.
7. Ассоциации фруктовых деревьев.
8. Слизевые виноградники.
9. Почва на глубине 20 см.
10. Почва на глубине 40 см.
11. Почва на глубине 60 см.
12. Готовые продукты консервного завода – 10 проб (фруктовые соки, абрикосовые).
13. Молочные продукты.

Отбор проб в летний сезон года

С целью отбора проб для микробиологического анализа из природных ниш и производств Андижанской области в июле в эту область была совершена научная экспедиция. В первую очередь пробы отобрали с плодовых и фруктовых плантаций Андижанского филиала Научно-исследовательского института садоводства и виноградарства, а также из природных ниш.

Места отбора проб следующие:

1. Эпифитная микрофлора винограда.
2. Эпифитная микрофлора яблок.
3. Эпифитная микрофлора абрикоса.
4. Эпифитная микрофлора груши.
5. Естественные водоемы.
6. Искусственные водоемы.
7. Почва под виноградными плантациями.
8. Почва под яблонной плантацией.
9. Почва под плодовыми и фруктовыми плантациями.
10. Слизевые виноградники. Слезоточение виноградника.

11. Почва на глубине 20 см.
12. Почва на глубине 40 см.
13. Почва на глубине 60 см.
14. Микрофлоры инжира.
15. Микрофлоры дыни.
16. Микрофлоры новых сортов плодово-ягодных соков.
17. Микрофлора детского питания.
18. Микрофлора цитрусовых.
19. Сырьё для консервного производства.
20. Ассоциации плодовых деревьев.
21. Ассоциации фруктовых деревьев.
22. Готовые продукты консервного завода – 6 проб (фруктовые соки, абрикосовые); 6 проб плодово-ягодных соков; 6 проб плодово-ягодных соков.
23. Молочные продукты.

Отбор проб в осенний сезон года

С целью отбора проб для микробиологического анализа из природных ниш и производств Андижанской области в начале октября в эту область была совершена научная экспедиция. В первую очередь пробы отобрали на плодовых и фруктовых плантациях Андижанского филиала Научно-исследовательского института садоводства и виноградарства, а также из природных ниш.

Почвы, отобранные на глубине 20, 40 и 60 см в шести сельхозрайонах, – 18 проб.

Эпифитная микрофлора четырёх сортов винограда – 19–22 пробы.

Эпифитная микрофлора двух сортов яблок – 23–24 пробы.

Эпифитная микрофлора двух сортов груш – 25–26 проб.

Слезоточение виноградников – 27–28 проб.

Эпифитная микрофлора цитрусовых – 29–30 проб, 31–32 пробы.

Сердцевина красной дыни – 33–34 пробы.

Эпифитная микрофлора зерновых – 35–40 проб.

Инжир – 41–42 пробы.

Плодово-ягодные соки консервного производства (персиковый, абрикосовый, вишнёвый, яблочный, гранатовый) – 43–48 проб.

Верткое питание – 49–50 проб.

Сырьё гидролизного производства – 51–52 пробы.

Места отбора проб следующие:

1. Эпифитная микрофлора виноградника.
2. Эпифитная микрофлора яблок.
3. Эпифитная микрофлора абрикоса.
4. Эпифитная микрофлора груши.
5. Естественные водоемы.
6. Искусственные водоемы.
7. Почва под виноградными плантациями.
8. Почва под яблонными плантациями.
9. Почва под плодовыми и фруктовыми плантациями.
10. Слизевые виноградники.
11. Почва на глубине 20 см.
12. Почва на глубине 40 см.
13. Почва на глубине 60 см.
14. Сырье для консервного производства.
15. Ассоциации плодовых деревьев.
16. Ассоциации фруктовых деревьев.
17. Готовые продукты консервного завода – 6 проб (фруктовые соки, абрикосовые).
18. Молочные продукты.

