

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

МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

КУЛОНОВ АБДУЛАЗИЗ ИБРАГИМОВИЧ

**МАҲАЛЛИЙ ГАЛОФИЛ БАКТЕРИЯЛАР –
ПОЛИСАХАРИДЛАРНИНГ ИСТИҚБОЛЛИ ПРОДУЦЕНТЛАРИ**

03.00.12 – Биотехнология

**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)

Кулонов Абдулазиз Ибрагимович

Маҳаллий галофил бактериялар полисахаридларнинг истиқболли
продуцентлари..... 3

Кулонов Абдулазиз Ибрагимович

Местные галофильные бактерии – как потенциальный продуцент
полисахаридов..... 22

Kulonov Abdulaziz Ibragimovich

The local halophilic bacteria as a potential producer of
polysaccharides..... 42

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

КУЛОНОВ АБДУЛАЗИЗ ИБРАГИМОВИЧ

**МАҲАЛЛИЙ ГАЛОФИЛ БАКТЕРИЯЛАР –
ПОЛИСАХАРИДЛАРНИНГ ИСТИҚБОЛЛИ ПРОДУЦЕНТЛАРИ**

03.00.12 – Биотехнология

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

Тошкент – 2022

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2019.4.PhD/В415 рақам 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:	Мирзарахметова Дилбар Тохтамуратовна техника фанлари доктори, профессор
Расмий оппонентлар:	Ташмухамедова Шохиста Собировна биология фанлари доктори, профессор Насметова Саодат Мамажановна биология фанлари доктори
Етакчи ташкилот:	Биоорганик кимё институти

Диссертация ҳимояси Микробиология институти DSc.02/30.12.2019.B.38.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2022 йил «06» декабрь соат 10⁰⁰ даги 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. () рақами 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 «22» ноябрда тарқатилди.

(2022 йил «22» ноябрь № 9 рақамли реестр баённомаси)



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

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

Гулямова Ташхан Гафуровна
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 полисахаридларга бўлган эҳтиёжлари саноат даражасида ортиши сабабли экзополисахарид (ЭПС) ҳосил қилувчи микроорганизмларни излаш, аниқлаш ва улардан фойдаланишни талаб этмоқда. Маълумки, микроорганизмлар ЭПСларининг роли инсон фаолиятининг турли соҳаларида: тиббиёт, косметика, озиқ-овқат, нефт саноати, қишлоқ хўжалиги ва бошқа соҳаларда кенг қўлланилмоқда. Микроорганизмлардан ЭПС олиш жараёни иқлим ва мавсумга боғлиқ эмаслиги иқтисодий жиҳатдан қулай ҳамда биотехнологик нуқтаи назардан ўсимлик ва ҳайвон полисахаридларига нисбатан перспектив ҳисобланади. Галофил бактерияларни ўстириш шароитларига боғлиқ ҳолда олинадиган ЭПС хусусиятларини бошқариш ҳамда уларни саноат чиқиндилари каби арзон субстратлар асосидаги озуқа муҳитларда ўстириш имкониятлари мавжуд. Шунингдек, галофил бактерияларнинг ЭПСлари структуравий ва функционал хилма хиллиги туфайли катта қизиқиш уйғотмоқди. Шу сабабли, юқори потенциалга эга бўлган галофил бактериялардан ЭПС олиш ва амалиётга жорий этиш муҳим аҳамиятга эга.

Жаҳонда янги полисахаридлар ва уларнинг продуцентларини аниқлашиш, микроорганизмлар полисахаридларини қўллаш соҳалари доимий равишда кенгайтириш бўйича илмий тадқиқотлар олиб борилмоқда. Жумладан, галофил бактериялар ЭПСларининг хилма хил функционал (сувда эрувчанлиги, юқори қовушқоқликка эга эритмалар, геллар ҳосил қилиш қобилияти) ва биологик (антиоксидант, иммуномодулятор, яллиғланишга қарши, бактерицид, радиопротектив, яраларни даволовчи, саратонга қарши, антиканцероген) хусусиятлари, эмульсия ва гелъ ҳосил қилувчи, барқарорлаштирувчи, қуюлтирувчи моддалар сифатида ҳамда антиоксидантлик, саратонга қарши ва цитотоксиклик каби саломатлик учун фойдали фаолликларга эга эканлиги сабабли, озиқ-овқат, фармацевтика, тиббиёт, косметика, биоремедиация каби турли соҳаларда ўзига хос хусусиятларга эга бўлган полисахаридлардан фойдаланишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Шунга кўра, ЭПС продуценти бўлган галофил бактерияларни ажратиш олиш ва улардан ЭПС олиш биотехнологиясини такомиллаштириш муҳим илмий ва амалий аҳамиятга эга.

Республикамызда сифатли, экологик тоза, импорт ўрнини босувчи ва маҳаллий хомашё асосида биополимер маҳсулотлар олиш ва уларни саноат миқёсида ишлаб чиқаришга алоҳида эътибор қаратилмоқда, шунингдек, танлаб олинган продуцент-штаммлардан фойдаланиш имкониятларини баҳолаш ва уларнинг амалий ҳамда иқтисодий натижаларни асослаш бўйича муайян натижаларга эришилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида¹ «...маҳаллий хомашё ресурсларини чуқур қайта ишлаш асосида юқори қўшимча қийматли тайёр маҳсулот ишлаб чиқариш» вазифалари белгилаб берилган. Мазкур

