

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019. В.38.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

ЮСУПОВ УЛУҒБЕК КАРИМ ЎҒЛИ

**ЎЗБЕКИСТОННИНГ БАЪЗИ ДОРИВОР ЎСИМЛИКЛАРИ ЭНДОФИТ
ЗАМБУРУҒЛАРИНИНГ АНТИБАКТЕРИАЛ ХУСУСИЯТЛАРИ**

03.00.04 – Микробиология ва вирусология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2022

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)
Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

| | |
|---|----|
| Юсупов Улуғбек Карим ўғли Ўзбекистоннинг баъзи доривор ўсимликлари эндофит замбуруғларининг антибактериал хусусиятлари | 3 |
| Юсупов Улуғбек Карим ўғли Антибактериальные свойства эндофитных грибов некоторых лекарственных растений Узбекистана..... | 23 |
| Yusupov Ulugbek Karim o'g'li Antibacterial properties of endophytic fungi of some medicinal plants of Uzbekistan..... | 41 |
| Эълон қилинган ишлар рўйхати Список опубликованных работ List of published works | 44 |

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019. В.38.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

ЮСУПОВ УЛУҒБЕК КАРИМ ЎҒЛИ

**ЎЗБЕКИСТОННИНГ БАЪЗИ ДОРИВОР ЎСИМЛИКЛАРИ ЭНДОФИТ
ЗАМБУРУҒЛАРИНИНГ АНТИБАКТЕРИАЛ ХУСУСИЯТЛАРИ**

03.00.04 – Микробиология ва вирусология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2022

Фалсафа доктори (PhD) диссертация мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссияси В2022.1.PhD/В656 рақами билан рўйхатга олинган.

Диссертация Микробиология институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (info-microbio@academy.uz) ҳамда «ZiyoNet» ахборот-таълим портали (www.ziynet.uz) манзилларига жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:

Абдульмянова Лилия Ильясовна
биология фанлари доктори

Расмий оппонентлар:

Ташмухамедова Шохиста Собировна
биология фанлари доктори, профессор

Пулатова Озода Мансуровна
биология фанлари номзоди

Етакчи ташкилот:

Ботаника институти

Диссертация ҳимояси Микробиология институти DSc.02/30.12.2019.В.38.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2022 йил «26» июль соат 10:00даги мажлисида бўлади (Манзил: 100128, Тошкент шаҳар, Шайхонтохур тумани, А.Қодирий кўчаси, 7Б уй, Микробиология институти конференция залида). Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, e-mail: info-microbio@academy.uz.

Диссертация билан Микробиология институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин. () рақамли билан рўйхатга олинган). (Манзил: 100128, Тошкент шаҳар, Шайхонтохур тумани, А.Қодирий кўчаси, 7Б уй, Микробиология институти маъмурий биноси, 5-қават, кутубхона). Тел.: (+99871)241-92-28.

Диссертация автореферати 2022 йил «8» июлда тарқатилди.

(2022 йил «8» июль № 7 рақамли реестр баённомаси)



Арипов Тахир Фатихович

Арипов Тахир Фатихович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси,
б.ф.д., профессор, академик

Жураева Рохила Назаровна

Жураева Рохила Назаровна
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, б.ф.н., катта илмий ходим

Гулямова Тошхон Гофуровна

Гулямова Тошхон Гофуровна
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги
илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Дунёда инсонлар томонидан антибиотик препаратларининг нотўғри ва ноўрин фойдаланиши сабабли касаллик кўзгатувчи микроорганизмларнинг барқарорлик хусусиятининг ривожланишига олиб келмоқда. Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилоти томонидан инсоният учун хавфли бўлган ва янги антибиотиклар топилиши лозим бўлган 12 та антибиотикка барқарор патоген бактериялар рўйхати келтирилади. Улар орасида *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* ва *Enterobacteriaceae* оиласининг айрим вакиллари бўлиб, улар қон оқими инфекциялари, пневмония каби оғир ва кўп ҳолларда ўлимга олиб келувчи инфекцион касалликлари кўзгатади. Рўйхатда қайд этилган бактериялар амалиётда кенг қўлланилаётган карбапенемлар, учинчи авлод цефалоспоринлари ва бошқа бир қатор антибиотикларга нисбатан сезувчанлигини йўқотган. Шунингдек, амалиётда қўлланилаётган кўплаб антибиотик препаратлари, хусусан, хлорамфеникол (левомицетин), фторхиноллар (ципрофлоксацин, левофлоксацин) кимёвий синтез йўли билан олинади, ушбу препаратлар кўп ҳолларда одам организми учун ножўя таъсирга эга бўлиши ёки аллергия реакциялар чақириши мумкин ва бу ўз навбатида инфекцион касалликларни даволашни қийинлаштиради. Шу сабабли, табиий манбалардан профилактик ва терапевтик мақсадларда антибиотик препаратлар олиш ва амалиётга жорий этиш муҳим аҳамиятга эга.

Жаҳонда антибактериал хусусиятга эга доривор ўсимликлардан фармацевтика саноатида микробларга қарши препаратлар ишлаб чиқариш бўйича илмий тадқиқотлар олиб борилмоқда. Жумладан, доривор ўсимликлардан биофаол бирикмалар ишлаб чиқариш потенциалига эга бўлган эндофитларни ажратиб олиш, эндофитларнинг гликозилланган флавоноидларнинг ўзига хос биотрансформациясини аниқлаш, баъзи эндофитлар юқори антимиқроб потенциалга эга бўлган циклик пептидларни рибосомага боғлиқ бўлмаган ҳолатда пептид синтези орқали синтез қилиши аниқланган. Шу сабабли, доривор ўсимликлар билан симбиоз ҳолатда яшовчи эндофит замбуруғлар асосида даволаш хусусиятига эга бўлган янги антибиотик дори воситаларини яратиш илмий амалий аҳамиятга эга.

Республикамизда барқарор антибактериал хусусиятга эга биологик фаол моддаларни синтез қилувчи эндофит замбуруғларининг маҳаллий штаммларини ажратиб олиш ва амалиётга жорий қилишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Бу борада, фаол эндофит замбуруғларни танлаш ва антибактериал метаболитлар ҳосил қилиш хусусиятларини аниқлаш бўйича муайян натижаларга эришилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясининг тўртинчи устивор йўналишида¹ “...фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларининг арзон, сифатли дори воситалари ва тиббиёт буюмлари билан таъминланишини яхшилаш, дори-дармонлар нархларининг

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7-февралдаги ПФ-4947-сон “Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида” ги Фармони.

асоссиз ўсишига йўл қўймаслик бўйича чора-тадбирларни амалга ошириш, аҳоли ўртасида касалланиш кўрсаткичлари пасайишини ва умр узайишини таъминлаш” вазифалари белгилаб берилган. Мазкур вазифаларни амалга оширишда айрим доривор ўсимликларининг эндофит замбуруғлари томонидан ишлаб чиқариладиган антибактериал хусусиятга эга бирикмаларнинг кимёвий таркиби ва табиатини аниқлаш, тоза ҳолдаги антибактериал дори препаратларини олиш усулларини ишлаб чиқиш ва ушбу замбуруғлардан муқобил, табиий манбаалар сифатида фойдаланиш бўйича тадқиқотларни тадқиқотларни олиб бориш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон “Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида”ги Фармони, Президентнинг 2019 йил 10 апрелдаги ПФ-5707-сон «2019—2021 йилларда республиканинг фармацевтика тармоғини янада жадал ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2019 йил 30 декабрдаги ПҚ-4554-сон “Ўзбекистон республикаси фармацевтика тармоғида ислохотларни чуқурлаштиришга доир қўшимча чора-тадбирлар тўғрисида” ги қарори ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда маълум даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланиши устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI. “Тиббиёт ва фармацевтика” устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Антибактериал хусусиятларга эга эндофит замбуруғларни ўрганиш билан боғлиқ соҳаларда олиб борилган илмий тадқиқотлар натижасида, бир қатор муҳим натижаларга эришилган, хусусан, *Nelumbo nucifera* ўсимлигидан ажратилган *Aspergillus ceipii* нинг *MRSA* га қарши антибактериал таъсири (Сурачаи Т. ва бошқ., 2020), *Colletotrichum globosum*, *Fusarium sp.3* эндофит замбуруғининг юқори антибактериал фаоллиги ва алкалоид табиатли моддаларга эгаллиги (Вен Д. ва бошқ., 2020), *Nigrospora sphaerica* нинг патоген *Staphylococcus aureus* га қарши 1.56 мг/мл минимал ингибирлаш концентрациясини намоён қилиши (Празерес И. ва бошқ., 2015), *Fusarium oxysporum* GG 008 нинг *Enterococcus faecalis* ATCC C1299 га қарши антибактериал фаоллиги таркибидаги 5-гидрохуметилфурфурал (НМФ) моддаси билан боғлиқлиги (Манганйи М. ва бошқ., 2019), *Colletotrichum globosum* нинг хлороформли экстрактининг турли патогенларга қарши антибактериал таъсири 2 соатдан 20 соатгача давом этганлиги ва микроорганизмлар ҳосил қилган биоқатламга парчаловчи таъсири 50-55% бўлганлиги (Каур Н. ва бошқ., 2020), *Xylaria sp.* ва *Diaporthe endophytica* эндофит замбуруғларининг антибактериал фаоллиги (Чарриа-Гирон э. ва бошқ., 2021). Умуман олганда, мавжуд маълумотлар эндофит замбуруғларни антимикроб табиатига эга фаол бирикмаларининг юқори потенциалга эга ишончли янги манбалари сифатида кўрсатади.

Мамлакатимиз олимлари томонидан хусусан, ЎзР ФА Микробиология институти “Физиологик фаол бирикмалар биокимёси ва биотехнологияси” лабораторияси илмий ходимлари томонидан Ўзбекистон ҳудудида ўсувчи доривор ўсимликлар эндофит замбуруғларининг антибактериал хусусиятларини ўрганиш бўйича илмий тадқиқотлар ўтказилган. Эндофит замбуруғ изолятларини скрининг қилиш натижасида, доривор ўсимлик *Melissa officinalis* дан *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* ва *Verticillium dahlia* га қарши юқори антимиқроб фаолликка эга *Thielavia microspora* - MO46L эндофит замбуруғ штамми ажратиб олинган.

Мамлакатимизда доривор ўсимликлар ва сувўтлари асосида яратилган яллиғланишга қарши, иммунитетни оширувчи биологик фаол қўшимча (БФҚ) (“Ламифарен”, “Спирулина”) препаратлари ишлаб чиқарилади ёки четдан олиб келинади. Бироқ шуни таъкидлаш жоизки, Республикаимизда эндофит замбуруғлар асосида тайёрланган кенг қўламли ёки специфик таъсирга эга антибиотик препаратлари ва биологик фаол қўшимча (БФҚ)лар ишлаб чиқарилмайди. Юртимизда замбуруғлар асосида самарали антибактериал таъсирга эга дори воситалари ишлаб чиқарилмаганлиги ва антибактериал препаратларга бўлган талаб ўсиб бораётганлиги сабабли, антибактериал хусусиятга эга бирикмалар синтез қилувчи эндофит замбуруғларнинг юқори фаолликка эга маҳаллий штамmlарини ўрганиш ва амалиётга жорий этиш муҳим илмий ва амалий аҳамият касб этади.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Микробиология институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-Ф5-Т218 “Ўзбекистон доривор ўсимликларининг эндофит микробиотаси” (2012-2016 йй.), ВА-ФА-А6-005 “Ўзбекистон баъзи доривор ўсимликлардаги эндофит замбуруғларни сунъий ўстиришда биофаол иккиламчи метаболитлари ҳосил қилиши шароитларини ишлаб чиқиш” (2017–2018 йй.) мавзуларидаги фундаментал ва амалий лойиҳалари доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади барқарор антибактериал хусусиятга эга биологик фаол моддалар синтез қилувчи эндофит замбуруғларни ажратиб олиш ҳамда антибактериал метаболитлар ҳосил қилиш хусусиятларини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

доривор ўсимликлардан эндофит замбуруғ изолятларини ажратиб олиш, антагонистик ва антибактериал хусусиятига кўра скрининг қилиш, фаол штамmlарни идентификация қилиш;

энг фаол эндофит замбуруғ штамmlарини ўстиришнинг оптимал шароитларини аниқлаш;

фаол штамmlарининг иккиламчи метаболитларининг минимал ингибирлаш концентрацияларини ва патоген микроорганизмлар ҳосил қилган биоқатламга таъсирини таҳлил қилиш;

фаол штаммларини иккиламчи метаболитлари таркибини фитокимёвий реакциялар орқали аниқлаш;

дифференциал фракциялаш ва хроматографик усуллар ёрдамида энг юқори антибактериал фаолликка эга замбуруғ метаболитларини ажратиш.

Тадқиқотнинг объекти антибактериал хусусиятга эга доривор ўсимликлар, ушбу ўсимликлардан ажратиб олинган эндофит замбуруғлари, шартли-патоген микроорганизмлар ҳисобланади.

Тадқиқотнинг предмети ажратиб олинган эндофит замбуруғларни антибактериал фаолликка эга фаол иккиламчи метаболитларни тозалаш, молекуляр массаси ва структурасини аниқлаш.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқотни ўтказишда умумий қабул қилинган микробиологик, аналитик кимё, биотехнология, молекуляр биология ва хроматографиянинг классик ва замонавий усулларида фойдаланилди.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

Ўзбекистон ҳудудида ўсувчи айрим доривор ўсимликлар ҳамда уларда яшовчи эндофит замбуруғларининг антибактериал хусусиятлари ўртасидаги алоқадорлик аниқланган.

илк бор Ўзбекистон ҳудудида ўсувчи *Peganum harmala* доривор ўсимлигидан *Penicillium* авлодига мансуб юқори антибактериал фаолликка эга моддалар синтезловчи *Penicillium roqueforti* 12Ph эндофит замбуруғ штамми ажратиб олинди ва идентификация қилинган;

илк бор Ўзбекистон ҳудудида ўсувчи айрим доривор ўсимликларнинг эндофит замбуруғлари иккиламчи метаболитлари таркибида антибактериал хусусиятга эга гексадекан кислотасининг метил эфири; н-гексадекан кислота; 9,12-октадекадиен кислота (3,3) ва карбендазим каби моддалар асосланган;

эндофит замбуруғ *Penicillium roqueforti* 12Ph штаммидан ажратиб олинган иккиламчи метаболитларининг патоген микроорганизмлар, жумладан, метициллинга чидамли *Staphylococcus aureus* нинг биоқатлам ҳосил қилишига юқори ингибирловчи ҳамда ҳосил бўлган биоқатламга парчаловчи таъсирлари асосланган;

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

Penicillium roqueforti 12Ph штаммининг умумий экстракти турли антибактериал фаол моддаларга бойлиги ва шартли-патоген микроорганизмларга қарши юқори антибактериал, патоген микроорганизмлар биоқатлам ҳосил қилишига қарши ҳамда ҳосил бўлган биоқатламга юқори ингибирловчи фаолликларига эгаллиги аниқланган.