Методика исследования бактерий. Из почв, занятых такими сельхозкультурами, как хлопчатник, пшеница, виноградники, плодовые деревья, в Андижанской области отобраны образцы и проведены посеы методом предельных разведений на мясо-пептонный бульон (МПБ), жидкое сусло, мясо-пептонный агар (МПА) и сусло-агар. Культуральные свойства полученных чистых культур изучали визуально под лупой с 10-кратным увеличением.

Морфологию микроорганизмов изучали микроскопически: грам – принадлежность, наличие капсул – методом Бурри–Гинса, расположение спор после окрашивания – методом Ожешко, определяя в иммерсионной системе микроскопа.

Метод Бурри–Гинса заключается в следующем. На обезжиренное предметное стекло наносилась капля разбавленной в 10 раз туши, бактериальной петлей добавлялась капля исследуемой микробной культуры и все это перемешивалось. Затем препарат сушили при комнатной температуре, фиксировали спиртом и осторожно промывали, после чего окрашивали фуксином Пфейффера в течение 3–5 мин, затем сушили при комнатной температуре и осторожно промывали, высушивали и микроскопировали с иммерсионной системой. На темном фоне препарата контрастно выделялись

неокрашенные капсулы, внутри которых находились бактерии ярко-малинового цвета [1, 2].

Окрашивание по методу Ожешко проводили следующим образом. На мазок, высушенный на воздухе, нанесли несколько капель 0.5%-ной соляной кислоты и подержали над спиртовкой до появления пара, все это повторили 2–3 раза. Затем препарат высушивали и фиксировали. Далее окрашивание проводили, как и посредством метода Циль–Нильсена. Под микроскопом клетки были окрашены в синий или голубой цвет, а споры – в красный.

Подвижность микроорганизмов определяли макроскопическим методом. Проводили посев исследуемого материала в пробирку с полужидкой питательной средой, содержащей углеводы. Засеянную среду инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. Если микробная культура подвижная, то рост наблюдается по всему объему питательной среды, а если неподвижная, то рост наблюдается только в месте укола [1, 2].

Для изучения сахаролитической активности бактерий применялись питательные среды, содержащие углеводы, многоатомные спирты и индикаторы. На этих средах образующиеся в результате расщепления углеводов кислоты и газы сдвигают рН среды в кислую сторону и изменяют цвет индикатора. В бактериологической практике широко применяют среды Гисса и Минковича. Мы воспользовались средой Гисса (цветной ряд).

Приготовление среды Гисса. К 100 мл дистиллированной воды прибавляют 1 г пептона, 0.5 г хлорида натрия, 0.5 г одного из необходимых углеводов (глюкозы, лактозы, маннита, мальтозы, сахарозы) в отдельные пробирки и 1 мл индикатора Андреде на 100 мл среды. Среда Гисса с индикатором Андреде имеют соломенно-желтый цвет (рН 7.0–7.2).

В результате роста бактерий, сопровождающегося расщеплением углевода с образованием кислых продуктов распада, цвет среды изменяется на ярко-розовый. Образование газа в среде определяют по наличию пузырьков газа, собирающихся в поплавке [3, 4].

Для определения амилазной активности культуры засеивали на среду с крахмалом. После инкубации в течение 24 ч на выросшие колонии капали раствором Люголя. При отсутствии амилазной активности наблюдается синее окрашивание крахмала, а там, где амилаза присутствует, цвет питательной среды коричневатобурый [5].

Протеазную активность определяли на среде мясо-пептонный бульон с добавлением желатины из расчета 120 г на литр. Культуры, инкубированные при 20–22 °С, разжижали желатину. Разжижение желатины отмечали визуально [6].

Для определения каталазной активности на предметное стекло наносили каплю 3%-ного раствора перекиси водорода и вносили одну бактериологическую петлю исследуемой культуры. Если микроорганизм вырабатывал каталазу, то появлялись пузырьки кислорода в течение 30 с.

Результаты исследования. Доминирующие бактерии, выделенные в чистую культуру за три сезона года (весенний, летний, осенний), приведены в табл. 1–3. Проведено таксономическое описание доминирующих видов и разновидностей изученных бактерий.