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

вазифаларини амалга оширишда, жумладан маҳаллий галофил бактерия штаммлари ва хомашёлар асосида сифатли, экологик тоза, юқори молекуляр экзополисахаридлар синтези асосида янги зарарсиз биопрепаратлар олиш ва амалиётга қўллаш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон “Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида”ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2020 йил 25 ноябрдаги ПҚ-4899-сон «Биотехнологияларни ривожлантириш ва мамлакатнинг биологик хавфсизлигини таъминлаш тизимини такомиллаштириш бўйича комплекс чора-тадбирлар тўғрисида»ги қарори, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2022 йил 28 январдаги ПФ-60-сон «Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2022-2026 йилларда Янги Ўзбекистоннинг тараққиёт стратегияси тўғрисида»ги Фармони ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг V. «Қишлоқ хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф-муҳит муҳофазаси» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Жаҳон илмий адабиётларида юқори биологик ва функционал фаолликка эга галофил бактерия штаммларини ажратиш, экзополисахаридлар ҳосил қилиш потенциалига кўра танлаб олиш ва улардан халқ хўжалигининг турли соҳаларида фойдаланишга доир маълумотлар жуда кенг ёритилган (Casillo A. ва бошқ., 2018; Husseiny S.M. ва бошқ., 2015). Кўплаб адабиётларда экзополисахарид синтез қилувчи галофил бактерия штаммларини ажратиб олинган ва морфологик, физиологик-биокимёвий хусусиятлари аниқланган (Llamas I. ва бошқ., 2012), галофил бактериялардан ЭПС олиш унумдорлигини ошириш учун озуқа муҳити таркибини ва ўстириш шароитларини оптималлаштириш, олинган ЭПС физик-кимёвий хусусиятларини ўрганиш (Finore I. ва бошқ., 2014; Pal A. ва бошқ., 2015), экзополисахаридлардан саноатда гел ҳосил қилувчи агентлар, биосурфактантлар, эмульгаторлар ва биосорбентлар сифатида фойдаланиш (Segretin A.B. ва бошқ., 2018), галофил бактерия ЭПС ларининг антиоксидант, антимикроб фаоллигини баҳолаш, иммуномодулятор, саратонга қарши фаолликларини аниқлашга (Dave Sh.R. ва бошқ., 2020; Boujida N. ва бошқ., 2018) оид илмий ишлар кенг ёритилган.

Республикамиз олимлари томонидан Орол бўйи минтақаларидан маҳаллий экстремофил ва галофил микроорганизмлар штаммларини ажратиб олиш, фаол галофил бактерияларнинг юқори биотехнологик потенциалини аниқлаш (Кондрашева К.В., 2010; Жураева Р.Н., 2011; Зайнитдинова Л.И., Куканова С.И., 2017) ҳамда экзополисахаридлар ишлаб чиқарувчи лактобактерияларнинг маҳаллий штаммларини танлаш, ЭПС физик-кимёвий хусусиятлари ва биологик фаоллигини аниқлаш (Элова Н.А., 2019),

шунингдек, диазотроф ризобактериялар экзополисахаридлари асосида кумуш нанозарралари олиш (Расулов Б.А., 2019) айрим хўжалик соҳаларида фойдаланиш бўйича илмий тадқиқотлар олиб борилган.

Бактериялардан полисахаридлар олиш технологияси бўйича тадқиқотлар олиб бориш, бактерияларни муҳитда ўстириш жараёнини бошқариш орқали полисахаридлар ҳосил бўлишини назорат қилиш, полисахаридларнинг технологик аҳамиятини аниқлаш, полисахаридлар структураларини мақсадли ўзгартириш яъни қовушқоқлигини ошириш, реологик хусусиятларини яхшилаш, шунингдек, юқори биологик фаолликка эга янги полисахарид ҳосилаларини олиш муҳим илмий амалий аҳамият касб этади.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган олий таълим ёки илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Микробиология институти илмий - тадқиқот ишлари режасининг ПЗ-20170928599 «Ўзбекистон шароитларида сувўтларни ўстириш технологияларини яратиш ва унинг асосида биологик фаол моддалар олиш» (2018-2020 йй.), А-ФА-2021-428 «Ҳозирги Орол ва Оролбўйи ҳудуди микроб мажмуалари: хилма-хиллиги, хусусиятлари ва биотехнологик истиқболлари» (2021-2023 йй.) мавзуларидаги фундаментал ва амалий лойиҳалари доирасида бажарилмоқда.

Тадқиқотнинг мақсади экзополисахаридлар ҳосил қилувчи маҳаллий галофил бактериялар ажратиб олиш ва уларнинг ЭПС ҳосил қилиш потенциалини баҳолашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

шўрланиш даражаси юқори бўлган сув ва тупроқ намуналаридан галофил бактерияларни ажратиб олиш ва уларининг ЭПС ҳосил қилиш потенциалини баҳолаш;

энг фаол ЭПС синтез қилувчи галофил бактерия штамmlарининг тур мансублигини аниқлаш;

маҳаллий галофил бактерия штамми ҳосил қилган ЭПС ларни ажратиб олиш ва тавсифлаш;

ЭПС унумини ошириш учун ўстириш шароитларини оптималлаштириш;

галофил бактерия штамми асосида ЭПС олиш биотехнологиясини тавсия этиш ва техник-иқтисодий самарадорлигини ҳисоблаш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида республикамизнинг юқори шўрланган ҳудудларидан ажратиб олинган маҳаллий галофил бактерия штамmlари ва *Halovibrio variabilis* UzAS3 штаммидан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг предмети юқори шўрланган табиий манбалардан фаол ЭПС продуцентини аниқлаш ва танлаб олинган продуцент штаммининг ЭПС ҳосил қилиш потенциалини оширишдан иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқотларни бажариш жараёнида микробиологик, биокимёвий, аналитик кимё, молекуляр-генетик, ва биотехнологик каби анъанавий ва замонавий тадқиқот усулларидан фойдаланилди.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

илк бор Ўзбекистонда *Halovibrio*, *Salinicola* ва *Halomonas* авлодларига мансуб галофил бактериялар тоза культура ҳолида ажратиб олинди ва улар асосида галофил бактериялар коллекцияси яратилган;

маҳаллий галофил бактерия штаммлари орасида ЭПС ҳосил қилиш потенциалига кўра скрининг қилинган ва натижада *Halovibrio variabilis* UzAS3 энг фаол штамм сифатида танлаб олинган;

илк бор *Halovibrio variabilis* галофил бактериясининг ЭПС ҳосил қилиши кузатилди ва ЭПС ҳосил қилиш оптимал шароитлари аниқланган;

Halovibrio variabilis UzAS3 штаммидан ажратиб олинган ЭПСнинг физик-кимёвий хусусиятлари аниқланди ва уларда антиоксидант, цитотоксик каби биологик фаолликлари аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

ЭПС ҳосил қилувчи *Halovibrio variabilis* UzAS3 штаммини танлаб олиш мисолида продуцент штаммларни юқори шўрланган табиий манбалардан ажратиб олиб ўрганиш асосланган;

фаол ЭПС (9,75 г/л) продуценти – *Halovibrio variabilis* UzAS3 штаммининг ЭПС ҳосил қилиш оптимал шароитлари аниқланган ҳамда ЭПС олиш технологик схемаси яратилган.