Аксеник шароитда антибактериал ва антибиоқатлам фаолликка эга бирикмаларнинг продуценти эндофит замбуруғ *Penicillium roqueforti* 12Ph ни етиштириш бўйича лаборатория регламенти ишлаб чиқилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги экспериментал маълумотларни замонавий микробиологик ва биотехнологик усуллар ёрдамида олинганлиги, диссертация натижаларининг етакчи хорижий журналларда чоп этилганлиги, олинган натижаларнинг Студент мезонлари ва Фишер дисперсион таҳлили (ANOVA) ёрдамида статистик қайта ишланганлиги, шунингдек, ваколатли давлат тузилмалари томонидан

диссертация тадқиқотининг амалий натижаларини ижобий баҳоланганлиги ва фойдали моделга патент олинганлиги билан асосланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти *Peganum harmala* ўсимлигидан ажратиб олинган *Penicillium roqueforti* 12Ph штамми экстрактнинг антибактериал ва микроорганизмлар биоқатлам ҳосил қилишига юқори ингибирловчи ҳамда ҳосил бўлган биоқатламга парчаловчи фаолликлари таркибидаги гексадекан кислотанинг метил эфири, н-гексадекан кислота, 9,12-октадекадиен кислота (3,3) ва Карбендазим каби моддаларга боғлиқ эканлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти танланган маҳаллий штаммлари антибактериал метаболитлар ҳосил қилиш хусусиятларига кўра патоген бактерияларга қарши препаратлар ишлаб чиқиш учун объект бўлиши мумкин ҳамда маҳаллий фармацевтик ишлаб чиқариш имкониятларини ошишига хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилинганлиги. Ўзбекистон доривор ўсимликлари эндофит замбуруғларининг антибактериал бирикмалар ҳосил қилиш хусусиятларини ўрганиш илмий тадқиқот натижалари асосида:

Микробларга қарши фаолликка эга бўлган *Thielavia microspora touchacca*- MO46L эндофит замбуруғи штамми учун Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлиги томонидан фойдали модел патенти (№ FAR 01513, 2020 й) олинган. Натижада *Melissa officinalis*дан ажратиб олинган *Thielavia microspora touchacca*- MO46L штамми Ўзбекистон худудида ўсувчи доривор ўсимликлар эндофит замбуруғларининг антибактериал хусусиятларини аниқлаш имконини берган;

Melissa officinalis (доривор мелисса) баргидан ажратиб олинган *Thielavia microspora touchacca*-MO46L эндофит замбуруғи иккиламчи метаболитларининг қуруқ экстрактдан ВА-ФА-А6-005 рақамли “Ўзбекистон баъзи доривор ўсимликлардаги эндофит замбуруғларни сунъий ўстиришда биофаол иккиламчи метаболитлари ҳосил қилиши шароитларини ишлаб чиқиш” амалий лойиҳасида шартли патоген микроорганизмлар қарши антибактериал фаоллигини аниқлашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2022 йил 2 феврал №4/1255-234-сон маълумотномаси). Натижада, антибактериал моддаларнинг продуценти *Thielavia microspora* -MO46L доривор ўсимликлар эндофит замбуруғларини аксеник шароитида култивация қилиш учун тавсиялар ишлаб чиқиш имконини берган;

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 5 та халқаро ва 4 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича 15 та илмий иш чоп этилган, шулардан 6 таси илмий мақола бўлиб, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертациялар асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда, жумладан, 2 таси республика нашрларида, 1 таси хорижий журналда нашр этилган, 1 та фойдали моделга патент олинган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация кириш, учта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ҳамда иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 114 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ишнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва асосий вазифалари тавсифланган, Ўзбекистон Республикаси фан ва технологиялари ривожлантириш устувор йўналишларига мослиги, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий этиш, чоп этилган илмий ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **“Эндофит замбуруғлар, уларнинг биофаол иккиламчи метаболитлари ҳамда патоген микроорганизмларнинг антибиотикларга нисбатан чидамлилигининг ошиши”** деб номланган биринчи бобида антибиотикларнинг қўлланилиши ва антибиотикка чидамлилигининг келиб чиқиши, доривор ўсимликлар ва уларнинг эндофитлари билан ўзаро муносабатлари, эндофит замбуруғларининг биофаол метаболитлари, эндофит замбуруғларнинг антибактериал моддаларлари, эндофитларнинг биотехнологик имкониятларини ўрганиш бўйича замонавий изланишларнинг шарҳи келтирилган. Чоп этилган кўплаб мақолалардаги натижаларнинг критик таҳлили мазкур ишнинг асосий мақсади ва вазифаларини шаклланишига имкон берди.

Диссертациянинг **“Доривор ўсимликлар эндофит замбуруғларининг антибактериал хусусиятларини аниқлаш ва улардан биофаол иккиламчи метаболитлар ажратиб олиш усуллари”** деб номланган иккинчи бобида объект, шунингдек материал ва тадқиқот услублари кенг тавсифланган. Тадқиқот услубларида доривор ўсимликлардан эндофит замбуруғларни ажратиб олиш усуллари, уларни антибактериал фаолликларига кўра скрининг қилиш усуллари, энг фаол эндофит замбуруғларни классик ҳамда молекуляр-генетик идентификация қилиш усуллари, энг фаол эндофит замбуруғ *Penicillium roqueforti* 12Ph штаммининг ўстириш шароитларини антибактериал фаолликка эга бирикмалар синтез қилишига кўра оптималлаштириш усуллари, антибактериал фаолликка эга бирикмаларни экстракция қилиш усуллари, умумий экстрактнинг минимал ингибирлаш концентрацияси (МИК) ва патоген микроорганизмлар ҳосил қилган биоқатламга таъсири (антибиоқатлам) фаолликларини аниқлаш усуллари, умумий экстракт ҳамда фракциялардаги антибактериал хусусиятли бирикмаларнинг сифат реакциялари, ЮҚХси ҳамда бу усулда олинган субфракцияларнинг масс-спектрал таҳлил усулларида фойдаланилган.

Диссертациянинг **“Доривор ўсимликлар эндофит замбуруғларининг антибактериал хусусиятга эга биофаол иккиламчи метаболитлар ҳосил қилиш хусусиятларини ўрганиш”** номли учинчи бобида антибактериал хусусиятли доривор ўсимликлардан эндофит замбуруғ изолятларини ажратиб

олиш, олинган изолятларни антибактериал фаолликларига кўра скрининг қилиш, энг фаол изолятларни классик ҳамда молекуляр-генетик усулларда идентификация қилиш, энг фаол эндофит замбуруғлар антибактериал фаолликка эга иккиламчи метаболитларни ҳосил қилиши учун ўстириш шароитларини оптималлаштириш, антибактериал фаолликка эга иккиламчи метаболитлар умумий экстрактининг минимал ингибирлаш коцентрацияси ҳамда антибиоқатлам фаолликлари, олинган иккиламчи метаболитларни кутбилиги турли хил бўлган эритувчилар ёрдамида дифференциал фракциялаш, юқори антибактериал фаолликка эга бўлган фракцияларни сифат тахлили, хроматографик усуллар ва масс-спектрометрия тахлиллари ёрдамида идентификациялаш бўйича тадқиқот натижалари келтирилган.

Мамлакатимиз худудида ўсувчи доривор хусусиятга эга бўлган оддий исирик (*Peganum harmala*), доривор тирноқгул (*Calendula officinalis*), оддий хрен (*Armoracia rusticana*), доривор мойчечак, (*Matricaria chamomilla*), тароқли гултожихўроз (*Celosia cristata*), оддий откулоқ (*Rumex acetosa*), катта қариқиз (*Arctium lappa*) ўсимликларни антибактериал хусусиятларини ўрганишдан бошланди.

1-жадвал

Эндофит замбуруғларнинг шартли-патоген микроорганизмларга нисбатан антагонистик таъсири

| | Изолятлар | Грам «-» бактериялар | | Грам «+» бактериялар | | |
|------------|-------------|----------------------|---------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| | | <i>E.coli</i> | <i>P.aeruginosa</i> | <i>S.aureus</i> | <i>B.subtilis</i> | <i>C.albicans</i> |
| 1 | 1Co - | - | - | 25±0.25 | - | - |
| 3 | 4Co - | - | 20±0.31 | 20±0.30 | 20±0.32 | - |
| 4 | 15Mc - | - | - | 20±0.28 | 22±0.31 | 17±0.18 |
| 5 | 19Mc - | - | - | 18±0.24 | - | - |
| 6 | 1 Ph - | - | - | 15±0.28 | 17±0.23 | - |
| 7 | 3 Ph - | - | - | - | 17±0.21 | 17±0.12 |
| 8 | 4 Ph - | - | - | - | 17±0.22 | 17±0.22 |
| 9 | 11 Ph - | - | - | - | - | 14±0.18 |
| 10 | 12 Ph - | - | - | - | 17±0.21 | 26±0.29 |
| Назоратлар | | | | | | |
| Ц | Цефтриаксон | 30±0.33 | 28±0.32 | 30±0.35 | 30±0.34 | - |

Бунда энг фаол ўсимликлар сифатида *P.harmala*, *C.officinalis*, *A.rusticana*, *M.chamomilla*, *C.cristata* лар олинди ва улардан эндофит замбуруғ изолятлари ажратиб олинди. Умумий ҳисобда 5 та доривор ўсимликдан 41 та эндофит замбуруғ изоляти ажратиб олинди. Ажратиб олинган 41 та изолятдан 10 тасида шартли-патоген микроорганизмлардан биттасига ёки бир нечтасига қарши антагонистик фаоллик кузатилган (1-жадвалга қаранг).

Энг юқори фаоллик кўрсатган изолятлар 1Co, 4Co, 15Mc, 19Mc ва 12 Ph ларни танлаб олинди. Ушбу изолятларнинг биомассалари ҳамда културал суюқликларидан иккиламчи метаболитлари экстракция усули билан ажратиб олинди ва агарда диффузияланиш усулида антибактериал фаолликлари ўрганилди (2-жадвалга қаранг).

**Эндофит замбуруғлар биомассадаги ва културал суюқликларидаги
иккиламчи метаболитларининг шартли-патоген микроорганизмларга
қарши антибактериал таъсири**

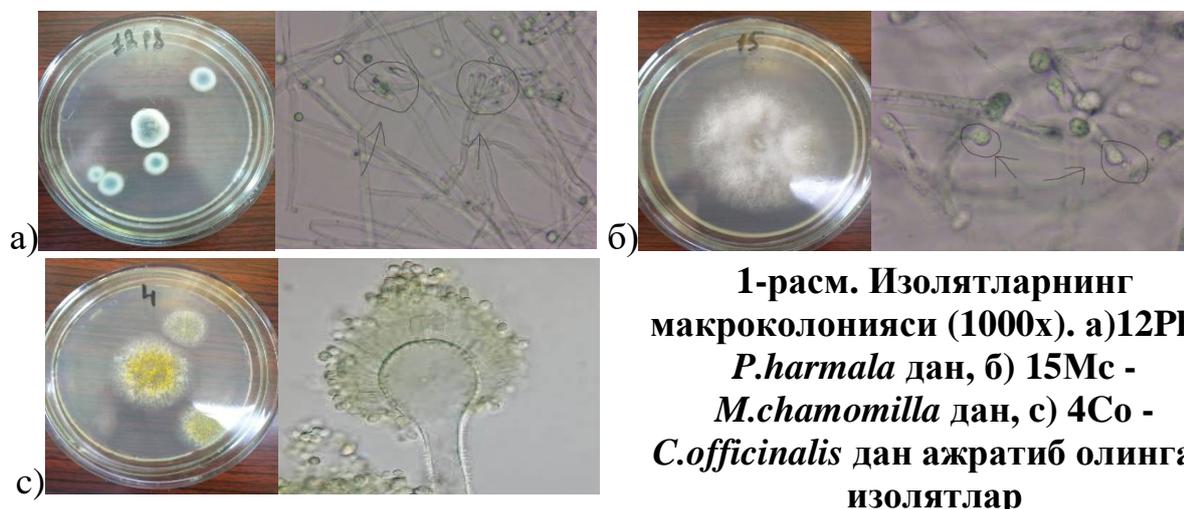
| Белг илан иши | Изолятлар | Ингибирлаш майдони(мм) | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|------------------------|-------------|---------------------|-------------|-----------------|-------------------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
| | | Грам «-» бактериялар | | | | | Грам «+» бактериялар | | | | |
| | | <i>E.coli</i> | | <i>P.aeruginosa</i> | | <i>S.aureus</i> | | <i>B.subtilis</i> | | <i>C.albicans</i> | |
| С-стационар ўстириш | | | | | | | | | | | |
| | | Б/М | К/С | Б/М | К/С | Б/М | К/С | Б/М | К/С | Б/М | К/С |
| 1С | 1Со | - | - | - | - | 14± 0.28 | - | - | - | - | - |
| 4С | 4Со | 19±0. 22 | - | 20±0. 23 | 12±0. 22 | 20± 0.28 | 14± 0.22 | 20±0 .24 | 13±0 .19 | - | - |
| 12С | 12Ph | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15С | 15Mc | - | - | - | - | 13± 0.21 | - | - | - | - | - |
| 19С | 19Mc | - | - | - | - | 15± 0.22 | 13± 0.22 | - | - | - | - |
| К-тебратгичда ўстириш | | | | | | | | | | | |
| | | Б/М | К/С | Б/М | К/С | Б/М | К/С | Б/М | К/С | Б/М | К/С |
| 1К | 1Со | 30±0. 32 | - | 30±0. 31 | - | 30± 0.28 | 14± 0.22 | 28±0 .29 | - | - | - |
| 4К | 4Со | 19±0. 35 | - | 20±0. 36 | 12±0. 22 | 20± 0.24 | 13± 0.25 | 20±0 .23 | 15±0 .15 | - | - |
| 12К | 12Ph | 24±0. 22 | 13±0. 20 | 20±0. 21 | - | 30± 0.32 | 17± 0.26 | 28±0 .34 | - | 26±0. 31 | 16±0. 21 |
| 15К | 15Mc | - | - | - | - | 25± 0.31 | 13± 0.21 | 15±0 .28 | - | - | - |
| 19К | 19Mc | - | - | - | - | 15± 0.23 | 13± 0.22 | - | - | - | - |
| Назоратлар | | | | | | | | | | | |
| Ц | Цефтриаксон– 30мкг/диск | 30±0.33 | | 28±0.32 | | 30±0.35 | | 30±0.34 | | - | |

Изох: Б/М-биомасса, К/С-културал суюқликлардан олинган иккиламчи метаболитлар

Натижалардан кўриниб турибдики, биомассаларда антибактериал фаоллик културал суюқликларга қараганда юқорироқ. Бундан ташқари, тебратгичда ўстириш шароитида антибактериал метаболитлар синтезини кучайишини кузатиш мумкин. Стационар шароитда ўстирилганда антибактериал фаоллик кўрсатмаган изолятларда ҳам тебратгичда ўстирилганда антибактериал фаоллик пайдо бўлган. Стационар шароитда ўстирилганда фақатгина 4Со изолятида сезиларли антибактериал фаоллик кузатилган бўлса (19-20мм), тебратгичда ўстирилганда 4Со дан ташқари 1Со, 12Ph, 15Mc изолятларида ҳам юқори фаоллик кузатилган (19-30 мм гача). Шу билан бирга юқори антибактериал фаоллик олиш учун тебратгичда 180 айл/дақиқага ўстириш мақбул шароит эканлигини аниқланди. Шунинг таъкидлаш жоизки, 4Со изолятнинг ўстириш шароитидан қатъий назар антибактериал фаоллик намоен қилиши, унда мавжуд антибактериал хусусиятга эга моддалар синтезида кислороднинг роли камлигидан далолат беради. 1Со, 12Ph, 15Mc изолятларнинг тебратгичда ўстирилганда антибактериал фаоллик кўрсатгани аэрациянинг антибактериал хусусиятли

иккиламчи метаболитлар ҳосил бўлишида аҳамиятга эга эканлигидан далолат беради. *Melissa officinalis* баргидан ажратилган *Thielavia microspora* - MO46L эндофит замбуруғи устида олиб борилган тадқиқотлар натижалари асосида Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал Мулк агентлигидан фойдали моделга патент олинган, патент номери (№ FAP 01513).

Келтирилган маълумотлар асосида кейинги тадқиқотларимиз учун 1Co, 4Co, 12Ph ва 15Mc изолятларини танлаб олинди.