Таблица 1

Доминирующие бактерии природных ниш и производств Андижанской области (весенний сезон года)

№ п/п	Семейства	Род	Вид	Автор	Год
1	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus mesentericus	Laubach	1916
2	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus megatherium	De Bary	1884
3	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus cereus	Frankland	1887
4	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas putida	Walter Migula	1900
5	Enterobacteriaceae	Enterobacter	Enterobacter cloacae	Hormaeche и Edwards	1960
6	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus putrificans	Trevisan	1889
7	Micrococcaceae	Micrococcus	Micrococcus luteus	Shroeter и Kon	1872
8	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas stutzeri	Lehmann и Neumann, Siederius	1896 1946
9	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea septica	Gavini	1989

Таблица 2

Доминирующие бактерии природных ниш и производств Андижанской области (летний сезон года)

п/п	Вид	Места обитания
1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Фруктовый сок
2	<i>Bacillus subtilis</i>	Эпифитная микрофлора винограда (листья)
3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Грушевый сок
4	<i>Bacillus megatherium</i>	Почва
5	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Почва
6	<i>Bacillus cereus</i>	Эпифитная микрофлора винограда (листья)
7	<i>Bacillus pumilis</i>	Почва
8	<i>Bacillus idosus</i>	Растительные остатки
9	<i>Micrococcus luteus</i>	Абрикосовый сок
10	<i>Bacillus mesentericus niger</i>	Яблочный сок 1

Таблица 3

Доминирующие бактерии природных ниш и производств Андижанской области (осенний сезон года)

	Вид	Места обитания
	<i>Bacillus endophyticus</i>	Фруктовый сок
	<i>Bacillus subtilis</i>	Эпифитная микрофлора винограда (листья)
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Грушевый сок
	<i>Bacillus megatherium</i>	Гидролизное производство
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Абрикосовый сок
	<i>Pantoea septica</i>	Эпифитная микрофлора винограда (листья)
	<i>Bacillus pumilis</i>	Яблочный сок 2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Яблочный сок 1
	<i>Micrococcus luteus</i>	Яблочный сок 1
	<i>Bacillus mesentericus niger</i>	Абрикосовый сок

На основе результатов проведенных экспериментов определено, что микроорганизмы относятся к следующим родам: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Sarcina*.

Наблюдаемые культуры также были идентифицированы методом MALDI-TOF.

Таксономическое описание доминирующих и новых разновидностей микроорганизмов

Bacillus subtilis является палочковидной бактерией размером 2–5 x 0.4–0.6 мкм. Споры овальные, не превышающие размер клетки, расположены центрально. Расположение жгутиков перитрихиальное, подвижное. Колонии сухие, мелкоморщинистые, бархатистые, бесцветные или розовые. Край колонии волнистый. Растёт на МПА, МПБ, а также на средах, содержащих растительные остатки, на простых синтетических питательных средах для гетеротрофов. Хемоорганогетеротроф аммонифицирует белки, расщепляет крахмал, гликоген. Развивается при температуре +5...+45°C.

Bacillus endophyticus считается растительной эндофитной бактерией, которая обнаруживается во внутренних тканях растений, в частности, хлопчатнике. *B. endophyticus* присутствует либо в виде грамположительных одиночных палочковидных клеток, либо в виде цепочек, которые могут быть короткими или длинными, негемолитическими и неподвижными. Биохимические характеристики, которые отличают *B. endophyticus* от других видов *Bacillus*, включают неспособность восстанавливать нитрат (NO₃⁻) до нитрита, казеина и крахмала, а также устойчивость к ампициллину и NaCl. Вегетативные клетки *B. endophyticus* выглядят «коробчатыми» парами или цепочками. Фенотипически он характеризуется как грамположительные аэробные стержни (3–5 мкм x 1 мкм), негемолитические, неподвижные, устойчивые к пенициллину и у-фагам.