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 юқори ЭПС ишлаб чиқариш фаоллигига эга бўлган галофил бактериянинг *Halovibrio variabilis* турига мансуб маҳаллий штамми шўрланиш даражаси юқори табиий манбалардан ажратилиб, идентификация қилинганлиги ҳамда тадқиқ қилинаётган бактериянинг ЭПС ҳосил қилиш қобиляти аниқланганлиги ва ЭПС ишлаб чиқариш имкониятини очиб берилиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти микроорганизмлар коллекцияси галофил бактерияларнинг янги ЭПС синтезлаш хусусиятларига эга штаммлари билан бойитилиши, ЭПС-ҳосил қилувчи галофил бактерия штаммлари қишлоқ хўжалигида ҳосилдорликни оширишга қаратилган мақсадли технология яратишга хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Маҳаллий галофил бактериялар полисахаридларнинг истиқболли продуцентларини ўрганиш илмий тадқиқот натижалари асосида:

экзополисахарид ҳосил қилувчи галофил бактерия *Halovibrio variabilis* UzAS3 штамми учун Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг фойдали модел патенти (№ FAP 01761, 2021 й.) олинган.

Натижада маҳаллий галофил бактерия *Halovibrio variabilis* UzAS3 штамми асосида ЭПС олиш технологиясини яратиш имконини берган;

Орол денгизига яқин тузли кўлдан ажратиб олинган *Halovibrio variabilis* галофил бактерия штамми 16S рPHK нуклеотидлар кетма-кетлиги National Center for Biotechnology Information (NCBI) маълумотлар базасига *Halovibrio variabilis* UzAS3 сифатида MW722894.1 рақам билан рўйхатдан ўтказилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2021 йил 08 ноябрдаги 4/1255-3067-сон маълумотномаси). Натижада ушбу штамм галофил ва галотолерант бактериялар коллекциясини бойитиши ва электрон базаси ахборот-таҳлил тизимини шакиллантириш имконини беради;

соянинг “Селекта” навини етиштиришда *Bradyrhizobium japonicum* + 1% ЭПС асосида тайёрланган биопрепаратини Самарқанд вилояти Оқдарё тумани “Кумушкент Хумо-қуши” фермер хўжалигида жорий этилган (Ўзбекистон Республикаси Қишлоқ хўжалиги вазирлигининг 2022 йил 07 октябрдаги 07/25-04/7246-сон маълумотномаси). Натижада соя уруғларига экишдан олдин пуркаш орқали қўлланилганда ҳосилдорликни 3,0 ц/га ошириш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Тадқиқот натижалари, жами 11 та, жумладан, 5 халқаро ва 6 республика илмий-амалий анжуманларда муҳокама қилинган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича 17 та илмий иш чоп этилган, шулардан 5 таси илмий мақола бўлиб, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертациялар асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда, жумладан, 3 таси республика нашрларида, 2 таси хорижий журналларда нашр этилган, 1 та фойдали модел патенти олинган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, учта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 113 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертациянинг тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Бактериялар полисахаридларини ишлаб чиқариш технологияларини ривожлантириш муаммолари ва тенденцияларининг ҳолатини таҳлил қилиш тўғрисида адабиёт манбаларининг шарҳи**» деб номланган биринчи бобида микроорганизмлар экзополисахаридларининг миллий иқтисодиётдаги аҳамияти, уларнинг

хусусият ва функциялари, галофил микроорганизмларнинг яшаш шароитлари, юқори шўрланган муҳитга мослашиш механизмлари ва уларнинг таснифи, ЭПС ҳосил қилувчи галофил бактерия штаммлари, улар ЭПСларининг биологик ва функционал фаоллиги ҳамда турли соҳаларда ишлатилиши бўйича илмий манбалар чуқур таҳлил қилинган.

Диссертациянинг «Галофил бактерияларни ажратиб олиш, идентификация қилиш, улардан ЭПС ажратиб олиш, тавсифлаш ва аналитик таҳлил қилиш усуллари» деб номланган иккинчи бобида тадқиқот объекти, материали ва усуллари батафсил ёритилган. Маҳаллий галофил бактерия штаммини морфологик-культурал, физиологик-биокимёвий ва молекуляр генетик усуллар билан идентификация қилиш, ўстириш учун озуқа муҳити ва шароитларини оптималлаштириш, улар ҳосил қилган ЭПСларни ажратиб олиш, тозалаш, физик-кимёвий ва биологик хусусиятларини аниқлаш усуллари ҳақида маълумотлар берилган.

Диссертациянинг «Галофил бактериялар ажратиб олиш ва уларнинг хусусиятларини тавсифлаш» учинчи бобида турли юқори шўрланган манбалардан галофил бактерия штаммларини ажратиш ва танлаб олиш, уларнинг морфологик-культурал, физиологик ва биокимёвий хоссаларини тадқиқ этиш, ажратилган галофил бактерияларнинг тур мансублигини аниқлаш, танлаб олинган галофил бактерия штаммларининг ЭПС ҳосил қилиш потенциалини баҳолаш, ЭПС биосинтези учун озуқа муҳит таркиби ва шароитларни оптималлаштириш, олинган ЭПС таркиби ва физик-кимёвий хусусиятларини аниқлаш, галофил бактериядан ЭПС олиш технологиясини тавсия этиш ва унинг техник-иқтисодий кўрсаткичларига доир тадқиқот натижалари ёритилган.