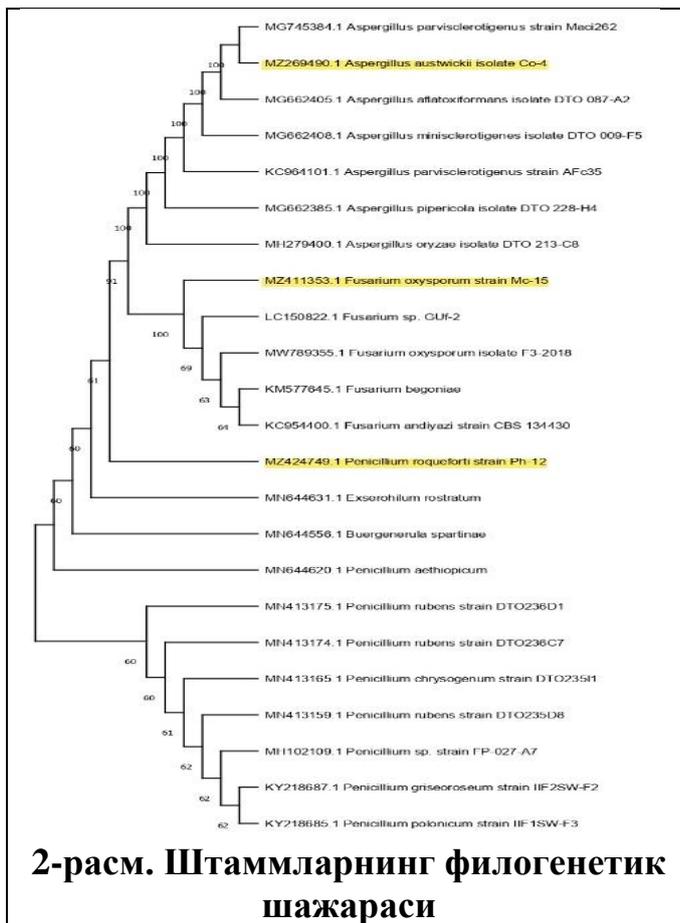
1-расм. Изолятларнинг макроколонияси (1000х). а) 12Ph - *P.harmala* дан, б) 15Mc - *M.chamomilla* дан, с) 4Co - *C.officinalis* дан ажратиб олинган изолятлар

Ушбу танлаб олинган изолятларнинг морфологик-культурал хусусиятларини ўрганиш натижаларига кўра, 4Co-изолятни *Aspergillus* авлодига, 12Ph-изолятни *Penicillium* авлодига ва 15Mc-изолятни *Fusarium* авлодига мансуб эканлиги аниқланди. Тажрибалар давомида 1Co изоляти сунъий ўстириш шароитларида ўсиш хусусиятини йўқотди ва шу сабабли кейинги тадқиқотларда фойдаланилмади (1-расмга қаранг).

Ушбу изолятларнинг ITS регионларини секвенирлаш усулида нуклеотидлар кетма-кетлиги аниқланди ва олинган маълумотлар NCBI халқаро маълумотлар базасида BLAST дастурида таҳлил қилиниб, унга кўра: 4Co изоляти *Aspergillus austwickii* га 98.71%, 12Ph изоляти *Penicillium roqueforti* га 99.68%, 15Mc изоляти эса *Fusarium oxysporum* га 99.55% ўхшаш эканлиги аниқланди. Бу натижалар асосида 4Co изоляти *Aspergillus austwickii* 4Co (M3269490), 12Ph изоляти *Penicillium roqueforti* 12Ph (M3424749), 15Mc изоляти эса *Fusarium oxysporum* 15Mc (M3411353) қилиб NCBI халқаро маълумотлар базасига киритилди. Ушбу базадаги маълумотларга солиштирган ҳолатда, MEGA дастурида “neighbor joining” усулида изолятларнинг филогенетик дарахти тузилди (2-расмга қаранг).

Юқорида келтирилган маълумотларга таяниб, энг юқори фаолликка эга *Penicillium roqueforti* 12Ph штаммидан кейинги тадқиқотларда фойдаланилди.

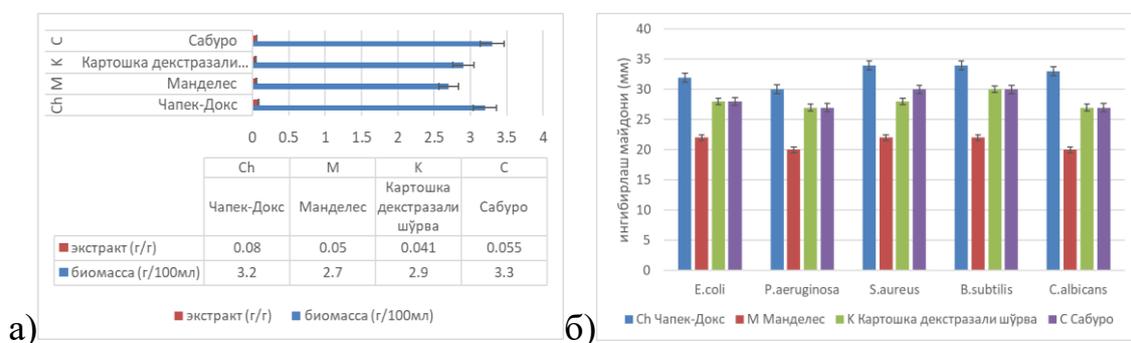
Танлаб олинган штаммни замбуруғлар учун мўлжалланган турли озуқа муҳитида ўстириб кўриш орқали энг мақбул озуқа муҳити танлаб олишни мақсад қилинди. Бунда Чапек-Докс, картошка декстрозали бульон, Манделес, Сабуро озуқа муҳитларида ушбу штаммнинг биомасса ва иккиламчи метаболитлар ҳосил қилиши ўрганилди (3-расмга қаранг).



Тажрибада биомасса тўпланиши бўйича энг максимал миқдор Сабуро озуқа муҳитида (3.3 ± 0.16 г) кузатилган, иккинчи ва учинчи ўринларда Чапек-Докс (3.2 ± 0.15 г) ва картошка декстрозали бульон (2.9 ± 0.14 г) озуқа муҳитларида бўлган. Биомассалардан олинган умумий экстрактлар миқдори бўйича энг кўп экстракт Чапек-Доксда (80мг/г) кузатилган. Иккинчи ўринда эса Сабуро озуқа муҳитига (55мг/г) олинган.

Олинган умумий экстрактларни ДМСОда эритиб, ҳар бир экстрактдан 3мг/мл ли эритмалар тайёрланди ва шартли патогенларга қарши антибактериал фаоллиги кузатилди (4-расмга қаранг).

Натижалар шуни кўрсатдики, Чапек-Докс озуқа муҳитида ўстириб олинган экстракт энг юқори антибактериал фаолликка эга.



3-расм. *P.roqueforti* 12Ph нинг турли озуқа муҳитларида (а) биомасса ва метаболитлар ҳосил қилиши ва (б) антибактериал фаоллиги

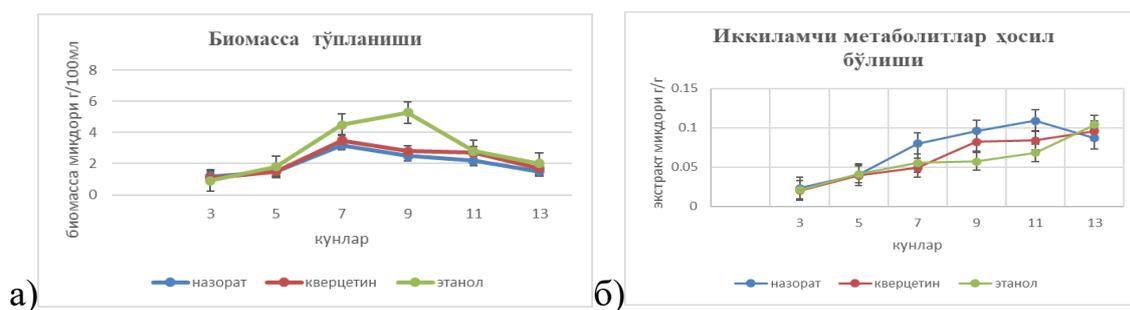


4-расм. *P.roqueforti* 12Ph нинг турли озуқа муҳитларида ўстирилган экстрактларининг антибактериал фаоллиги

Бу натижалар экстрактлар бир хил фоиз миқдорида эканлигини ҳисобга олсак, Чапек-Докс озуқа муҳитида ўстириб олинган экстрактнинг таркибида антибактериал хусусиятга эга моддалар энг кўп миқдорда тўпланган. Иккиламчи метаболитларнинг максимал чиқими ва антибактериал фаолликнинг юқори эканлигини ҳисобга олиб кейинги тадқиқотларни Чапек-

Докс озуқа муҳитида олиб боришга қарор қилинди ва унинг таркибидаги углерод ва азот манбааларини *P.roqueforti* 12Ph штамми учун оптимизация қилишга киришилди. Бунда Чапек-Докс озуқа муҳити таркибидаги углерод манбаси сифатида сахароза, азот манбаси сифатида пептон ҳамда ачитқи экстрактининг комбинацияси қўлланилганда, биомасса (5,4г/100мл) ва иккиламчи метаболитлар (126 мг/г) ҳосил бўлиши максимал миқдорга етган. Бунда, биомасса ва иккиламчи метаболитлар ҳосил бўлиши ўртача 1.5 марта ва ундан ортиқ миқдорга кўтарилган. Иккиламчи метаболитларнинг антибактериал фаоллиги эса ўртача 30-32мм атрофида бўлган. Шундай қилиб, Чапек-Докс озуқа муҳитини, углерод манбаи сифатида сахароза, азот манбаи сифатида пептон ва ачитқи экстракти комбинацияси танлаб олинди.

Кейинги тадқиқотда *P.roqueforti* 12Ph штамми ўсиши, иккиламчи метаболитлар ҳосил қилиши ва антибактериал фаоллигига таъсирини ўрганиш учун эпигенетик модификатор сифатида 100 μ M кверцетин ва элиситор сифатида умумий ҳисобда 2%ли этанол суюқ озуқа муҳитларига қўшилди. Назорат сифатида фақат замбуруғ инокуляти экилган суюқ озуқа муҳити олинди. Намуналар 3-13 кунлар давомида ўстирилди. Олинган биомассалардан иккиламчи метаболитлар ажратилди ва 1мг/мл концентрацияда ДМСОда эритилди (5-расмга қаранг).



5-расм. *P.roqueforti* 12Ph штамми (а) биомасса ҳосил қилиши (б) иккиламчи метаболитлар ҳосил қилишига эпигенетик модификатор ва элиситорнинг таъсири

Олинган биомассаларнинг энг юқори миқдори этанолли ўстириш учун 9-кун (5.3 ± 0.34 г/100мл) бўлган бўлса, кверцетинли ўстириш (3.5 ± 0.23 г/100мл) ҳамда назорат (3.2 ± 0.22 г/100мл) учун 7-кун бўлганлиги олинган натижалардан аниқланган. Бироқ иккиламчи метаболитларнинг энг юқори миқдорлари биомассаларниқидан бир мунча фарқ қилади. Хусусан, этанолли (104.0 ± 0.98 мг/г) ва кверцетинли муҳитларда (96.0 ± 0.45 мг/г) метаболитларнинг энг кўп миқдори 13-кунда кузатилган бўлса, назоратда (109.0 ± 0.97 мг/г) энг кўп экстракт 11-кунда ажратилган.

Олинган иккиламчи метаболитлар экстрактидан 1мг/мл концентрацияли эритмалар тайёрланиб антибактериал фаолликлари ўрганилди (6-расмга қаранг). *P.roqueforti* 12Ph штаммининг антибактериал фаолликларига эпигенетик модификатор ва элиситорнинг таъсири сезиларли даражада бўлган. Хусусан, назоратда юқори антибактериал фаолликлар тест-патогенларга нисбатан асосан 9, 11-кунларда кузатилган бўлса (17-23 мм

атрофида), кверцетинли ва этанолли ўстиришда антибактериал фаоллик 13-кунда энг юқори даражасига чиққан (25-30 мм атрофида).



6-расм. *P.roqueforti* 12Ph штаммининг антибактериал фаоллигига эпигенетик модификатор ва элиситорнинг таъсири

Шу билан бирга айтиш мумкинки, эпигенетик модификатор ва элиситор таъсирида *P.roqueforti* 12Ph штаммининг антибактериал фаоллиги 30-40% га ошган.

P.roqueforti 12Ph штамми умумий экстрактининг МИКни ўрганиш мақсадида экстракт массаси аниқланганидан сўнг ДМСО да 800 мкг/мл, 600 мкг/мл, 400 мкг/мл, 200 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл, 25 мкг/мл ли эритмалар тайёрланди. Бу эритмаларнинг 5та шартли-патоген микроорганизмларга қарши антибактериал фаоллиги ўрганилди. Олинган натижалар шуни кўрсатдики, умумий экстрактининг МИК кўрсаткичи *E.coli* учун 100 мкг/мл ни, *Ps. aeruginosa* учун 400 мкг/мл ни, *S.aureus*, *B.subtilis*, *C.albicans* учун эса 25мкг/мл ни ташкил этади.

P.roqueforti 12Ph штамми умумий экстрактининг патогенлар *S.aureus*, *B.subtilis*, *C.albicans* га қарши МИК кўрсаткичи 25мкг/мл бўлиши унинг самарадорлиги юқори эканлигидан далолат беради.

Ўрганилаётган эндофит замбуруғнинг умумий экстрактининг патоген микроорганизмлар биоқатлам ҳосил қилишига ингибирловчи таъсирини ва ҳосил бўлган биоқатламга парчаловчи таъсирини ўрганишни мақсадида патоген микроорганизмлар сифатида *S.aureus*, *MRSA*, *C.albicans* лар олинди. *P.roqueforti* 12Ph штамми умумий экстрактининг МИКи қўлланилди (3-жадвал).

3-жадвал

P.roqueforti 12Ph нинг умумий экстрактининг патоген микроорганизмлар биоқатлам ҳосил қилишига ингибирловчи таъсири

| Патогенлар | Назорат муҳити (озуқа муҳити) зичлиги | (озуқа Δ(оптик | Экстракт Δ(оптик зичлиги) | Антибиотик Δ(оптик зичлиги) | Экстракт %и | Антибиотик (цефтриаксон/ флуконазол) | %и |
|--------------------|---------------------------------------|----------------|---------------------------|-----------------------------|-------------|--------------------------------------|----|
| <i>S. aureus</i> | 1.25 | | 0.25 | 0.113 | 80% | 90.9% | |
| <i>MRSA</i> | 0.57 | | 0.29 | 0.418 | 49% | 26.5% | |
| <i>C. albicans</i> | 1.26 | | 0.101 | 0.492 | 92% | 60.8% | |

Натижалардан айтиш мумкинки, *P.roqueforti* 12Ph нинг умумий экстракти юқори ингибирлаш фаоллигига эга. Хусусан, *S.aureus* нинг биоқатлам ҳосил қилишини цефтриаксон 90,9% ингибирлаган пайтда, умумий экстракт 80%га ингибирлаган. *MRSA* да эса экстрактнинг кўрсаткичи (49%) антибиотикниқидан деярли икки баробар юқори бўлди (26.5%). *C.albicans* да

экстрактимиз энг юкори натижани (92%) кўрсатган бўлса, бу пайтда флуконазол ўртача натижа (60,8%) намоён қилди.

Экстрактнинг ҳосил бўлган биоқатламга парчаловчи таъсирини ўрганиш учун 96 та чуқурчали плашкага экилган инокулятларга 24 соатлик инкубациядан сўнг намуналар ва назоратлар солинди ва яна 24 соат давомида инкубация қилинди. Инкубациядан сўнг олинган натижалар методда кўрсатилган формулага асосланган ҳолатда ҳисоблаб чиқилди (4-жадвалга қаранг).

4-жадвал

P.roqueforti 12Ph нинг умумий экстрактининг патоген микроорганизмлар ҳосил қилган биоқатламга парчаловчи таъсири

| Патогенлар | Назорат (озука мухити зичлиги) Δ(оптик) | Экстракт Δ(оптик зичлиги) | Антибиотик Δ(оптик зичлиги) | Экстракт %и | Антибиотик %и (цефтриаксон/ флуконазол) |
|--------------------|---|---------------------------|-----------------------------|-------------|---|
| <i>St. aureus</i> | 1.33 | 1.31 | 1.07 | 1.5% | 19.5% |
| <i>MRSA</i> | 1.47 | 1.29 | 1.41 | 12.2% | 4.08% |
| <i>C. albicans</i> | 1.7 | 1.521 | 1.27 | 10.5% | 25.3% |

Натижалар олдинги тажриба натижаларидан кескин фарқ қилади. *P.roqueforti* 12Ph нинг умумий экстрактининг патоген микроорганизмлар биоқатлам ҳосил қилишига ингибирловчи таъсири юкори бўлишига қарамай унинг ҳосил бўлган биоқатламга парчаловчи таъсири бир мунча паст. Масалан, *S.aureus* ҳамда *C.albicans* нинг биоқатламини деярли парчаламаган. Бироқ шуни таъкидлаш керакки, умумий экстрактининг *MRSA* биоқатламига парчаловчи таъсири 12.2% бўлган бўлиб, бу мусбат назорат цефтриаксон кўрсаткичидан (4.08%) 3 марта юкорирокдир. Шундай қилиб, *P.roqueforti* 12Ph штамми умумий экстракти патоген микроорганизмларининг биоқатлам ҳосил қилишига қарши профилактик ҳамда терапевтик препаратлар учун асос бўлиши мумкин.