Rhodococcus rhodochrous – это бактерия, используемая в качестве инокулянта почвы в сельском хозяйстве и садоводстве. *Rh. rhodochrous* грамположителен, имеет форму палочек / кокков, отрицателен на оксидазу и положителен на каталазу. Его производят в промышленных масштабах, чтобы катализировать превращение акрилонитрила в акриламид. Он также используется в промышленном производстве никотирамида (ниацинамида), производной или активной формы ниацина, входящего в комплекс витаминов.

Micrococcus luteus является грамположительной, неподвижной, кокковой, тетрадной, пигментированной, сапротрофной бактерией, которая принадлежит к семейству *Micrococcaceae*. Он положительный на уреазу и каталазу. Облигатный

аэроб *M. luteus* обнаружен в почве, пыли, воде и воздухе. Это бактерия с высоким соотношением G + C.

Micrococcus luteus – коагулазо-отрицательный, чувствительный к бацитрацину и образует ярко-желтые колонии на питательном агаре. Он выживает, по крайней мере, от 34 до 170 лет на основе анализа 16SpPHK, а, возможно, и намного дольше. Он был секвенирован в 2010 г. и имеет один из самых маленьких геномов свободноживущих актинобактерий, секвенированных на сегодняшний день, включая одну кольцевую хромосому из 2 501 097 п.н.

Pseudomonas stutzeri – это грамотрицательные палочковидные неспорообразующие бактерии, которые обычно имеют длину 1–3 мкм и ширину 0.5–0.8 мкм. Это микроб, который дает положительный результат как на каталазу, так и на оксидазу. *P. stutzeri* оптимально растет при температуре около 35°C, что делает его мезофильным организмом, хотя он может расти при температурах от 4 до 44°C. При выращивании на среде lysogenybroth (LB) при 32°C эта бактерия имеет время удвоения около 53 мин. При понижении температуры примерно до 28°C время удвоения увеличивается и может достигать 72 мин. Однако на среде с минимальным содержанием аспарагина у *P. stutzeri* типичное время удвоения составляет около 34 мин. Несмотря на разницу во времени удвоения между двумя средами, *P. stutzeri* достигает стационарной фазы примерно через 10–11 ч после инокулирования или введения в обе среды. *P. stutzeri* лучше всего растет в среде, содержащей 2% NaCl, хотя он может выдерживать засоление или содержание соли в диапазоне от 1 до 5% NaCl. Эта бактерия предпочитает нейтральный pH, равный 7, но может расти при pH до 9. *P. stutzeri* обладает пиллями 1V типа и полярным жгутиком, которые помогают ему двигаться.

Bacillus megatherium – это вид грамположительных спорообразующих подвижных преимущественно аэробных хемогетеротрофных бактерий, входящих в семейство Bacillaceae. *Bacillus megatherium* подобно другим видам проявляет широкий спектр физиологических свойств, таких как образование эндоспор, продукция важных ферментов, которые позволяют организму расти и выживать в разнообразных местах обитания (почве, морской воде, иле, нефтяных загрязнениях). Эта непатогенная бактерия может расти на простой среде с разнообразными источниками углерода. Их способность расти на различных источниках углерода делает эту бактерию идеальным промышленным источником белка.

Более того, виды, которые обычно несут множественные плазмиды, служат превосходными объектами для экспрессии генов. Наиболее важными продуктами являются белки, подобные пенициллиновой ацилазе, амилазам,

нейтральной протеазе, дегидрогеназам, Р-450 цитохромоксидазам и витаминам со множеством биотехнологических и промышленных применений. Р-450 цитохромоксидазы являются гемопротеинами, вовлеченными во множество реакций, включая конверсию углеводов, терпенов, ароматических соединений и усвоение источников углерода.

Pantoea septica – это род грамотрицательных бактерий семейства *Erwiniaceae*, недавно выделенный из рода *Enterobacter*. Этот род включает не менее 20 видов. Бактерии *Pantoea* имеют желтый пигмент, ферментируют лактозу, подвижны и образуют слизистые колонии. Некоторые виды обладают способностью распознавать кворум, который может управлять экспрессией различных генов, следовательно, контролировать определенные физиологические действия.