1-жадвал

Ажратиб олинган галофил изолятларнинг дастлабки скрининги

№	Изолятлар	ЭПС, мг/100 мл	№	Изолятлар	ЭПС, мг/100 мл
1.	SS01	283,7±0,34	12.	UzAS101	–
2.	SS02	–	13.	UzAS102	185,1±0,25
3.	SS101	0,12±0,08	14.	UzAS104	–
4.	SS103	–	15.	DSS01	–
5.	AS01	–	16.	DSS03	–
6.	AS02	0,5±0,11	17.	DSS04	143,7±0,33
7.	AS103	0,2±0,08	18.	DS045	0,07±0,03
8.	AS105	–	19.	KAI4	–
9.	UzAS1	–	20.	KAI105	16,7±0,25
10.	UzAS3	387,6±0,31	21.	KAI109	–
11.	UzAS4	–			

Галофил ва галотолерант бактериялар ажратиб олиш учун Республикаимизнинг юқори шўрланган ҳудудлари: Қорақалпоғистон Республикаси (Нукус, Кўнғирот, Мўйнок), Қашқадарё (Дехқонобод), Фарғона (Ёзёвон), Наманган (Чуст, Мингбулок) вилоятларининг шўрланган сув ҳавзалари ва туз конларидан олинган намуналардан фойдаланилди.

Намуналардан 21 та галофил ва галтолерант бактерия изолятлари ажратиб олинган (1-жадвал). ЭПС ҳосил қилиш потенцилига кўра бактериялар скрининги НМ 20% (Halophilic medium) (Luque R. ва бошқ., 2014) махсус озуқа муҳитда амалга оширилди.

2-жадвал

Галофил бактерияларнинг морфо-физиологик ва биокимёвий тавсифи

Таснифлари	UzAS3	SS01	UzAS102	DSS04	KA1105
Колония: Шакли	Юмалоқ	Юмалоқ	Юмалоқ	Юмалоқ	Юмалоқ
Пигментация	Қизил	Қизил	Қизил	Пушти	Крем
Чети	Бутун	Бутун	Бутун	Бутун	Бутун
Юзаси	Силлиқ	Силлиқ	Силлиқ	Силлиқ	Силлиқ
Кўтарилиши	Қавариқ	Қавариқ	Қавариқ	Қавариқ	Қавариқ
Грамм бўялиши	–	–	–	–	–
Ҳужайра шакли	Эгилган таёқчасимон	Таёқчасимон	Узун таёқчасимон	Юмалоқ	Таёқчасимон спирлла
Ҳаракатчанлик	+	+	+	+	+
Тузлар ^{конц.} диапазони (%)	10-25	5-20	5-20	10-25	5-15
Оптимал тузлар конц. (%)	15	9.3	9.3	10	11.7
pH диапазони	6-9	6-8,5	6-8,5	5,5-8,5	6-8
Оптимал pH	7.5	7.0	7.0	7.0	7.0
Ҳарорат диап. (°C)	15-43	25-40	25-40	15-43	15-40
Оптимал ҳарорат	35	33	33	35	30
Индол х/қилиши	–	–	–	–	–
H ₂ S ҳосил қилиш	–	–	–	–	–
Метил қизил	–	+	–	–	+
Нитрат редукция	–	–	–	–	+
Цитрат утилизац.	–	–	–	–	–
Уреаза	+	+	+	+	+
Каталаза	+	+	+	–	–
Оксидаза	+	+	–	–	–
Гидролиз: Tween 80	+	–	+	–	+
Казеин	–	–	–	–	–
Крахмал	–	–	–	+	+
Желатин	–	–	–	–	–
Кислота х/қ:					
D-глюкоза	+	+	+	+	+
Манноза	+	–	+	+	–
Сахароза	+	–	–	+	+
L-рамноза	–	–	–	+	–
D-ксилоза	+	–	+	–	–
Лактоза	+	–	+	+	–

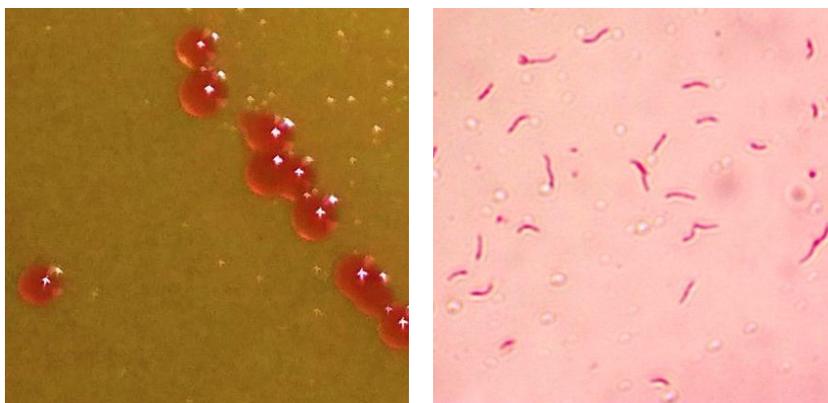
Изох: (+) - ижобий реакция; (–) - салбий реакция.

Кўпчилик изолятларнинг ҳужайралари ҳаракатчан, грам-манфий ва спора ҳосил қилмайди, қисқа ёки узун таёқчасимон (UzAS102, SS01), эгри

таёқчасимон (UzAS3, KAI105) ҳамда кокк (DSS04) бўлиб, уларнинг айримлари плеоморф (UzAS3, KAI105) ҳисобланади. Барча изолятлар аэроб ва мезофил бўлиб, D-глюкоза, сахарозани парчалаб, кислота ҳосил қилади ҳамда уреаза фаоллик кўрсатади. UzAS3, UzAS102 ва DSS04 изолятлар эса манноза ва лактозада кислота ҳосил қилади. Каталаза ва оксидаза фаоллиги UzAS3 ва SS01 изолятларда яққол кузатилган. Бундан ташқари, UzAS3, UzAS102 ва KAI105 изолятлари Tween 80 ни, DSS04 ва KAI105 крахмални гидролизлай олади. Барча изолятлар индол, H₂S ҳосил қилмайди, казеин ва желатинни гидролизламайди, цитрат утилизацияси кузатилмайди (2-жадвал).