5-жадвал

P.roqueforti 12Ph умумий экстрактининг дифференциал фракциялаш йўли билан олинган фракцияларнинг антибактериал фаоллиги

| Фракциялар | Ингибирлаш майдони, мм (чуқурчанинг диаметри 10мм) | | |
|-------------------|--|------------------|--------------------|
| | <i>MRSA</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> |
| Умумий экстракт | 18±0.22 | 23±0.25 | 20±0.24 |
| Гексан фракцияси | - | - | - |
| Метанол фракцияси | 15±0.20 | 16±0.21 | 22±0.21 |
| Бутанол фракцияси | - | 15±0.20 | - |
| Сув фракцияси | | | |

P.roqueforti 12Ph штамми умумий экстракти таркибини ўрганишда антибактериал хусусиятли иккиламчи метаболитларни кутбилилигига қараб кутбилилиги ҳар хил бўлган турли эритувчиларда (гексан, метанол, бутанол, сув) эритиш орқали фракцияларга бўлинди. Олинган фракциялар ДМСО да эритилди ва 1 мг/мл ли умумий экстракт билан бирга антибактериал фаоллиги кўрилди (5-жадвал).

Юқоридаги жадвалдан кўришиб турибдики, умумий экстракт таркибидаги антибактериал фаолликка эга моддалар метанолли фракцияга ўтган. Бироқ *S.aureus* га нисбатан бутанолли фракцияда ҳам бироз фаоллик

кузатилган. Антибактериал фаолликка эга моддаларнинг метанолли фракцияга ўтишини уларнинг кутблилиқ даражаси метанолникига яқин эканлиги билан изоҳлаш мумкин.

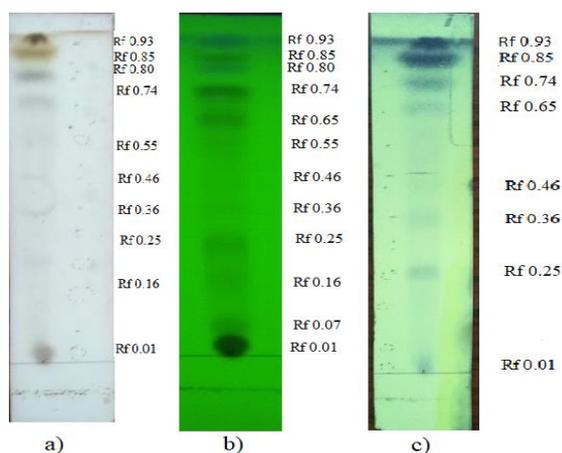
| Fraksiyalar | Terpenoidlar | Steroidlar | Flavonoidlar | Taninlar | Yurak-glikozidlari | Alkoidlar | Saponinlar | Fenollar | Antraxinonlar |
|--|---|---|---|----------|---|--|------------|----------|---------------|
| Umumiy-ekstrakt |  |  |  | - |  |  | - | - | - |
| Geksanli-fraksiya Metanoli-fraksiya |  | - |  | - |  | - | - | - | - |
| Butanoli-fraksiya | - | - |  | - | - | - | - | - | - |
| Suvli-fraksiya | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

7-расм. *P.roqueforti* 12Ph умумий экстракти ҳамда унинг турли фракцияларининг фитокимёвий реакциялари

Фаоллик бераётган фракциялар таркибидаги моддаларнинг табиатини аниқлаш учун уларни турли сифат реакцияларда ўрганилди. Бунда терпеноидлар, стероидлар, флавоноидлар, танинлар, юрак гликозидлар, алкалоидлар, сапонинлар, феноллар, антрохинонлар каби кимёвий синфларга мансуб моддаларни бўйшага мўлжалланган сифат реакциялар ўтказилди (7-расмга қаранг).

Расм маълумотларидан кўришиб турибдики, *P.roqueforti* 12Ph штамининг этилацетат ёрдамида олинган умумий экстракти таркибида асосан 5 та кимёвий синфга мансуб бирикмалар мавжуд. Улар терпеноидлар, стероидлар, флавоноидлар, юрак гликозидлари, алкалоидлардир. Умумий экстрактдан дифференциал фракциялаш йўли билан олинган метанолли фракцияда эса терпеноидлар, флавоноидлар ва юрак гликозидлари аниқланган. Бутанолли фракцияда фақатгина флавоноидлар рангли реакция берган. Гексанли ва сувли фракцияда эса қўйилган рангли реакцияларда моддалар аниқланмаган. Умумий экстрактда, метанолли фракцияда ҳамда бутанолли фракцияда антибактериал фаолликнинг бўлиши ва айнан шу фракцияларда флавоноидларнинг аниқланиши фракциялар таркибидаги флавоноидлар антибактериал фаоллик бераётганини тасдиқлайди.

P.roqueforti 12Ph штаммининг умумий экстрактдан олинган метанолли фракцияни юпқа қатлам хроматографияси (ЮҚХ) усулида энг фаол субфракцияларга ажратиб олиш мақсадида хлороформ/этилацетат/чумоли кислота: 5:4:1 (СЕФ) нисбатдаги эритувчилар системасидан фойдаланилди ва 12 та (0,93; 0,85; 0,80; 0,74; 0,65; 0,55; 0,46; 0,36; 0,25; 0,16; 0,07; 0,01) Rf қийматга эга субфракциялар ажралди (8-расмга қаранг). FeCl₃ нинг метанолдаги 3% ли эритмаси билан ишлов берилганда субфракциялар кўк рангга бўялгани уларнинг флавоноидларга мансублигидан далолат беради. Бу эса ўз навбатида дифференциал фракциялаш усулида олинган фракцияларнинг фитокимёвий реакцияларида олинган натижаларини тасдиқлайди.



8-расм. Метанолли фракциянинг субфракцияларини турли

детекция усулларида кўрилиши

а)- H₂SO₄ нинг метанолдаги 10% ли эритмаси билан ишланган пластинка.

б)- 254 нм ультрабинафша нурлар остида кўрилиши.

с)- FeCl₃ нинг метанолдаги 3% ли эритмаси билан ишлов берилган

Пластинкалардан субфракцияларни қалам билан белгилаб олиб, сўнг ҳар бир фракцияни пичоқча билан алоҳида йиғиб олинди. Кейин пробиркалардаги сорбент силикогелдан субфракциялардаги моддаларни экстракция қилиб олиб, *MRSA*, *S.aureus*, *C.albicans* ларга қарши антимикроб фаоллиги ўрганилди (6-жадвалга қаранг). Натижаларидан маълумки, умумий экстракт таркибидаги антибактериал фаоллик бераётган моддалар субфракцияларда маълум даражада тарқалиб кетган. Хусусан, Rf қийматлари 0.937, 0.850, 0.800, 0.737, 0.650, 0.550 бўлган субфракциялар фақат *C.albicans*га таъсир этган ва булар ичида 0.800, 0.737, 0.075 Rf қийматли субфракцияларда энг юқори кўрсаткич (18±0.21, 17±0.20, 18±0.20) кузатилган, Rf қийматлари 0.075, 0.012 субфракциялар *C.albicans*дан ташқари *MRSA*, *S.aureus* ларга ҳам ингибирловчи таъсир этган. Rf 0.250, 0.162, 0.075, 0.012 субфракциялар иккала патоген бактерияларга антибактериал фаоллик кўрсатган.

6-жадвал

Субфракцияларнинг антибактериал фаоллиги

| Rf қийматлари | Субфракциялар | Ингибирлаш майдони (чуқурчанинг диаметри 10мм) | | |
|---------------|---------------|--|--------------------|------------------|
| | | <i>MRSA</i> | <i>C. albicans</i> | <i>S. aureus</i> |
| 0.94 | 1- | - | 12±0.15 | - |
| 0.85 | 2- | - | 14±0.18 | - |
| 0.80 | 3- | - | 18±0.21 | - |
| 0.74 | 4- | - | 17±0.20 | - |
| 0.650 | 5- | - | 14±0.17 | - |
| 0.550 | 6- | - | 14±0.17 | - |
| 0.462 | 7- | - | - | - |
| 0.362 | 8- | - | - | 12±0.15 |
| 0.250 | 9- | 12±0.15 | - | 12±0.15 |
| 0.162 | 10- | 12±0.14 | - | 12±0.14 |
| 0.075 | 11- | 12±0.14 | 18±0.20 | 13±0.15 |
| 0.012 | 12- | 12±0.15 | 13±0.15 | 12±0.15 |

P.roqueforti 12Ph штаммининг умумий экстракти метанолли фракциясини ҳамда унинг субфракцияларини газ хроматография-масс спектрометрия усулида тадқиқ қилинди. Бунда аввал метанолли фракция ҳамда ундан олинган субфракциялар GC-MS таҳлилидан ўтказилди (7-8-жадваллар). GC-MS хроматограммалари NIST 17.L маълумотлар базасидаги маълумотларга солиштирилган ҳолатда идентификация қилинди. Юқоридаги маълумотлардан кўриниб турибдики, *P.roqueforti* 12Ph штамми умумий экстрактининг антибактериал фаолликка эга бўлган метанолли фракцияси ва

унинг субфракциялари турли кимёвий гуруҳларга мансуб бўлган бирикмаларга бой.

7-жадвал

P.roqueforti 12Ph нинг метаноли фракциясининг GC-MS таҳлили

| Пик рақами | Чиқиш вақти | Library/ID MassHunter\Library\NIST17.L | Ўхшашлик даражаси(%) |
|------------|-------------|---|----------------------|
| 1 | 3.757 | 1-Бутанол, 3-метил-, ацетат | 64 |
| 5 | 8.706 | Ундекан кислота, 10-метил-, метил эфири | 94 |
| 6 | 9.269 | Додекан кислота | 64 |
| 7 | 12.064 | Метил тетрадекан кислота | 96 |
| 8 | 12.539 | Пентадекан кислота | 38 |
| 9 | 14.378 | Гексадекан кислота, метил эфири | 91 |
| 10 | 14.713 | Н- Гексадекан кислота | 87 |
| 15 | 16.137 | 9,12-октадекадиен кислота (Z,Z)- | 76 |

Хусусан, алканлар, ёғ кислоталар, амин гуруҳли бирикмалар ва ҳоказо. Буларнинг ҳар бирининг антибактериал фаолликлари ҳақида илмий манбааларда кўплаб далиллар келтирилган.

8-жадвал

P.roqueforti 12Ph нинг метаноли фракцияси субфракцияларининг GC-MS таҳлили

| Rf қиймати | Пик рақами | Чиқиш вақти | Library/ID MassHunter\Library\NIST17.L | Ўхшашлик даражаси(%) |
|------------|------------|-------------|--|----------------------|
| 0.937 | 12 | 7.281 | Гидроксилламин, О-децил | 83 |
| 0.850 | 11 | 5.796 | Оксалик кислотанинг аллил андецил эфири | 78 |
| | 16 | 8.603 | Карбендазим | 64 |
| 0.800 | 7 | 5.184 | Диазиридин, 3-этил-3-метил- | 64 |
| | 12 | 5.795 | Оксалик кислотанинг аллил гексадецил эфири | 72 |
| | 14 | 6.233 | 2,3,4,5,6-пентометил ацетофенон | 81 |
| 0.737 | 14 | 14.691 | Н- Гексадекан кислота | 64 |
| 0.650 | 4 | 4.940 | 1-этил-2,2,6-триметил циклогексан | 68 |
| 0.550 | 17 | 6.232 | 2,3,4,5,6-пентометил ацетофенон | 76 |
| | 18 | 7.279 | Андекан, 2,6-диметил- | 64 |
| 0.462 | 5 | 5.182 | Декан | 64 |
| 0.362 | 13 | 5.794 | Оксалик кислотанинг изобутил нонил эфири | 64 |
| 0.250 | 5 | 8.706 | Андекан кислота, 10-метил-, метил эфири | 94 |
| | 6 | 9.269 | Додекан кислота | 64 |
| 0.162 | 7 | 12.064 | Метил тетрадекан кислота | 96 |
| | 8 | 12.539 | Пентадекан кислота | 38 |
| 0.075 | 9 | 14.378 | Гексадекан кислота, метил эфири | 91 |
| | 10 | 14.713 | Н- Гексадекан кислота | 87 |
| 0.012 | 2 | 4.498 | 9-октадекан кислотанинг 2,2,2-трифлуорэтил эфири | 74 |
| | 15 | 16.137 | 9,12-октадекадиен кислота (Z,Z)- | 76 |

Олинган натижалар ва илмий манбаалар таҳлилидан хулоса чиқариб айтиш мумкинки, *Peganum harmala* ўсимлигидан ажратиб олинган эндофит замбуруғ *Penicillium roqueforti* 12Ph штамми турли антимикроб бирикмаларга бой бўлиб, ушбу штамдан фармацевтика соҳалари учун биологик фаол моддаларнинг истиқболли манбааси сифатида фойдаланиш мумкин.

ХУЛОСА

1. Ўзбекистоннинг баъзи доривор ўсимликларининг антибактериал хусусияти ўрганилиб, юқори фаолликка эга бўлган 5 та доривор ўсимликлардан жами 41 та эндофит замбуруғ изолятлари ажратиб олинди. Ушбу изолятларни антибактериал фаолликларига кўра скрининг қилиш натижасида фаоллиги юқори бўлган 1Co, 4Co, 12Ph ва 15Mc изолятлари танлаб олинди.

2. Ажратиб олинган юқори антибактериал фаолликка эга 3 та изолят классик ҳамда молекуляр-генетик усулда идентификация қилиниб, NCBI маълумотлар базасига киритилди. Бунга кўра, 4-изолят - *Aspergillus austwickii* Co-4 (M3269490), 12Ph изоляти *Penicillium roqueforti* 12Ph (M3424749), 15Mc изоляти эса *Fusarium oxysporum* 15Mc (M3411353) рақамланди ва кейинги тажрибаларда *Penicillium roqueforti* Ph-12 штаммидан фойдаланилди.

3. *Penicillium roqueforti* 12Ph штаммини Чапек-Докс озуқа муҳитини оптималлаштириш мақсадида углеродли бирикма сифатида сахароза, азотли бирикма сифатида пептон билан ачитқи экстракти комбинацияси қўлланилиши биомасса ва иккиламчи метаболитлар ҳосил бўлишини ўртача 1.5 мартагача ошириши аниқланди. *Penicillium roqueforti* 12Ph штаммининг антибактериал фаоллигини ошириш мақсадида озуқа муҳитига эпигенетик модификатор сифатида кверцетин ҳамда элиситор сифатида этанол қўшилиши, антибактериал хусусиятга эга иккиламчи метаболитларнинг ўстиришининг 13-кунда максимал синтезланишига ва антибактериал фаоллик 30-40%га ошига олиб келиши қайд этилди.

4. *Penicillium roqueforti* 12Ph замбуруғининг умумий экстрактининг минимал ингибирлаш концентрацияси (МИК)и ўрганилди. Бунда, *E.coli* учун 100 мкг/мл, *P.aeruginosa* учун 400 мкг/мл, *S.aureus*, *B.subtilis* ва *C.albicans* учун 25 мкг/мл эканлиги аниқланди. *Penicillium roqueforti* 12Ph замбуруғининг умумий экстрактининг микроорганизмларнинг биоқатлам(био пленка) ҳосил қилишига таъсири ўрганилди. Бунда, экстракт *S.aureus* нинг биоқатлам ҳосил қилишини 80% га, *MRSA* никини 49%, *C.albicans* никини эса 92% га ингибирлаши аниқланди. Экстрактнинг ҳосил бўлган биоқатламга парчаловчи таъсирида экстракт *S.aureus* ҳосил қилган биоқатламни 1,5% га, *MRSA* 12,2% га, *C.albicans* 10,5% га парчаланишини намоён этди.