Резюме

ДОМИНИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ ПРИРОДНЫХ НИШ АНДИЖАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Тилакова Ш.Х., Агзамова Ш.Ю.

Настоящее исследование является малым фрагментом грандиозной Национальной Программы по изучению «Биоразнообразия растений, животных и микроорганизмов». В результате изучения бактериальной микрофлоры природных ниш Андижанской области по сезонам года установлены доминирующие виды бактерий видов «**Bacillus, Pseudomonas, Rhodococcus, Micrococcus, Neisseria, Sarcina**», из которых 50% составляют бактерии рода *Bacillus*. Поскольку полезные свойства бактерий зависят от их ферментативной активности, нами были изучены ферменты амилазы, каталазы и протеазы указанных родов.

Summary

DOMINANT BACTERIA IN NATURAL NICHES IN ANDIJAN REGION

Tilakova Sh.H., Agzamova Sh.Y

These studies are a small fragment of a large National Program for the study of "Biodiversity of Plants, Animals and Microorganisms". As a result of studying the bacterial microflora of the natural niches of the Andijan region by the seasons of the year, the establishment of the dominant "**Bacillus, Pseudomonas, Rhodococcus, Micrococcus, Neisseria, Sarcina**" genera of bacteria, 50% of which are bacteria of the genus "*Bacillus*". Since the useful properties of bacteria depend on their enzymatic activity, we studied the enzyme amylase, catalase and protease of these genera.

XULOSA

ANDIJON VILOYATI TABIIY NISHLARIDA DOMINANT BAKTERIYALAR

Tilakova Sh.X., Agzamova Sh.Y

Bu tadqiqotlar “O‘simliklar, hayvonlar va **mikroorganizmlarning** bioxilma-xilligi”ni o‘rganish bo‘yicha yirik Milliy dasturning kichik bir qismidir. Yil fasllari bo‘yicha Andijon viloyati tabiiy nishlarining bakterial mikroflorasini o‘rganish natijasida bakteriyalarning dominant “Bacillus, Pseudomonas, Rhodococcus, Micrococcus, Neisseria, Sarcina” avlodlari, ularning 50% ni «Bacillus» avlodiga mansub bakteriyalar tashkil etadi. Bakteriyalarning foydali xossalari ularning fermentativ faolligiga bog‘liq bo‘lganligi uchun biz ushbu avlodlarning amilaza, katalaza va proteaza fermentini o‘rgandik.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ: (REFERENCES)

1. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology/Boone L.R., Castenholz R.W. (eds). Vol. 1. –New York: Springer-Verlag, 2001. –P.485–487.
2. Castelli T. Les agents de la fermentation vinica en la region de la Rioj//Ahnall della Facolta de Agraria dell Intrverstva do Persia. Vol. XIV. 1958.
3. Dworzanski J.P., Snyder A.P. Classification and identification of bacteria using mass spectrometry-based proteomics. Expert Rev. Proteomics. – 2005. №2 (6). –P.863–878.
4. Janda J.M. Taxonomic update on proposed nomenclature and classification changes for bacteria of medical importance, 2015//Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2016. –№86(2). –P.123–127.
5. Kubicova V., Provaznik I. Use of whole genome DNA spectrograms in bacterial classification//Comput. Biol. Med. –2016. –№69. –P.298–307.
6. Kubicova V., Provaznik I. Use of whole genome DNA spectrograms in bacterial classification//Comput. Biol. Med. Vol. 2. –2016. –№69. –P.298–307 (fundamental and clinical medicine).
7. Besce G. Classification of yeasts. Vol. 22. –1959. –№77.
8. G‘aniyeva A.B., Nazarova H.A. Mikrobiologiya va mikrobiologik tekshirish usullari//Qayta ishlangan. 7-nashr. – Toshkent, 2017.
9. Jorayeva U.M., Magbulova N.A. Mikrobiologiyadan laboratoriya mashg‘ulotlariga qo‘llanma. –Toshkent, 2017.
10. Lodder J. The yeasts. A taxonomic study. –Amsterdam; London, 1970.