***Halovibrio variabilis* UzAS3 штаммининг қисқача тавсифи**

ЭПС ишлаб чиқарувчи UzAS3 штаммининг ҳужайралари ҳаракатчан, грамм-манфий ва эгри таёқчасимон (0,4-0,7x1,0-3,0 мкм) бўлиб, улар эндоспора ҳосил қилмайди, аэроб. *Halovibrio variabilis* UzAS3 штаммининг култураси 1% глюкоза тутган НМ 20% агарли озиқа муҳитида юмалоқ, шилимшиқ, қизил, силлиқ колониялар ҳосил қилади (1-расм). Tween 80 ни гидролиз қилиш қобилиятига эга, лекин казеин ва крахмални гидролизламайди. *Halovibrio variabilis* UzAS3 D-фруктоза, лактоза, малтоза, сахароза ва D-глюкозадан кислота ҳосил қилади. Барча изолят ҳужайралари цитратдан фойдаланмайди ва индол ҳосил қилмайди. UzAS3 изоляти NaCl нинг тор диапазонида 15 дан 20% NaCl гача, лекин оптимал равишда 15,6% NaCl да ўсиши мумкин. Бундан ташқари, улар қаттиқ НМ муҳитида 15-43° С ва рН 6-8,5 диапазолида ўсиши кузатилади.

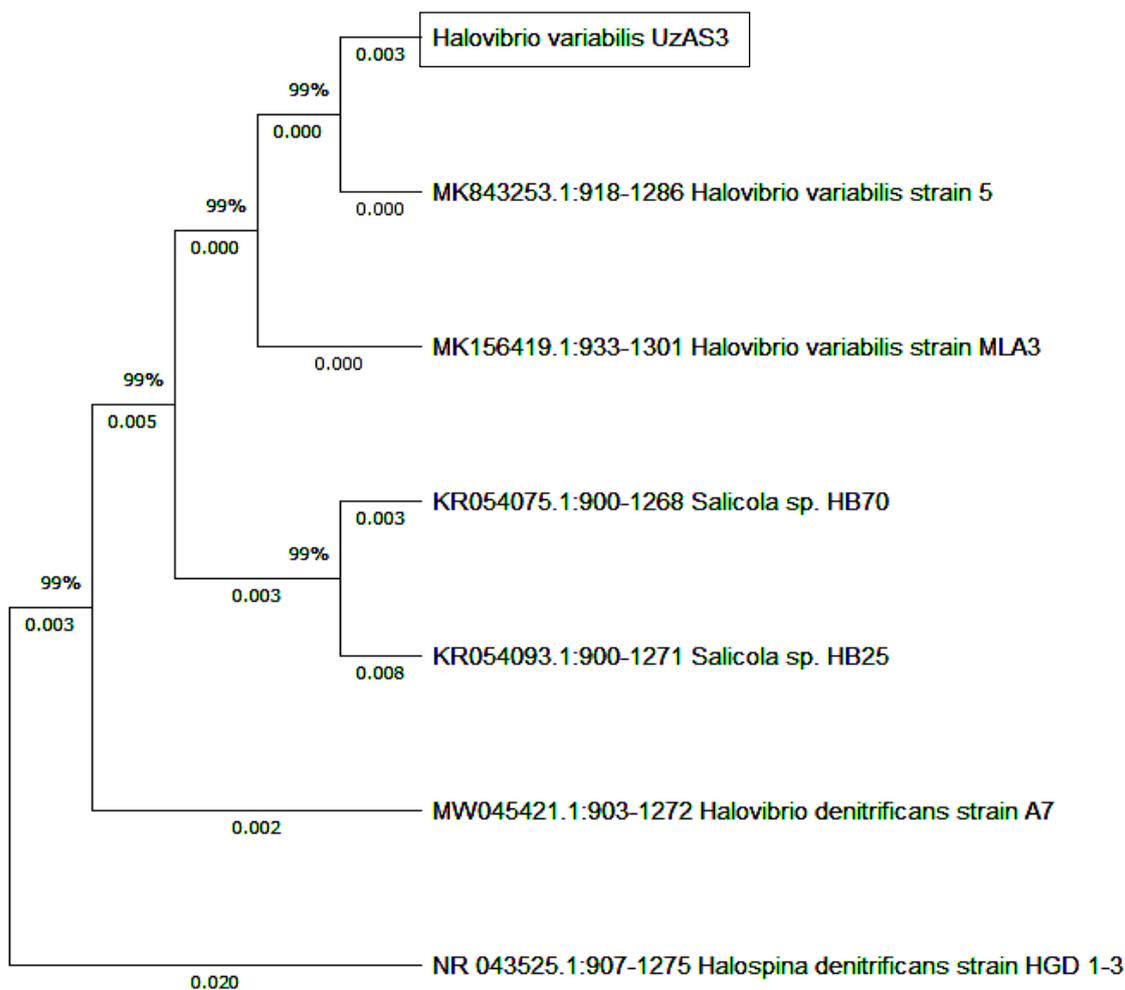


А

Б

1-расм. А – *Halovibrio variabilis* UzAS3 штаммининг колониялари ва Б – грам-манфий бўялган ҳужайралари микроскопияси (1000x).