5. *Penicillium roqueforti* 12Ph штамми умумий экстракти фракциялари фитокимёвий реакциялар ёрдамида ўрганилганда, улар таркибида терпеноидлар, стероидлар, флавоноидлар, юрак гликозидлар, алколоидлар кимёвий гуруҳларига кирувчи бирикмалар мавжудлиги, шунингдек, антибактериал фаолликни асосан флавоноид бирикмалари намоён қилиши аниқланди.

6. Метанол фракцияни юпқа қатлам хроматографияси усулида 12 та субфракцияларга ажратилди ва антибактериал фаолликлари аниқланди, унга кўра: 9-дан 12-гача бўлган субфракциялар *MRSA* га нисбатан; 1-дан 6-гача бўлган ҳамда 11-12- субфракциялар *S.aureus* га нисбатан; 8-дан 12-гача бўлган субфракциялар *C.albicans* га нисбатан антибактериал фаоллик кўрсатиши аниқланди. GC-MS таҳлилида, Rf 0.075 бўлган субфракцияда антибактериал фаолликка эга гексадекан кислотанинг метил эфири, Rf 0.737, 0.075, 0.012 бўлган субфракцияларда бактериостатик фаолликка эга н-гексадекан кислота, 9,12-октадекадиен кислота (3,3) лар, Rf 0.850 бўлган субфракцияда антибактериал фаолликка эга Карбендазим моддалари аниқланди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.02/30.12.2019.В.38.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ МИКРОБИОЛОГИИ**

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

ЮСУПОВ УЛУГБЕК КАРИМ УГЛИ

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭНДОФИТНЫХ ГРИБОВ
НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ УЗБЕКИСТАНА**

03.00.04 – Микробиология ва вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD) ПО
БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

Ташкент – 2022

Тема диссертации доктора философии (PhD) по биологическим наукам зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан под номером В2022.1.PhD/В656.

Диссертация выполнена в Институте Микробиологии.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (www.info-microbio@academy.uz) и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziyo.net).

| | |
|-------------------------------|---|
| Научный руководитель: | Абдульмянова Лилия Ильясовна доктор биологических наук |
| Официальные оппоненты: | Ташмухамедова Шохиста Собировна доктор биологических наук, профессор Пулатова Озода Мансуровна кандидат биологических наук |
| Ведущая организация: | Институт Ботаники |

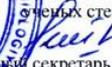
Защита диссертации состоится «5» июля 2022 года в 10 часов на заседании Научного совета DSc.02/30.12.2019.B.38.01 при Институте микробиологии (Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А.Кадырий 76, конференц-зал института микробиологии. Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, e-mail: info-microbio@academy.uz).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института микробиологии (зарегистровано под №). Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А. Кадырий 76, Административное здание Института микробиологии,

Автореферат диссертации разослан: «8» июля 2022.

(реестр протокола рассылки № «7» от «8» июля 2022.




Урипов Тахир Фатихович
Председатель Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., профессор, академик

Жураева Рохилия Назаровна
Ученый секретарь Научного совета по присуждению
ученых степеней, к.б.н. старший научный сотрудник

Гулимова Ташхан Гафуровна
Председатель Научного семинара при Научном
совете по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (Аннотация диссертации)

Актуальность и востребованность темы диссертации. Неправильное и неуместное использование антибиотиков человеком приводит к развитию резистентности болезнетворных микроорганизмов во всем мире. Кроме того, несоблюдение здорового образа жизни, санитарно-эпидемиологических норм способствует возникновению новых инфекционных заболеваний. Всемирная организация здравоохранения перечисляет 12 устойчивых к антибиотикам патогенных бактерий, которые опасны для человека и требуют открытия новых антибиотиков. Среди них *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* и некоторые представители семейства *Enterobacteriaceae*, которые вызывают тяжелые и часто смертельные инфекционные заболевания, такие как инфекции кровотока и пневмония. Перечисленные бактерии утратили чувствительность к карбапенемам, цефалоспорином третьего поколения и ряду других широко применяемых на практике антибиотиков. Также, многие из современных антибиотиков, в частности, хлорамфеникол (левомицетин), фторхинолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин) производятся путем химического синтеза и часто оказывают побочное действие на организм человека или вызывают аллергические реакции. В этой связи, чрезвычайно важно получать и внедрять антибиотики именно из природных источников для профилактических и лечебных целей.

Во всем мире проводятся научные исследования по созданию противомикробных препаратов для фармацевтической промышленности из лекарственных растений, обладающих антибактериальными свойствами. В частности, выделение из лекарственных растений эндофитов, способных продуцировать биоактивные соединения, выявление специфической биотрансформации гликозилированных флавоноидов эндофитами, синтез циклических пептидов с высоким антимикробным потенциалом у некоторых эндофитов нерибосомно-зависимым образом. Поэтому разработка новых антибиотических препаратов с лечебными свойствами на основе эндофитных грибов, живущих в состоянии симбиоза с лекарственными растениями, имеет научно-практическое значение.

В нашей стране особое внимание уделяется выделению и внедрению местных штаммов эндофитных грибов, синтезирующих биологически активные вещества, обладающие устойчивыми антибактериальными свойствами. В связи с этим получены определенные результаты по селекции активных эндофитных грибов и определению их антибактериальных метаболитообразующих свойств. Четвертым приоритетом Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан является «дальнейшее развитие фармацевтической промышленности, улучшение обеспечения населения и медицинских учреждений дешевыми, качественными лекарственными средствами и изделиями медицинского назначения, принятие мер по предотвращению необоснованного повышения цен на лекарства, обеспечение снижения показателей заболеваемости и увеличение продолжительности жизни». Для реализации этих задач важно определить

химический состав и природу антибактериальных соединений, продуцируемых эндофитными грибами лекарственных растений Узбекистана, разработать методы получения чистых антибактериальных препаратов и использовать эти грибы в качестве альтернативных, природных источников.

Данное диссертационное исследование также в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Указе Президента Республики Узбекистан №ПП-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», Постановлении Президента Республики Узбекистан №ПП-3489 от 23 января 2018 года «О мерах по дальнейшему упорядочению производства и ввоза лекарственных средств и изделий медицинского назначения», Постановлении Президента Республики Узбекистан от 30 декабря 2019 года № ПП-4554 «О дополнительных мерах по углублению реформирования фармацевтической отрасли Республики Узбекистан» и других нормативных правовых актах, связанных с данной деятельностью.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий Республики – VI. «Медицина и фармакология».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации. В результате научных исследований антибактериальных свойств эндофитных грибов различных стран получен ряд важных данных: антибактериальное действие *Aspergillus cejprii*, выделенного из растения *Nelumbo nucifera*, в отношении *MRSA* (Surachai T. et al., 2020); высокая антибактериальная активность, а также содержание веществ алкалоидной природы в эндофитных грибах *Colletotrichum globosum*, *Fusarium sp.3* (Ven D. et al., 2020); минимальная ингибирующая концентрация 1,56 мг/мл *Nigrospora sphaerica* в отношении возбудителя *Staphylococcus aureus* (Prazeres I. et al., 2015); связанность содержания 5-гидроксиметилфурфурола в составе *Fusarium oxysporum GG 008* с его антибактериальной активностью против *Enterococcus faecalis ATCC S1299* (HMF) (Manganyi M. et al., 2019); антибактериальное действие хлороформного экстракта *Colletotrichum globosum* в отношении различных патогенов длительностью от 2 до 20 часов; деструктивное воздействие на биопленку, образованной микроорганизмами 50-55% (Каур Н. et al., 2020); антибактериальная активность эндофитных грибов *Xylaria sp.* и *Diaporthe endophytica* (Charria-Giron et al., 2021). В целом имеющиеся данные свидетельствуют о том, что эндофитные грибы являются надежными новыми источниками с высоким потенциалом активных соединений антимикробной природы.

Учеными нашей страны, в частности, сотрудниками лаборатории биохимии и биотехнологии физиологически активных соединений, Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан, проведены исследования антибактериальных свойств эндофитных грибов лекарственных растений, произрастающих в Узбекистане. В результате скрининга изолятов эндофитных грибов, из лекарственного растения *Melissa officinalis* выделен

штамм эндофитного гриба *Thielavia microspora-MO46L*, обладающий антимикробной активностью в отношении типовых штаммов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* и *Verticillium dahlia*.

Наша страна производит или импортирует противовоспалительные, иммуностимулирующие биологически активные добавки (БАД) (Ламифарен, Алхадая, Спирулина) на основе лекарственных растений и водорослей. Однако, в Республике антибиотики и биологически активные добавки (БАД) на основе эндофитных грибов еще не производят.

В связи с отсутствием в нашей стране эффективных антибактериальных препаратов и растущей потребностью в антибактериальных препаратах, изучение и внедрение высокоактивных местных штаммов эндофитных грибов, синтезирующих соединения с антибактериальными свойствами, имеет большое научное и практическое значение.

Связь темы диссертации с планом научно-исследовательских работ учреждений, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ Института микробиологии в рамках фундаментального и прикладного проектов № ФА-Ф5-Т218 «Эндофитная микробиота лекарственных растений Узбекистана» (2017-2018 гг.), ВА-ФА-А6-005 «Разработка условий продукции биоактивных вторичных метаболитов эндофитных грибов некоторых лекарственных растений Узбекистана при искусственном культивировании» (2017-2018 гг.).

Целью исследования было выделение эндофитных грибов, синтезирующих биологически активные вещества с устойчивыми антибактериальными свойствами, и определение их потенциала для биотехнологического производства антибактериальных соединений.

Задачи исследования:

выделение изолятов эндофитных грибов из лекарственных растений, скрининг антагонистических и антибактериальных свойств, идентификация наиболее активных эндофитов;

определение оптимальных условий культивирования наиболее активных эндофитных штаммов;

определение минимальной ингибирующей концентрации вторичных метаболитов наиболее активных штаммов и их влияния на биопленки патогенных микроорганизмов;

фитохимическое определение состава вторичных метаболитов наиболее активных штаммов;

разделение и идентификация метаболитов грибов с наибольшей антибактериальной активностью методами дифференциального фракционирования и хроматографии.

Объектом исследования являются лекарственные растения, обладающие антибактериальными свойствами, выделенные из этих растений эндофитные грибы, условно-патогенные микроорганизмы.

Предметом исследования явилась очистка, определение молекулярной массы и структуры активных вторичных метаболитов эндофитных грибов, обладающих антибактериальной активностью.

Методы исследования. В исследованиях использовались классические и современные методы микробиологии, аналитической химии, биотехнологии, молекулярной биологии и хроматографии.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

Выявлена взаимосвязь антибактериальных свойств некоторых лекарственных растений, произрастающих на территории Узбекистана, и обитающих в них эндофитных грибов;

Впервые на территории Узбекистана из лекарственного растения *Peganum harmala* выделен и идентифицирован штамм эндофитного гриба *Penicillium roqueforti* 12Ph, синтезирующий вещества с высокой антибактериальной активностью.

Впервые во вторичных метаболитах эндофитных грибов некоторых лекарственных растений, произрастающих на территории Узбекистана, обнаружены такие вещества, как метиловый эфир гексадекановой кислоты, н-гексадекановая кислота, 9,12-октадекановая кислота (Z, Z) и карбендазим с антибактериальными свойствами.

Обосновано высокое ингибирующее действие вторичных метаболитов, выделенных из штамма эндофитного гриба *Penicillium roqueforti* 12Ph, на биопленкообразование и деструкцию сформировавшейся пленки патогенных микроорганизмов, в том числе метициллин резистентного *Staphylococcus aureus*.

Практические результаты исследования.

Установлено, что суммарный экстракт штамма *Penicillium roqueforti* 12Ph богат различными веществами антибактериальной природы, и обладает высокой антибактериальной активностью в отношении условно-патогенных микроорганизмов.

Установлено, что суммарный экстракт штамма *Penicillium roqueforti* 12Ph проявляет высокое ингибирующее действие на формирование и деструкцию биопленки патогенных микроорганизмов.

Достоверность результатов исследований обеспечивается экспериментальными данными с использованием современных микробиологических и биотехнологических методов, результатами, опубликованными в ведущих зарубежных журналах, статистической обработкой результатов с использованием критериев Стьюдента и дисперсионного анализа Фишера (ANOVA).

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследования заключается в том, что антибактериальная и антибиопленочная активность штамма *P.roqueforti* 12Ph, выделенного из гармалы обыкновенной, обусловлена продукцией таких веществ, как метиловый эфир гексадекановой кислоты, н-гексадекановая кислота, 9,12-октадекановая кислота (Z, Z) и карбендазим.

Практическая значимость результатов исследования заключается в том, что выделенные местные штаммы, отобранные по антибактериальным свойствам метаболитов, могут стать объектом для разработки препаратов против патогенных бактерий и служить повышению потенциала местного фармацевтического производства.

Внедрение результатов исследования. На основании результатов научного исследования по образованию антибактериальных соединений эндофитными грибами лекарственных растений Узбекистана:

- в Агентстве интеллектуальной собственности Республики Узбекистан получен патент (№ FAP 01513) на полезную модель - штамм эндофитного гриба *Thielavia microspora touchacca*-MO46L, обладающий антимикробной активностью. В результате штамм *Thielavia microspora touchacca*-MO46L, выделенный из *Melissa officinalis*, послужил основой для изучения антибактериальных свойств эндофитных грибов лекарственных растений, произрастающих на территории Узбекистана;

Сухой экстракт вторичных метаболитов эндофитного гриба *Thielavia microspora touchacca*-MO46L, выделенный из листьев *Melissa officinalis* (мелиссы лекарственной) был использован в рамках прикладного научно-исследовательского проекта «Разработка условий продукции биоактивных вторичных метаболитов эндофитных грибов некоторых лекарственных растений Узбекистана при искусственном культивировании» номер ВА-ФА-А6-005, для определения антибактериальной активности в отношении патогенных микроорганизмов (Справка АН РУз № 4/1255-234 от 2 февраля 2022 г.). В результате продуцент антибактериальных соединений *Thielavia microspora*-MO46L позволил разработать рекомендации по культивированию эндофитных грибов лекарственных растений в аксенических условиях для синтеза антибактериальных веществ.

Апробация результатов исследования. Результаты этого исследования были обсуждены в рамках 5 международных и 4 местных научных конференциях.

Публикация результатов исследований. Опубликовано 15 научных работ по теме диссертации, из них 6 научных статей, в научных изданиях, рекомендованных к публикации Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан, в том числе 2 местных издания, 1 зарубежный журнал, 1 запатентованная полезная модель.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы и приложений. Объем диссертации составляет 114 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во **Введении** освещается актуальность и своевременность работы, описываются цели и задачи исследования в соответствии с приоритетными направлениями науки и техники Республики Узбекистан, научная новизна и практическая значимость результатов исследований, дается информация о структуре диссертации.

В первой главе диссертации под названием **«Эндофитные грибы, их биоактивные вторичные метаболиты, а также повышенная резистентность патогенных микроорганизмов к антибиотикам»** проводится обзор современных исследований по применению антибиотиков и происхождению антибиотикорезистентности, взаимодействию лекарственных растений, их эндофитов и биоактивных метаболитов, антибактериальных веществ эндофитных грибов и их биотехнологического потенциала. Критический анализ результатов опубликованных статей позволил сформулировать основные цели и задачи данной работы.

Во второй главе диссертации под названием **«Определение антибактериальных свойств эндофитных грибов лекарственных растений и способов получения из них биоактивных вторичных метаболитов»** подробно описывается объект, материалы и методы исследования. Методы выделения эндофитных грибов из лекарственных растений, их скрининга на антибактериальную активность, методы классической и молекулярно-генетической идентификации наиболее активных эндофитных грибов, способ оптимизации условий культивирования наиболее активного штамма *P.roqueforti* 12Ph, методику экстракции вторичных метаболитов с антибактериальной активностью, определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) суммарного экстракта и влияние на биопленку (антибиопленка) патогенных микроорганизмов, качественные реакции антибактериальных соединений в общих экстрактах и фракциях, ТСХ и масс-спектральный анализ.