UzAS3 изолятининг 16S рРНК гени нуклеотидлари кетма-кетлиги секвенирлаш усулида аниқланди ва олинган маълумотлар NCBI халқаро маълумотлар базасида BLAST дастурида таҳлил қилиниб, *Halovibrio* авлодига мансуб *Halovibrio variabilis* турига 99% ўхшаш эканлиги маълум бўлди. Олинган натижалар NCBI халқаро маълумотлар базасида *Halovibrio variabilis* UzAS3 сифатида MW722894.1 рақам билан рўйхатдан ўтказилди (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW722894.1/>) ва шу асосида штаммининг филогенетик дараҳти тузилди (2-расм).

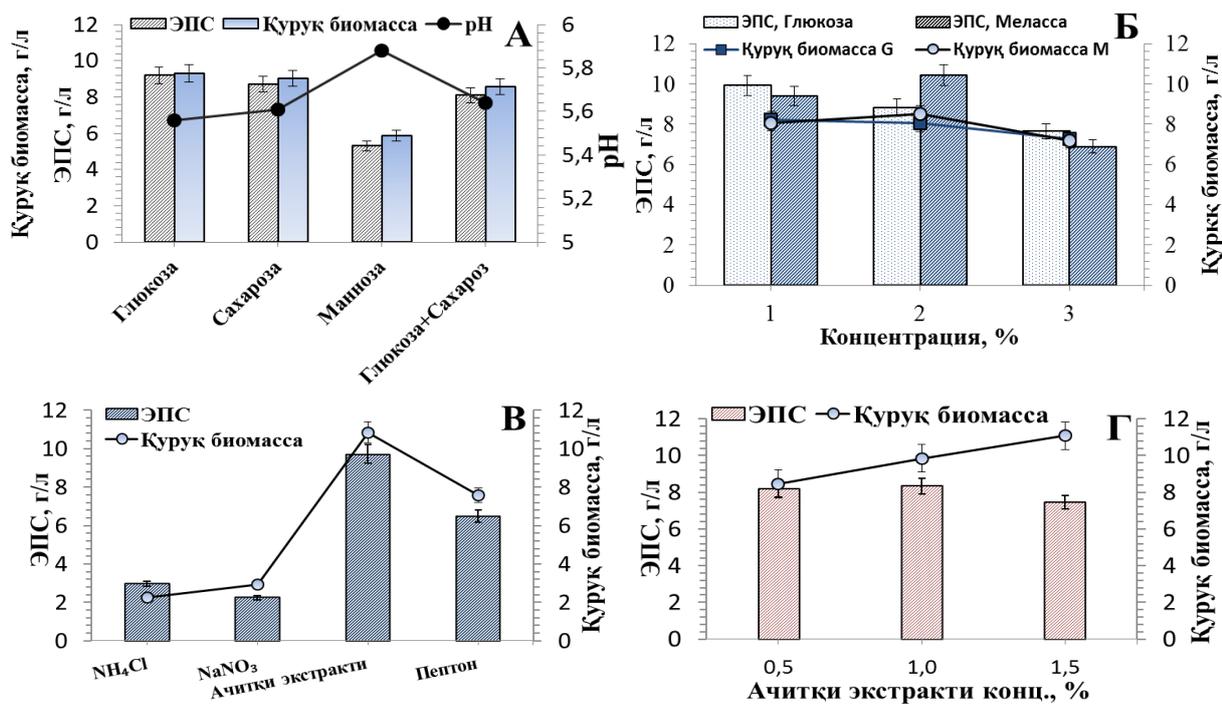


2-расм. Галофил бактерия штаммининг филогенетик шажараси.

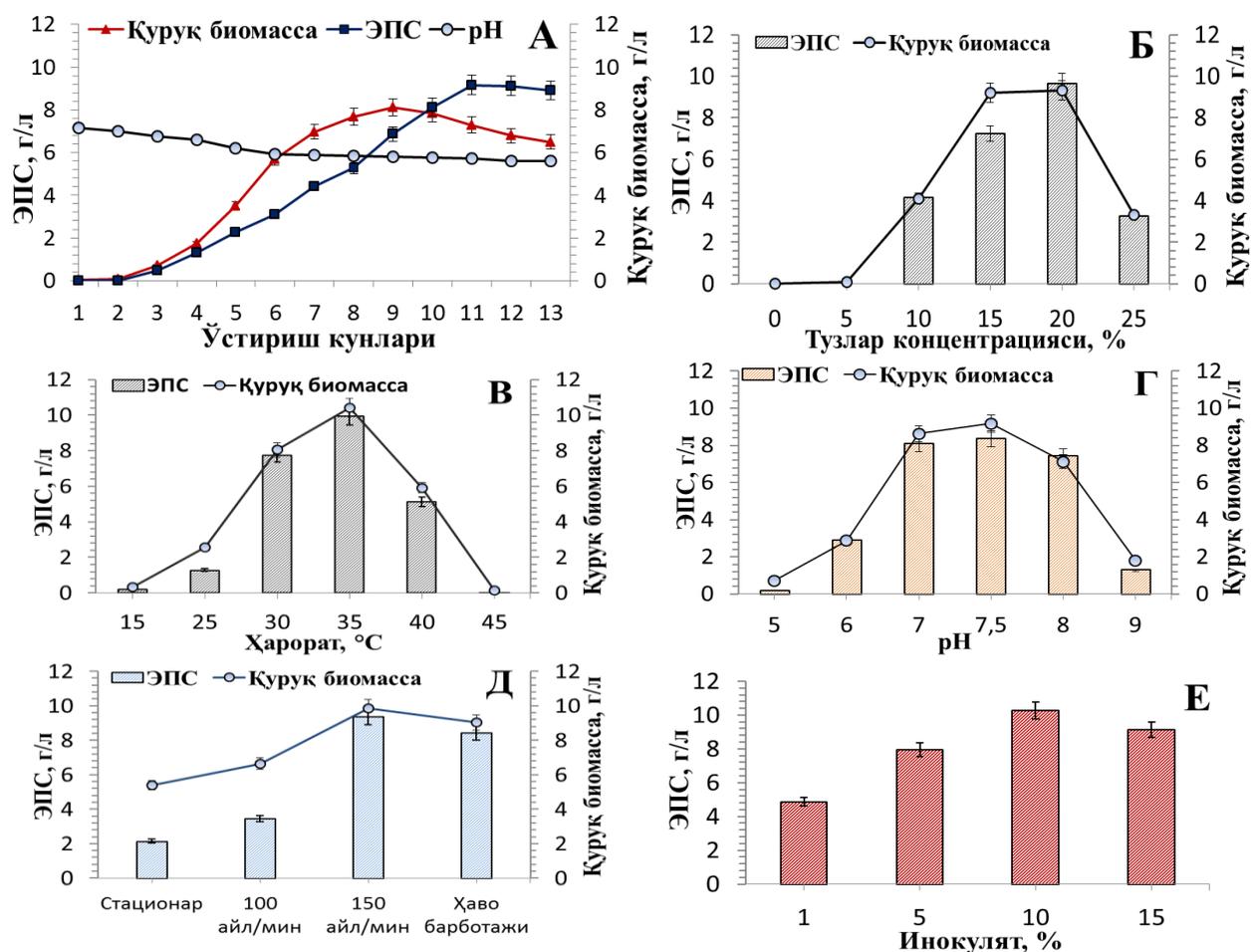
Шундай қилиб олиб борилган тадқиқотлар натижасида *Halovibrio variabilis* UzAS3 штамми ЭПС ҳосил қилувчи энг фаол продуцент сифатида кейинги тадқиқотлар учун танлаб олинди.

Диссертациянинг «Галофил бактерияни ўстириш ва ЭПС ҳосил қилиш шароитларини оптималлаштириш» деб номланган 3.3-бандида углерод манбалари, азот манбалари ва уларнинг концентрацияси ҳамда ўстириш шароитларининг (инкубация вақти, ҳарорати, муҳитнинг бошланғич рН кўрсаткичи, тузлар концентрацияси, аэрация даражаси, инокулят миқдори) таъсирини ўрганиш бўйича олинган натижалари келтирилган.

Оптималлаштириш тажрибаларни амалга оширишда сунъий денгиз тузлари асосида тайёрланган НМ озуқа муҳитидан (г/л: NaCl - 156,0; MgCl₂·6H₂O - 13,0; MgSO₄·7H₂O - 20,0; CaCl₂·6H₂O - 1,0; KCl - 4,0; NaHCO₃ - 0,2; NaBr - 0,5; глюкоза - 10,0; ачитки экстракти - 5,0) фойдаланилди. Бунда глюкоза ва меласса (1, 2, 3%), сахароза, манноза ҳамда глюкоза+сахарозадан углерод манбаи сифатида ҳамда аммоний хлорид, натрий нитрат, пептон ва ачитки экстракти (0,5, 1,0, 1,5%) дан азот манбаи сифатида олинган. Оптимал ўстириш шароитларини аниқлаш 13 кун давомида, муҳитдаги тузлар миқдори 5, 10, 15, 20 ва 25%; ҳарорат 25 °С, 30 °С, 35 °С, 40 °С ва 45 °С; муҳитнинг дастлабки рН қиймати 5,0, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0 ва 9,0 да олиб борилди.



3-расм. *Halovibrio variabilis* UzAS3 ЭПС синтези учун озуқа муҳити таркиби.
 А) Углерод манбалари, Б) углерод манбаи концентрацияси, В) азот манбалари ва Г) ачитки экстракти концентрациясининг биомасса ва ЭПС ҳосил бўлишига таъсири.



4-расм. *Halovibrio variabilis* UzAS3 ЭПС синтези учун ўстириш шароитлари.
 А) Ўстириш давомийлиги, Б) тузлар концентрацияси, В) ҳарорат, Г) бошланғич рН, Д) аэрация ва Е) инокулят ҳажмининг биомасса ва ЭПС ҳосил бўлишига таъсири.

Тадқиқот натижалари шуни кўрсатдики, *Halovibrio variabilis* UzAS3 культурасининг энг юқори ЭПС биосинтез фаоллиги глюкоза ва ачитқи экстрактида кузатилди. Углерод манбаи сифатида сахарозадан фойдаланилган тажриба натижаси глюкозага яқин бўлганлиги учун ва сахароза максимал рентабелликга эга эканлигини ҳисобга олиб ЭПС олишда сахарозадан фойдаланилган (3-расм). Олинган натижаларга кўра, оптимал ўстириш шароитлари сифатида муҳитдаги тузлар миқдори 20%, ҳарорат 35 °С, ўстириш давомийлиги 11 кун, озуқа муҳити рН 7,5, инокулят ҳажми 10% ва доимий чайқатиш (150 айл/мин) шароити танланди (4-расм). Культурани муҳитда ҳаво барботажини усулида ўстирилганда, 1% миқдорда ЭПС олиш мумкинлигини кўрсатди (4-расм, Д). Озуқа муҳити таркиби ва ўстириш шароитларини оптималлаштириш натижасида *Halovibrio variabilis* UzAS3 культурасининг ЭПС ҳосил қилиши бошланғич 3,876±0,31 г/л дан 3 марта юқори бўлди ва маҳсулот унуми 9,758±0,31 г/л ни ташкил қилди.