В третьей главе диссертации под названием **«Изучение образования биоактивных вторичных метаболитов с антибактериальными свойствами эндофитными грибами лекарственных растений»** приведены результаты по выделению изолятов эндофитных грибов из антибактериальных лекарственных растений, скрининг полученных изолятов и идентификация наиболее активных штаммов классическими и молекулярно-генетическими методами, оптимизации условий культивирования наиболее активных эндофитных грибов для продукции вторичных метаболитов с антибактериальной активностью, исследованию минимальной ингибирующей концентрации суммарного экстракта метаболитов, дифференциальному фракционированию полученных вторичных метаболитов с использованием растворителей разной полярности, выявлению фракций с высокой антибактериальной активностью при помощи хроматографических методов, качественного и масс-спектрометрического анализа.

Исследование началось с изучения антибактериальных свойств экстрактов лекарственных растений: гармала обыкновенная (*Peganum harmala*), календула лекарственная (*Calendula officinalis*), хрен обыкновенный (*Armoracia rusticana*), ромашка лекарственная (*Matricaria chamomilla*), целозия гребневидная (*Celosia cristata*), щавель кислый (*Rumex acetosa*), Лопух большой (*Arctium lappa*), произрастающих на территории нашей страны. Из 5 растений, обладающих высокой антибактериальной активностью (*P.harmala*,

C.officinalis, *A.rusticana*, *M.chamomilla*, *C.cristata*) были выделены изоляты эндофитных грибов.

Таблица 1

**Антагонистическое действие эндофитных грибов
на условно-патогенные микроорганизмы**

| | Изоляты | Грам «-» бактерии | | Грам «+» бактерии | | |
|----------|-------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------|
| | | <i>E.coli</i> | <i>P.aeruginosa</i> | <i>S.aureus</i> | <i>B.subtilis</i> | |
| 1 | 1Co - | - | - | 25±0.25 | - | - |
| 3 | 4Co - | - | 20±0.31 | 20±0.30 | 20±0.32 | - |
| 4 | 15Mc - | - | - | 20±0.28 | 22±0.31 | 17±0.18 |
| 5 | 19Mc - | - | - | 18±0.24 | - | - |
| 6 | 1 Ph - | - | - | 15±0.28 | 17±0.23 | - |
| 7 | 3 Ph - | - | - | - | 17±0.21 | 17±0.12 |
| 8 | 4 Ph - | - | - | - | 17±0.22 | 17±0.22 |
| 9 | 11 Ph - | - | - | - | - | 14±0.18 |
| 10 | 12 Ph - | - | - | - | 17±0.21 | 26±0.29 |
| контроль | | | | | | |
| Ц | Цефтриаксон | 30±0.33 | 28±0.32 | 30±0.35 | 30±0.34 | - |

Из 5 лекарственных растений выделен 41 изолят эндофитных грибов. Антагонистическая активность в отношении одного или нескольких условно-патогенных микроорганизмов наблюдалась у 10 из 41 выделенного изолята (см. табл. 1).

Изоляты с наибольшей активностью 1Co, 4Co, 15Mc, 19Mc и 12Ph. были отобраны для дальнейших исследований. После культивирования отобранных изолятов в стационарных условиях и на качалке, вторичные метаболиты были экстрагированы из биомассы и культуральной жидкости и изучена их антибактериальная активность методом диффузии в агар (см. табл. 2). Результаты показывают, что антибактериальная активность вторичных метаболитов, полученных из биомассы выше, чем из культуральной жидкости. Также можно наблюдать увеличение синтеза антибактериальных метаболитов в условиях культивирования на качалке. Изоляты, не проявляющие антибактериальной активности при выращивании в стационарных условиях, проявляли антибактериальную активность при выращивании на шейкере. Значительная антибактериальная активность наблюдалась только у изолята 4Co при выращивании в стационарных условиях (19-20 мм), высокая активность наблюдалась у изолятов 1Co, 12Ph, 15Mc в дополнение к 4Co при выращивании в качалке (до 19-30 мм). Обнаружено, что культивирование при 180 об/мин на качалке является оптимальным условием для получения метаболитов с высокой антибактериальной активностью. Следует отметить, что изолят 4Co проявляет антибактериальную активность независимо от условий культивирования, что свидетельствует о незначительной роли кислорода в синтезе веществ с антибактериальными свойствами. В то время как для изолятов 1Co, 12Ph, 15Mc важна аэрация при образовании вторичных метаболитов, обладающих антибактериальными свойствами. На основании представленных данных для дальнейшего исследования были отобраны изоляты 1Co, 4Co, 12Ph и 15Mc. По результатам исследований, проведенных

на эндофитном грибе *Thielavia microspora* - MO46L, выделенном из листьев мелиссы лекарственной, получен патент на полезную модель Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан, номер патента (№ FAP 01513).

Таблица 2

Антибактериальное действие вторичных метаболитов эндофитных грибов в биомассе и культуральной жидкости в отношении условно-патогенных микроорганизмов

| Изоляты | | Зона ингибирования (мм) | | | | | | | | | |
|-------------------------|------------|-------------------------|--------|---------------------|---------|-----------------|-------------------|-------------------|---------|-------------------|---------|
| | | Грам «-» бактерии | | | | | Грам «+» бактерии | | | | |
| | | <i>E.coli</i> | | <i>P.aeruginosa</i> | | <i>S.aureus</i> | | <i>B.subtilis</i> | | <i>C.albicans</i> | |
| С- стационарные условия | | | | | | | | | | | |
| | | Б/М | К/Ж | Б/М | К/Ж | Б/М | К/Ж | Б/М | К/Ж | Б/М | К/Ж |
| 1С | 1Со | - | - | - | - | 14±0.28 | - | - | - | - | - |
| 4С | 4Со | 19±0.22 | - | 20±0.23 | 12±0.22 | 20±0.28 | 14±0.22 | 20±0.24 | 13±0.19 | - | - |
| 12С | 12Ph | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15С | 15Mc | - | - | - | - | 13±0.21 | - | - | - | - | - |
| 19С | 19Mc | - | - | - | - | 15±0.22 | 13±0.22 | - | - | - | - |
| К-на качалке | | | | | | | | | | | |
| | | Б/М | К/Ж | Б/М | К/Ж | Б/М | К/Ж | Б/М | К/Ж | Б/М | К/Ж |
| 1К | 1Со | 30±0.32 | - | 30±0.31 | - | 30±0.28 | 14±0.22 | 28±0.29 | - | - | - |
| 4К | 4Со | 19±0.35 | - | 20±0.36 | 12±0.22 | 20±0.24 | 13±0.25 | 20±0.23 | 15±0.15 | - | - |
| 12К | 12Ph | 24±0.22 | 13±0.2 | 20±0.21 | - | 30±0.32 | 17±0.26 | 28±0.34 | - | 26±0.31 | 16±0.21 |
| 15К | 15Mc | - | - | - | - | 25±0.31 | 13±0.21 | 15±0.28 | - | - | - |
| 19К | 19Mc | - | - | - | - | 15±0.23 | 13±0.22 | - | - | - | - |
| контроль | | | | | | | | | | | |
| Ц | 30мкг/диск | 30±0.33 | | 28±0.32 | | 30±0.35 | | 30±0.34 | | - | |

Вторичные метаболиты, полученные из Б/М- биомассы, из К/Ж-культуральной жидкости

По результатам изучения морфологических и культуральных свойств отобранных изолятов было установлено, что 4Со-изолят относится к роду *Aspergillus*, 12Ph-изолят к роду *Penicillium* и 15Mc-изолят к роду *Fusarium* (см. рис. 1).

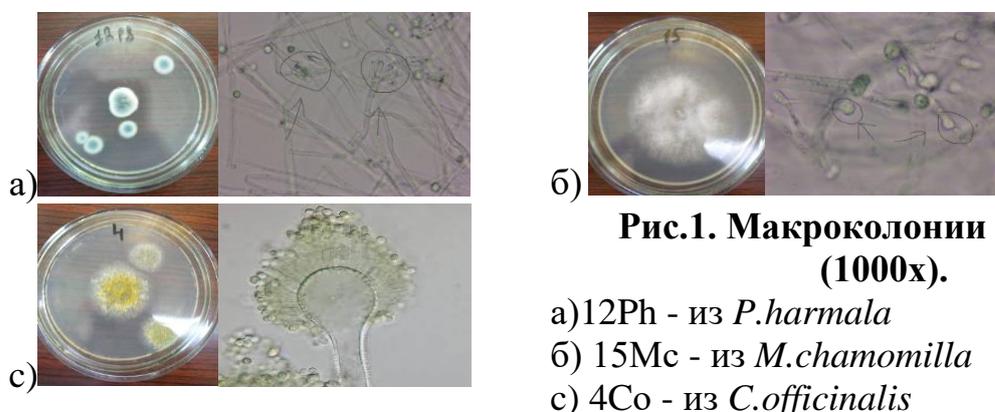


Рис.1. Макроколонии изолятов (1000х).

- а) 12Ph - из *P.harmala*
- б) 15Mc - из *M.chamomilla*
- в) 4Со - из *C.officinalis*

В ходе дальнейших экспериментов изолят 1Со утратил ростовые свойства в искусственных условиях культивирования и поэтому в дальнейших исследованиях не использовался.

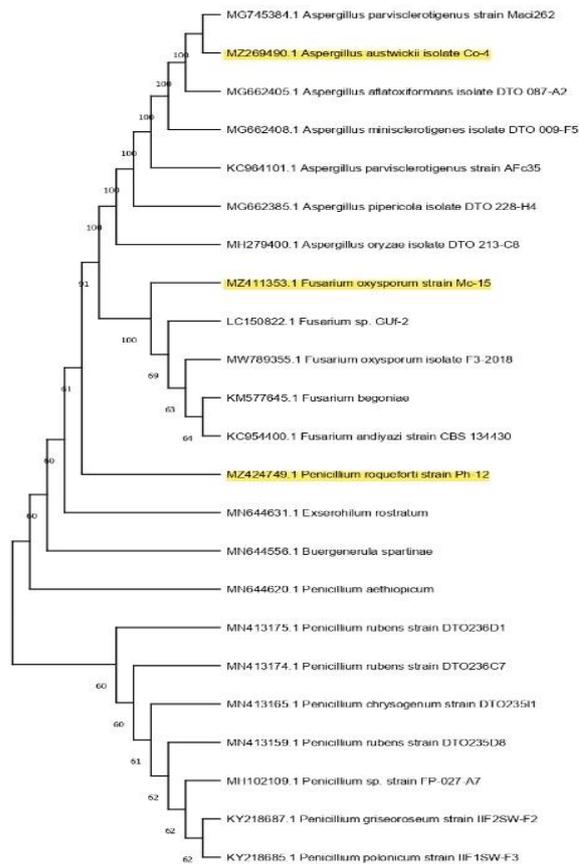


Рис.2. Филогенетическая родословная штаммов

Нуклеотидные последовательности определяли путем секвенирования ITS-областей изолятов. Полученные данные анализировали путем выравнивания в программе BLAST на международной базе данных NCBI. По полученным данным: изолят 4Co на 98,71% подобен *Aspergillus austwickii*, 12Ph – на 99,68% на *Penicillium roqueforti*, 15Mc – на 99,55% на *Fusarium oxysporum*. На основании результатов изоляты 4Co *Aspergillus austwickii* 4Co (MZ269490), 12Ph *Penicillium roqueforti* 12Ph (MZ424749) и 15Mc *Fusarium oxysporum* 15Mc (MZ411353) были зарегистрированы в международной базе данных NCBI. На основе этих данных, в программе MEGA было создано филогенетическое дерево изолятов с использованием метода «neighbor joining» (см. рис. 2).

На основании представленных данных наиболее активный штамм *Penicillium roqueforti* 12Ph был отобран для дальнейших исследований.

Наиболее оптимальную питательную среду для накопления биомассы и вторичных метаболитов подбирали путем выращивания выбранного штамма на различных питательных средах, предназначенных для грибов: Чапека-Докса, картофельно-декстрозном бульоне, Манделеса, Сабуро (см. рис.3).

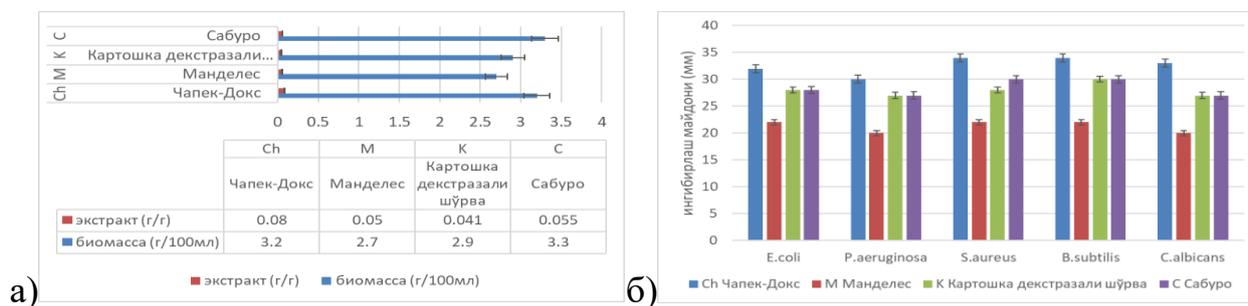


Рис.3. Количество биомассы, метаболитов (а) и антибактериальная активность (б) *P.roqueforti* 12Ph на различных питательных средах

Максимальное количество накопления биомассы наблюдалось на среде Сабуро ($3,3 \pm 0,16$ г), на втором и третьем местах – Чапека-Докса ($3,2 \pm 0,15$ г) и картофельно-декстрозный бульон ($2,9 \pm 0,14$ г) соответственно. По сумме общих экстрактов, полученных из биомассы, самый высокий экстракт

наблюдался у Чапека-Докса (80мг/г). На втором месте оказалась питательная среда Сабуро (55мг/г). Полученные суммарные экстракты растворяли в ДМСО, для получения концентрации - 3 мг/мл и определяли антибактериальную активность в отношении условно-патогенных микроорганизмов (см. Рис.4).



Рис. 4. Антибактериальная активность экстрактов *P.roqueforti 12Ph*, выращенных на различных питательных средах

Результаты показали, что наибольшей антибактериальной активностью обладал экстракт, полученный из биомассы, выращенной на питательной среде Чапека-Докса. Учитывая, что экстракты находятся в одинаковом процентном соотношении, экстракт, полученный из биомассы на среде Чапека-Докса, имеет наибольшую концентрацию веществ, обладающих антибактериальными свойствами.

Учитывая максимальный выход вторичных метаболитов и высокую антибактериальную активность, было принято решение дальнейшие исследования проводить на среде Чапека-Докса и оптимизировать ее источники углерода и азота для *P. roqueforti 12Ph*.

Максимальное количество биомассы(5.4г/100мл) и вторичных метаболитов (126мг/г) было достигнуто применением в составе питательной среды Чапека-Докса в качестве источника углерода сахарозы, в качестве источника азота комбинации пептона и дрожжевого экстракта. При этом образование биомассы и вторичных метаболитов увеличилось в среднем в 1.5 и более раз. А антибактериальная активность вторичных метаболитов была в среднем около 30-32 мм. Исходя из этого в качестве источника азота для питательной среды Чапека-Докса были выбраны комбинация пептон и дрожжевого экстракта, а в качестве источника углерода была выбрана сахароза.

В последующем исследовании для изучения эффектов на рост штамма *P.roqueforti 12Ph*, образование вторичных метаболитов и увеличение антибактериальной активности, к питательной среде добавляли 100 мкМ кверцетина в качестве эпигенетического модификатора и 2% этанола в качестве элиситора. В качестве контроля использовали питательную среду Чапека-Докса. Эндифиты выращивали в течении 3-13 сут. Из полученной биомассы выделяли вторичные метаболиты и растворяли в ДМСО в концентрации 1 мг/мл (см. Рис. 5). Максимальное количество полученной биомассы пришлось на 9 сутки для этанольной культуры ($5,3 \pm 0,34$ г/100 мл), 7 сутки для кверцетиновой культуры ($3,5 \pm 0,23$ г/100 мл) и контроля ($3,2 \pm 0,22$ г/100 мл). При этом, максимальное количество вторичных метаболитов несколько отличается от биомассы.

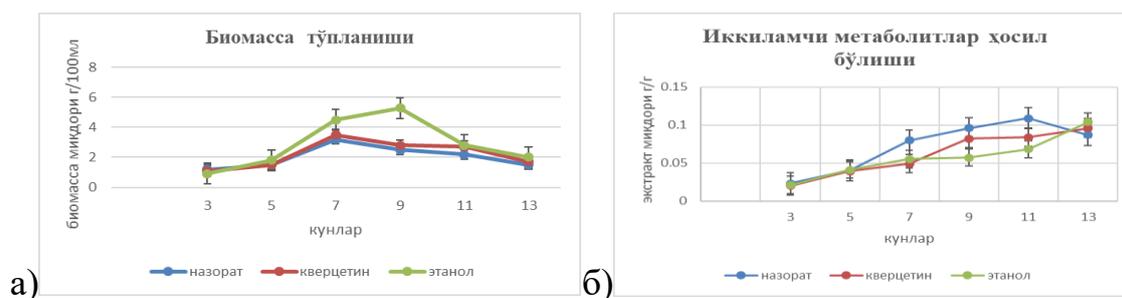


Рис.5. Влияние эпигенетического модификатора и элиситора на накопление биомассы штамма *P. roqueforti* 12Ph (а) и образование вторичных метаболитов (б)

В частности, на этанольных ($104,0 \pm 0,98$ мг/г) и кверцетиновых средах ($96,0 \pm 0,45$ мг/г) максимальное количество метаболитов наблюдалось на 13-е сутки, а в контроле ($109,0 \pm 0,97$ мг/г) максимальный экстракт был выделен на 11-й день (см. Рис. 6).

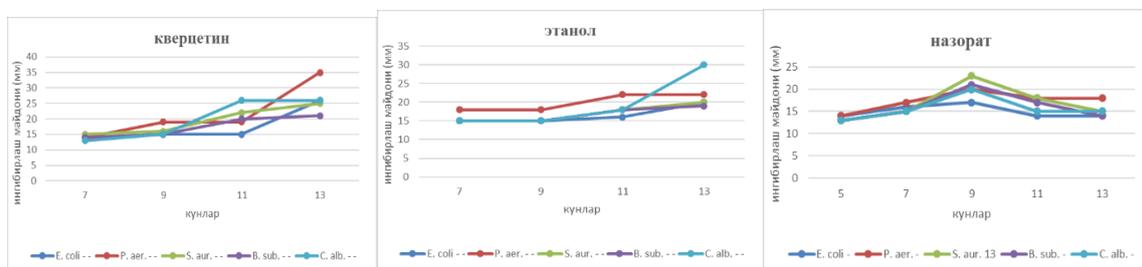


Рис.6. Влияние эпигенетического модификатора и элиситора на антибактериальную активность штамма *P. roqueforti* 12Ph

Влияние эпигенетического модификатора и элиситора на антибактериальную активность штамма *P. roqueforti* 12Ph оказалось значительным. В частности, высокая антибактериальная активность в контроле наблюдалась в основном на 9-й и 11-й дни (около 17–23 мм), тогда как антибактериальная активность в культурах с кверцетином и этанолом достигала пика на 13-й день (около 25–30 мм). При этом под влиянием эпигенетических модификаторов и элиситоров антибактериальная активность штамма *P. roqueforti* 12Ph повышалась на 30-40%.

Для установления МИК сухой суммарный экстракт штамма *P. roqueforti* 12Ph растворяли в ДМСО в концентрациях 800 мкг/мл, 600 мкг/мл, 400 мкг/мл, 200 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл и 25 мкг/мл и определяли антибактериальную активность. Полученные результаты показали, что показатель МИК суммарного экстракта составил 100 мкг/мл для *E. coli*, 400 мкг/мл для *Ps. aeruginosa* и 25 мкг/мл для *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans*. Тот факт, что суммарный экстракт штамма *P. roqueforti* 12Ph имеет показатель МИК 25 мкг/мл в отношении возбудителей *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans*, свидетельствует о его высокой эффективности.

С целью изучения ингибирующего действия суммарного экстракта изучаемого эндофитного гриба на формирование биопленок патогенными микроорганизмами, а также разлагающего действия на уже образованную

био пленку, были взяты *S.aureus*, *MRSA*, *C.albicans*. При этом были использованы МИК суммарного экстракта штамма *P.roqueforti 12Ph* (табл.3).

Таблица 3

Ингибирующее действие суммарного экстракта *P.roqueforti 12Ph* на формирование био пленки патогенных микроорганизмов

| Патогены | Контроль (среда) D (оптическая плотность) | Экстракт D (оптическая плотность) | Антибиотик D (оптическая плотность) | Экстракт, % | Антибиотик, % (цефтриаксон/ флуконазол) |
|--------------------|---|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------|---|
| <i>S. aureus</i> | 1.25 | 0.25 | 0.113 | 80% | 90.9% |
| <i>MRSA</i> | 0.57 | 0.29 | 0.418 | 49% | 26.5% |
| <i>C. albicans</i> | 1.26 | 0.101 | 0.492 | 92% | 60.8% |

Результаты показали, что суммарный экстракт *P.roqueforti 12Ph* обладает высокой ингибирующей активностью. В то время как цефтриаксон ингибировал био пленку *S.aureus* на 90,9%, суммарный экстракт ингибировал на 80%. Против *MRSA* показатель экстракта (49%) был почти в два раза выше, чем у антибиотика (26,5%). Против *C.albicans* наш экстракт показал самый высокий результат (92%) в сравнении с флуконазолом (60,8%).

Для изучения дезинтегрирующего действия суммарного экстракта *P.roqueforti 12Ph* на образованную в течение 24 часов патогенами био пленку, образцы суммарного экстракта были помещены на пленки и инкубированы еще 24 часа. Результаты, полученные после инкубации, рассчитывали на основе формулы (см. Табл. 4).

Таблица 4

Дезинтегрирующее действие суммарного экстракта *P.roqueforti 12Ph* на био пленку, образованную патогенными микроорганизмами

| Патогены | Контроль (среда) D (оптическая плотность) | Экстракт D (оптическая плотность) | Антибиотик D (оптическая плотность) | Экстракт, % | Антибиотик, % (цефтриаксон/ флуконазол) |
|--------------------|---|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------|---|
| <i>St. aureus</i> | 1.33 | 1.31 | 1.07 | 1.5% | 19.5% |
| <i>MRSA</i> | 1.47 | 1.29 | 1.41 | 12.2% | 4.08% |
| <i>C. albicans</i> | 1.7 | 1.521 | 1.27 | 10.5% | 25.3% |

Результаты резко отличаются от результатов предыдущих экспериментов. Суммарный экстракт *P.roqueforti 12Ph* оказывает высокое ингибирующее действие на формирование био пленки патогенных микроорганизмов, но его деструктивное действие на уже сформировавшуюся био пленку намного ниже. Например, био пленки *S.aureus* и *C. albicans* были почти неразрушимы. Необходимо особо отметить деструктивное влияние суммарного экстракта *P.roqueforti 12Ph* на био пленку *MRSA* - он оказался в 3 раза более активным (12,2%) по сравнению с цефтриаксоном (4,08%).

Таким образом, суммарный экстракт штамма *P.roqueforti 12Ph* может быть основой для профилактических и терапевтических препаратов против патогенных микроорганизмов.

Для определения качественного состава суммарного экстракта штамма *P.roqueforti 12Ph* вторичные метаболиты извлекали растворением в различных растворителях (гексан, метанол, бутанол, вода) с разной полярностью.

Полученные фракции растворяли в ДМСО и определяли антибактериальную активность при общей концентрации экстракта 1 мг/мл (табл. 5).

Как видно из таблицы 5, вещества, обладающие антибактериальной активностью перешли в метанольную фракцию. Однако, некоторая активность бутанольной фракции также наблюдалась в отношении *S.aureus*. Переход веществ с антибактериальной активностью в метанольную фракцию можно объяснить тем, что их полярность близка к метанольной.

Таблица 5

Антибактериальная активность фракций, полученных дифференциальным фракционированием и суммарного экстракта *P.roqueforti* 12Ph

| Фракции | Зона ингибирования, мм (диаметр лунок 10мм) | | |
|---------------------|---|-----------------|-------------------|
| | <i>MRSA</i> | <i>S.aureus</i> | <i>C.albicans</i> |
| Суммарный экстракт | 18±0.22 | 23±0.25 | 20±0.24 |
| Гексановая фракция | - | - | - |
| Метанольная фракция | 15±0.20 | 16±0.21 | 22±0.21 |
| Бутанольная фракция | - | 15±0.20 | - |
| Водная фракция | | | |

Для установления природы веществ, содержащихся в активных фракциях, их исследовали в различных качественных реакциях. Качественные реакции проводили на следующие химические классы веществ: терпеноиды, стероиды, флавоноиды, дубильные вещества, сердечные гликозиды, алкалоиды, сапонины, фенолы, антрохиноны (см. рис. 7). Как видно из данного рисунка, суммарный экстракт штамма *P.roqueforti* 12Ph, полученный с использованием этилацетата, в основном содержит соединения, относящиеся к 5 химическим классам. Это терпеноиды, стероиды, флавоноиды, сердечные гликозиды, алкалоиды. В метанольной фракции, полученной дифференциальным фракционированием из общего экстракта, обнаружены терпеноиды, флавоноиды и сердечные гликозиды. В бутанольной фракции цветную реакцию давали только флавоноиды. В гексановой и водной фракциях веществ в цветных реакциях не обнаружено.

| Fraksiyalari: | Terpenoidlar □ | Steroidlar □ | Flavonoidlar □ | Taninlar □ | Yurak glikozidlari □ | Alkoidlar □ | Saponinlar □ | Fenollar □ | Antraxinonlar □ |
|----------------------|---|---|---|------------|---|--|--------------|------------|-----------------|
| Umumiy ekstrakt □ |  |  |  | - □ |  |  | - □ | - □ | □ |
| Geksanli fraksiya □ | - □ | - □ | - □ | - □ | - □ | - □ | - □ | - □ | □ |
| Metanolli fraksiya □ |  | - □ |  | - □ |  | - □ | - □ | - □ | □ |
| Butanolli fraksiya □ | - □ | - □ |  | - □ | - □ | - □ | - □ | - □ | □ |
| Suvli fraksiya □ | - □ | - □ | - □ | - □ | - □ | - □ | - □ | - □ | □ |

Рис. 7. Фитохимические реакции различных фракций и суммарного экстракта *P.roqueforti* 12Ph

Наличие антибактериальной активности у суммарного экстракта, метанольной и бутанольной фракциях и обнаружение флавоноидов в этих фракциях подтверждают, что флавоноиды в составе фракций обладают

антибактериальной активностью. Для разделения метанольной фракции из общего экстракта штамма *P.roqueforti 12Ph* на наиболее активные субфракции методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали систему растворителей в соотношении хлороформ/этилацетат/муравьиная кислота: 5:4 : 1 (CEF), и было выделено 12 (Rf 0,93; 0,85; 0,80; 0,74; 0,65; 0,55; 0,46; 0,36; 0,25; 0,16; 0,07; 0,01) субфракций (рис. 8).

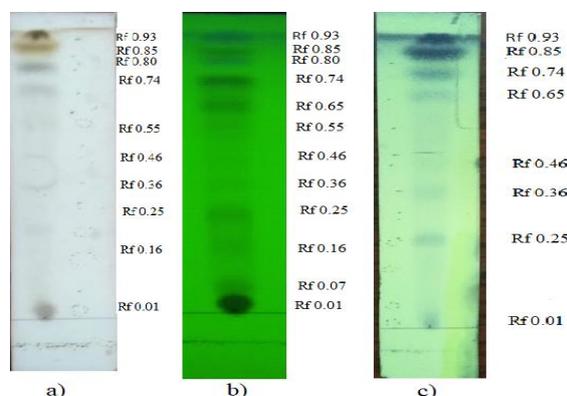


Рис.8. Визуализация субфракций метанольной фракции при различных методах детектирования

а) - пластина, обработанная 10% раствором H_2SO_4 в метаноле.

б) – пластина под ультрафиолетовом свете при 254 нм.

в) - пластина, обработанная 3% раствором $FeCl_3$ в метаноле

При обработке 3% раствором $FeCl_3$ в метаноле субфракции окрашиваются в синий цвет, что указывает на их принадлежность к флавоноидам. Это, в свою очередь, подтверждает результаты, полученные при фитохимических реакциях фракций, полученных методом дифференциального фракционирования. Субфракции собирали отдельно и изучали антимикробную активность в отношении *MRSA*, *S.aureus*, *C.albicans* путем экстрагирования веществ субфракций из сорбента силикагеля в растворы (см. табл. 6). Результаты показывают, что вещества, обладающие антибактериальной активностью в общем экстракте, в определенной степени распределяются по субфракциям. В частности, субфракции со значениями Rf 0,93, 0,85, 0,80, 0,73, 0,65, 0,55 поражали только *C.albicans*, из них Rf 0,80, 0,73, 0,07 субфракции имели самые высокие результаты ($18\pm 0,21$, $17\pm 0,20$, $18\pm 0,20$). Субфракции Rf 0,07 и 0,01 кроме *C.albicans*, *MRSA*, угнетают и *S.aureus*. Субфракции Rf 0,25, 0,16, 0,07, 0,01 показали антибактериальную активность в отношении обеих болезнетворных бактерий.

Таблица 6

Антибактериальная активность субфракций *P.roqueforti 12Ph*

| Rf значение | Субфракции | Зона ингибирования, мм (диаметр лунок 10мм) | | |
|-------------|------------|---|-------------------|-----------------|
| | | <i>MRSA</i> | <i>C.albicans</i> | <i>S.aureus</i> |
| 0.94 | 1- | - | 12 ± 0.15 | - |
| 0.85 | 2- | - | 14 ± 0.18 | - |
| 0.80 | 3- | - | 18 ± 0.21 | - |
| 0.74 | 4- | - | 17 ± 0.20 | - |
| 0.65 | 5- | - | 14 ± 0.17 | - |
| 0.55 | 6- | - | 14 ± 0.17 | - |
| 0.46 | 7- | - | - | - |
| 0.36 | 8- | - | - | 12 ± 0.15 |
| 0.25 | 9- | 12 ± 0.15 | - | 12 ± 0.15 |
| 0.16 | 10- | 12 ± 0.14 | - | 12 ± 0.14 |
| 0.07 | 11- | 12 ± 0.14 | 18 ± 0.20 | 13 ± 0.15 |
| 0.01 | 12- | 12 ± 0.15 | 13 ± 0.15 | 12 ± 0.15 |

Методом хромато-масс-спектрометрии исследовали метанольную фракцию суммарного экстракта штамма *P.roqueforti 12Ph* и ее субфракций.

Метанольную фракцию и ее субфракции сначала анализировали с помощью GC-0MS (таблицы 7-8). Полученные хроматограммы GC-MS идентифицировали путем сравнения с данными в базе данных NIST 17.L.

Таблица 7

GC-MS анализ метанольной фракции *P.roqueforti 12Ph*

| Номер пика | Время пика | Library/ID MassHunter\Library\NIST17.L | Сходство,(%) |
|------------|------------|--|--------------|
| 1 | 3.757 | 1-бутанол, 3-метил-, ацетат | 64 |
| 5 | 8.706 | Ундекановая кислота, 10-метил-, метиловый эфир | 94 |
| 6 | 9.269 | Додекановая кислота | 64 |
| 7 | 12.064 | Метилтетрадекановая кислота | 96 |
| 8 | 12.539 | Пентадекановая кислота | 38 |
| 9 | 14.378 | Гексадекановая кислота, метиловый эфир | 91 |
| 10 | 14.713 | N-гексадекановая кислота | 87 |
| 15 | 16.137 | 9,12-октадекадиеновая кислота (Z, Z) - | 76 |

Из вышеприведенных данных видно, что метанольная фракция суммарного экстракта штамма *P.roqueforti 12Ph* с антибактериальной активностью и ее субфракции богаты соединениями, относящимися к разным химическим группам. В частности, алканы, жирные кислоты, соединения аминогрупп и др. В научных источниках имеется множество данных об антибактериальной активности каждого из них.

Таблица 8

GC-MS анализ субфракций метанольной фракции *P.roqueforti 12Ph*

| Rf значение | Номер пика | Время пика | Library/ID MassHunter\Library\NIST17.L | Сходство,(%) |
|-------------|------------|------------|--|--------------|
| 0.937 | 12 | 7.281 | Гидроксиламин, О-децил- | 83 |
| 0.850 | 11 | 5.796 | Аллиловый и этиловый эфир щавелевой кислоты | 78 |
| | 16 | 8.603 | Карбендазим | 64 |
| 0.800 | 7 | 5.184 | Диазиридин, 3-этил-3-метил- | 64 |
| | 12 | 5.795 | Аллилгексадециловый эфир щавелевой кислоты | 72 |
| | 14 | 6.233 | 2,3,4,5,6-пентометилацетофенон | 81 |
| 0.737 | 14 | 14.691 | N-гексадекановая кислота | 64 |
| 0.650 | 4 | 4.940 | 1-этил-2,2,6-триметилциклогексан | 68 |
| 0.550 | 17 | 6.232 | 2,3,4,5,6-пентометилацетофенон | 76 |
| | 18 | 7.279 | Ундекан, 2,6-диметил- | 64 |
| 0.462 | 5 | 5.182 | Декан | 64 |
| 0.362 | 13 | 5.794 | Изобутилнониловый эфир щавелевой кислоты | 64 |
| 0.250 | 5 | 8.706 | Ундекановая кислота, 10-метил-,метиловый эфир | 94 |
| | 6 | 9.269 | Додекановая кислота | 64 |
| 0.162 | 7 | 12.064 | Метилтетрадекановая кислота | 96 |
| | 8 | 12.539 | Пентадекановая кислота | 38 |
| 0.075 | 9 | 14.378 | Гексадекановая кислота, метиловый эфир | 91 |
| | 10 | 14.713 | N-гексадекановая кислота | 87 |
| 0.012 | 2 | 4.498 | 2,2,2-трифторэтиловый эфир 9-октадекановой кислоты | 74 |
| | 15 | 16.137 | 9,12-октадекадиеновая кислота (Z, Z) - | 76 |

На основании полученных результатов и анализа научных источников можно заключить, что штамм эндофитного гриба *Penicillium roqueforti 12Ph*, выделенный из растения *Peganum harmala*, богат различными антимикробными соединениями и может быть использован в качестве перспективного источника биологически активных веществ для фармацевтической промышленности.

ВЫВОДЫ

1. В диссертационной работе изучены антибактериальные свойства некоторых лекарственных растений Узбекистана: из 5 лекарственных растений с высокой активностью выделен 41 эндофитный изолят гриба. В результате скрининга по антибактериальной активности были отобраны наиболее активные изоляты 1Co, 4Co, 12Ph и 15Mc.

2. Выделенные 3 изолята с высокой антибактериальной активностью были идентифицированы классическим и молекулярно-генетическим методами и включены в базу данных NCBI. Изолят 4Co был назван *Aspergillus austwickii* Co-4 (MZ269490), 12Ph - *Penicillium roqueforti* 12Ph (MZ424749) и 15Mc - *Fusarium oxysporum* 15Mc (MZ411353). Для дальнейших экспериментов выбран *Penicillium roqueforti* 12Ph.

3. Проведена оптимизация питательной среды Чапека-Докса для штамма *Penicillium roqueforti* 12Ph. Установлено, что оптимальным источником углерода является сахароза, источником азота - сочетание дрожжевого экстракта с пептоном, увеличивающие прирост биомассы и вторичных метаболитов в 1.5 раза. Добавление в питательную среду кверцетина в качестве эпигенетического модификатора и этанола в качестве элиситора для повышения антибактериальной активности штамма *Penicillium roqueforti* 12Ph привело к максимальному синтезу вторичных метаболитов с антибактериальными свойствами на 13-й день роста и увеличению активности на 30-40%.

4. Определена минимальная ингибирующая концентрация (МИК) суммарного экстракта эндофита *Penicillium roqueforti* 12Ph. Установлено, что для *E.coli* она составляет 100 мкг/мл, для *P.aeruginosa* – 400 мкг/мл, для *S.aureus*, *B.subtilis* и *C.albicans* – 25 мкг/мл. Изучено влияние суммарного экстракта гриба *Penicillium roqueforti* 12Ph на формирование и дезинтеграцию биопленки патогенных микроорганизмов. Обнаружено, что экстракт ингибирует образование биопленки *S.aureus* на 80%, *MRSA* на 49% и *C.albicans* на 92%. Дезинтегрирующее действие экстракта проявилось на разложении биопленки, образованной *S.aureus* на 1,5 %, *MRSA* на 12,2 % и *C.albicans* на 10,5 %.

5. Химический состав фракций суммарного экстракта штамма *Penicillium roqueforti* 12Ph изучен с помощью фитохимических реакций, в которых фракции содержали соединения, относящиеся к химическим классам терпеноидов, стероидов, флавоноидов, сердечных гликозидов, алкалоидов, а также флавоноидных соединений с антибактериальной активностью.

6. Методом тонкослойной хроматографии метанольную фракцию разделили на 12 субфракций и определили их антибактериальную активность. Установлено, что субфракции с 9 по 12 проявляли антибактериальную активность в отношении *MRSA*, субфракции 1-6 и 11-12 подавляли рост *S.aureus*; Было обнаружено, что с 8 по 12 субфракции обладают антибактериальной активностью против *C.albicans*. Анализ полученных субфракций методом GC-MS обнаружил содержание метилового эфира гексадекановой кислоты с антибактериальной активностью, в субфракции со значением Rf 0,075, в субфракции со значением Rf 0,737, 0,075, 0,012 были обнаружены н-гексадекановые кислоты (9,12-Z) с бактериостатической активностью. Карбендазим, вещество с антибактериальной активностью, выявлен в субфракции со значениями Rf 0,850.

**SCIENTIFIC COUNCIL AWARDING SCIENTIFIC DEGREE
DSc.02/30.12.2019.B.38.01 AT INSTITUTE OF MICROBIOLOGY**

INSTITUTE OF MICROBIOLOGY

YUSUPOV ULUGBEK KARIM OGLI

**ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF ENDOPHYTIC FUNGI OF SOME
MEDICINAL PLANTS OF UZBEKISTAN**

03.00.04 – Microbiology and virology

**DISSERTATION ABSTRACT FOR THE DOCTOR OF PHILOSOPHY ON
BIOLOGICAL SCIENCES (PhD)**

Tashkent – 2022

The dissertation of the Doctor of Philosophy (PhD) has been registered with the number B2022.1.PhD/B656 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.

The dissertation has been prepared at the Institute of Microbiology.

The abstracts of dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council (www.info-microbio@academy.uz) and on the information-educational portal "ZiyoNet" (www.ziyo.net).

Scientific supervisor: **Abdulmyanova Liliya Ilyasovna**
Doctor of biological sciences

Official opponents: **Tashmuxeidova Shohista Sobirovna**
Doctor of biological sciences, Professor

Pulatova Ozoda Mansurovna
Candidat of biological sciences

Leading organization: Institute of Botany

The defense of the dissertation will take place on «26» July 2022 in 10 at the meeting of the Scientific Council DSc.02 / 30.12.2019.B.38.01 at the Institute of Microbiology ASRUz (at the following address: 100128, Tashkent, A.Kadyri str. 7b, conference hall of the institute of Microbiology. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, fax: (+99871) 241-92-71, e-mail: info-microbio@academy.uz).

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre at the institute of Microbiology under № __. (Address: 100128, Tashkent, A.Kadyri str. 7b, administration building of the Institute of Microbiology, floor 5, library. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, fax: (+99871) 241-92-71, e-mail: info-microbio@academy.uz).

The abstract of dissertation is distributed on: «8» July 2022.

(Protocol at the register № «7» from «8» July 2022.


Aripov Takhir
Chairman of the scientific council awarding scientific degrees, D.B.Sc., Academician
Juraeva Robila
Scientific secretary of the scientific council awarding scientific degrees, PhD, senior researcher
Gulyamova Tashkhan
Chairman of the Scientific Seminar under the scientific council awarding scientific degrees, Dr. Sc.B., professor

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of the dissertation was an isolation endophytic fungi synthesizing biologically active substances with stable antibacterial properties and a determination their potential for production of antibacterial compounds.

The objects of the study were medicinal plants with antibacterial properties, endophytic fungi isolated from these plants, and opportunistic microorganisms.

The scientific novelty of the research is as follows:

- The relationship between the antibacterial properties of some medicinal plants growing in Uzbekistan and endophytic fungi living in them has been revealed;
- For the first time on the territory of Uzbekistan, a strain of the endophytic fungus *Penicillium roqueforti* 12Ph, synthesizing substances with high antibacterial activity, was isolated from the medicinal plant *Peganum harmala* and identified.
- For the first time, in the secondary metabolites of endophytic fungi of some medicinal plants growing on the territory of Uzbekistan, were found some substances such as hexadecanoic acid methyl ester, n-hexadecanoic acid, 9,12-octadecanoic acid (Z, Z) and carbendazim with antibacterial properties.
- The high inhibitory effect on biofilm formation and destructive effect on the formed film of pathogenic microorganisms, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, of secondary metabolites isolated from a strain of the endophytic fungus *Penicillium roqueforti* 12Ph has been substantiated.

Implementation of the research results. Based on the results of a scientific study of the formation of antibacterial compounds by endophytic fungi of medicinal plants of Uzbekistan:

- A patent for an invention was obtained from The Intellectual Property Agency of the Republic of Uzbekistan (No. FAR 01513) for a utility model on strain of the endophytic fungus *Thielavia microspora mouchacca*-MO46L, which has antimicrobial activity. As a result, the *Thielavia microspora mouchacca*-MO46L strain, isolated from *Melissa officinalis*, served as the basis for studying the antibacterial properties of endophytic fungi of medicinal plants growing on the territory of Uzbekistan;
- Dry extract of secondary metabolites of the endophytic fungus *Thielavia microspora mouchacca*-MO46L, isolated from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) was used as part of a practical research project "Development of conditions for the formation of bioactive secondary metabolites during artificial cultivation of endophytic fungi of some medicinal plants of Uzbekistan" number BA- FA-A6-005, for determining antibacterial activity against pathogenic microorganisms (Reference of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan No. 4/1255-234 dated February 2, 2022). As a result, the producer of antibacterial compounds *Thielavia microspora*-MO46L made it possible to develop recommendations for the cultivation of endophytic fungi of medicinal plants under axenic conditions for the synthesis of antibacterial substances.

The volume and structure of the dissertation. The dissertation consists of an introduction, three chapters, a conclusion, a list of references and appendices. The volume of the dissertation is 114 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I-бўлим (I часть; I-part)

1. Юсупов У.К. Минимальная ингибирующая концентрация и антибиопленочная активность эндофитного гриба *Penicillium roqueforti* 12Ph, выделенного из растения *Peganum harmala*. // UNIVERSUM: Химия и Биология/ 2(92) 2022. DOI - 10.32743/UniChem.2022.92.2.13021 (02.00.00 №1).
2. Yusupov U.K. O‘zbekistoning ba’zi dorivor o‘simliklari endofit zamburug‘larining antibakterial faolliklari va ularning identifikatsiyasi. // O‘zbekiston Milliy universiteti xabarlari, 2022, [3/1] 227-232-betlar (03.00.00 № 9).
3. Yusupov U.K. Идентификация антимикробного штамма, выделенного из растения *Peganum harmala*, произрастающего на территории Узбекистана. // Guliston Davlat universiteti axborotnomasi, Tabiiy va qishloq xo‘jaligi fanlari seriyasi. 2021. № 4, 33-38-бетлар (03.00.00 №3).
4. Патент № FAP 01513 30.06.20. Штамм эндофитного гриба *Thielavia Microspora Mouchacca-1E* обладающий антимикробной активностью. // Абдульмянова Л.И., Гулямова Т.Г., Каримова Ф.А., Юсупов У.К., Махкамова М.П.

II-бўлим (II часть; II-part)

5. Юсупов У.К., Шухратова М.Л., Абдульмянова Л.И. Антибактериальные свойства эндофитных грибов гармалы и саксаула. // VII ежегодной Всероссийская заочной научно-практической конференции с международным участием Микробиология в современной медицине. Сборник Тезисов Казань, 27 Июня 2019. Ст. 91
6. Юсупов У.К., Сохибназарова Х.А., Абдульмянова Л.И. Противостафилококковая активность эндофитного гриба *Thielavia microspora* - MO46L. // IX Всероссийская конференция молодых ученых “Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой” Стратегия, Саратов 14-18-октября 2019. Ст. 77
7. Абдульмянова Л.И., Мухаммедов И.И., Юсупов У.К., Каримова Ф.А. Влияние этанола на биоактивность эндофитов Узбекистана. // Республиканская научно-практическая конференция «Состояние и Перспективы Развития Микробиологии и Микробной Биотехнологии в Узбекистане» Ташкент, 24 октября 2019. Ст. 47
8. Юсупов У.К., Абдульмянова Л.И., Шеримбетов С.Г. *Peganum harmala* L. Ўсимлигидан ажратилган эндофит замбуруғ иккиламчи метаболитларининг антимикроб хусусиятлари. // Международная конференция молодых ученых «НАУКА И ИННОВАЦИИ» Ташкент, 1 ноября 2019, Ст. 139.

9. Юсупов У.К., Абдульмянова Л.И. *Peganum harmala* эндофит замбуруғи *Penicillium roqueforti* Ph-12нинг антибиоплёнка фаоллигини ўрганиш. // “Абу Али Ибн Сино Ва Замонавий Фармацевтикада Инновациялар” IV Халқаро Илмий-Амалий Анжуман Мақолалар Тўплами, 20-mart 2021 Toshkent, б-287.
10. Yusupov U.K., Abdulmyanova L.I., Gulyamova T.G. Molecular Identification of Antimicrobial Active Endophytic Fungi Isolated from *Calendula officinalis*. // International Conference on Microbiology “Biology and Biotechnology on Microorganisms-ICMBB 2021” 16-17 September 2021 Toshkent, online, p-73.
11. Yusupov U.K., Abdulmyanova L.I., Mamadrakhimov A. / *Penicillium roqueforti* Ph-12 shtammi ikkilamchi metabolitlarining xromatografik tahlili. // O‘zbekistonda mikrobiologiya va mikrob biotexnologiyasining o‘rni va uni yanada rivojlantirish istiqbollari online/respublika ilmiy anjumani, 2021 yil 17 noyabr, b-105.
12. Абдульмянова Л.И., Юсупов У.К., Гулямова Т.Г. Влияние экстракта *Vinca rosea* на алкалоидсинтезирующую активность эндофитных грибов. // Сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции, посвященной 85-летию Курского государственного медицинского университета, Курск, 7 февраля 2020, Ст. 662-665.
13. Абдульмянова Л.И., Юсупов У.К., Шарипова З.О., Каримова Ф.А. Антибактериальные свойства экстрактов эндофитных грибов Melissa лекарственной. // Сборник VIII ежегодной Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием посвящённой 100-летию кафедры микробиологии имени академика В.М. Аристовского ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России и 120-летию ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора, Казань, 15 июня 2020, Ст. 23-24.
14. Abdulmyanova L.I., Yusupov U.K., Sharipova Z.O. Влияние этанола на антибактериальную активность эндофитного гриба *Thielavia microspora-MO46L* из *Melissa officinalis*. // Международная конференция, Чехия, 2020. Ст. 15-17

Автореферат “Ўзбекистон кимё журналі” таҳририятида таҳрирдан
ўтказилди.

Босишга рухсат этилди: 11.07.2022
Бичими: 60x84 ^{1/16} «Times New Roman»
гарнитурда рақамли босма усулда босилди.
Шартли босма табағи 2,8. Адади 100. Буюртма: № 146
Тел: (99) 832 99 79; (99) 817 44 54
Гувоҳнома reestr № 10-3279
“IMPRESS MEDIA” МЧЖ босмаҳонасида чоп этилди.
Манзил: Тошкент ш., Яккасарой тумани, Кушбеги кўчаси, 6 уй.