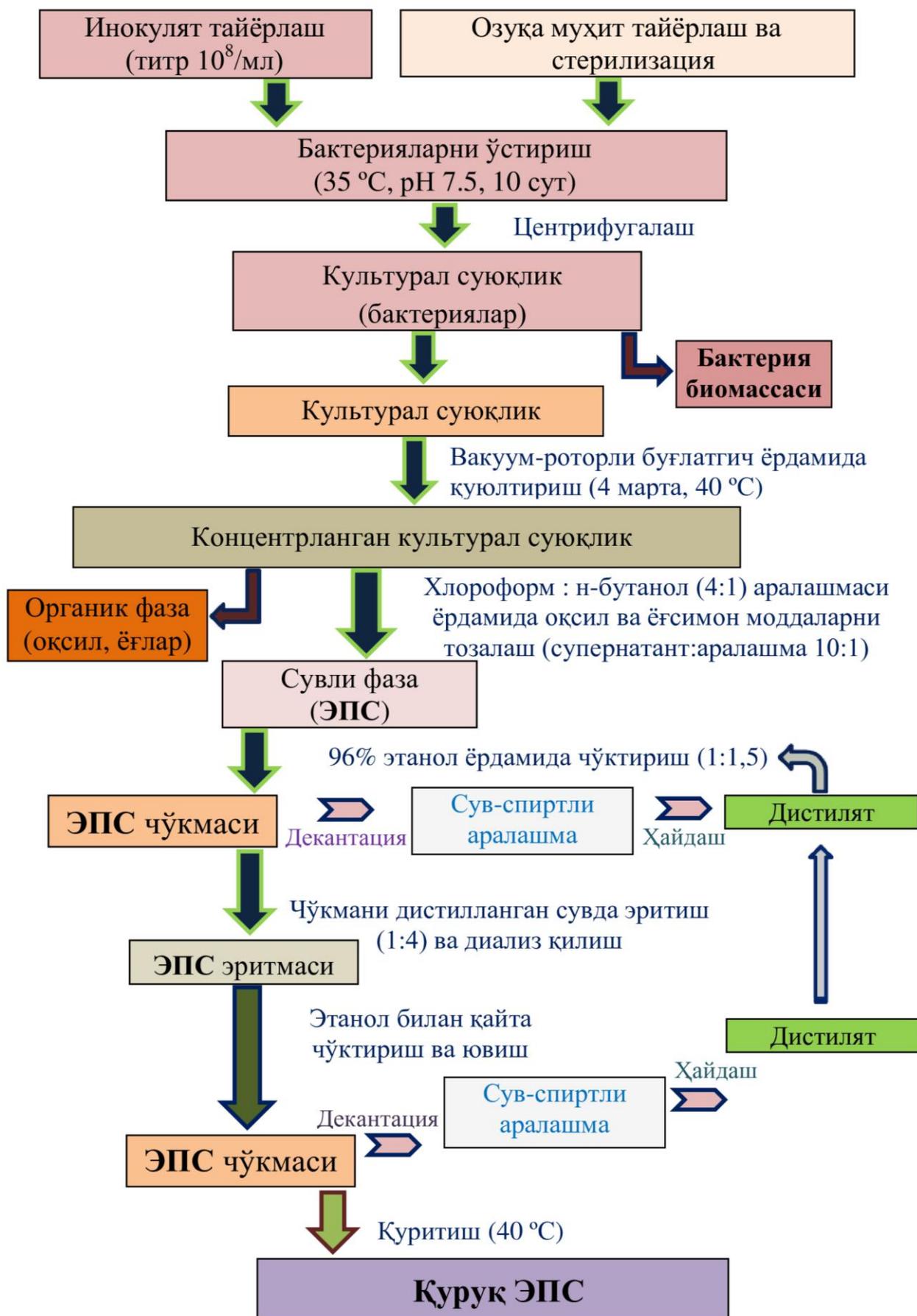
Диссертациянинг «Галофил бактериядан ЭПС ажратиб олиш» деб номланган 3.4-бандида маҳаллий галофил бактериянинг культурал суюқлигидан ЭПС ажратиш ва қисман тозалаш бўйича тадқиқот натижалари баён этилган.

Halovibrio variabilis UzAS3 культурасидан ЭПС олиш учун жами 10 л ҳажмдаги НМ 20% суюқ озуқа муҳитида рН 7.5, 35 °С ҳароратда 11 кун давомида качалкада (150 айл/мин) ўстирилди. Дастлаб культурал суюқликдаги биомасса ажратиб олинди (76,3 г куруқ биомасса). Олинган супернатантни муҳитдаги оксил ва ёғсимон табиатли бирикмалардан тозалаш учун Sevage реагенти (хлороформ ва н-бутанол 4:1) ёрдамида ишлов берилди. Аралашмада ҳосил бўлган ёғсимон қатлам центрифуга ёрдамида ажратилди. Олинган супернатант (9,913 л) таркибидаги ЭПСларни чўктириш учун 96% этил спирти билан 1:1,5 нисбатда (4,745 л супернатант:7,1 л этанол) яхшилаб аралаштирилди ва бир кечага 4 °С ҳароратда қолдирилди.

ЭПС олиш жараёнида этил спирти сарфини камайтириш учун супернатант вакуум-роторли буғлатгич ёрдамида бир неча марта (2,09 марта) концентрланди. Олинган чўкма тузлардан тўлиқ тозалаш учун минимал миқдорда дистилланган сувда (300 мл) эритилиб, диализ қилинди ва қайта этанол билан чўктириб олинди (168,9 г). Олинган чўкма қуриштириш шкафида 40 °С ҳароратда қуриштирилди ва кукун (93,35 г) ҳолига келтирилди (5-расм).

ЭПС олиш жараёнида чўкма ажратиб олингандан кейин қолган суюқ қисм қайта ҳайдалиб тозаланади ва олинган этил спирти яна ЭПС олиш жараёнида фойдаланиш мумкин бўлади.

Диссертациянинг «*Halovibrio variabilis* UzAS3 штаммидан олинган ЭПС таркиби ва физик-кимёвий хусусиятлари» деб номланган 3.5-бандида ажратиб олинган ЭПСнинг физик ва кимёвий хусусиятлари ёритилган. Қуйида, 5-расмда лаборатория шароитида ЭПСни культурал суюқликдан ажратиб олиш ва тозалаш схемаси кўрсатилган.



5-расм. Лаборатория шароитида ЭПСни культурал суюқликдан ажратиб олиш ва тозалаш схемаси.

Halovibrio variabilis UzAS3 нинг ЭПС ҳосил қилиши ($9,75 \pm 0,31$ г/л) ва унинг таркиби 3-жадвалда келтирилган.

3-жадвал

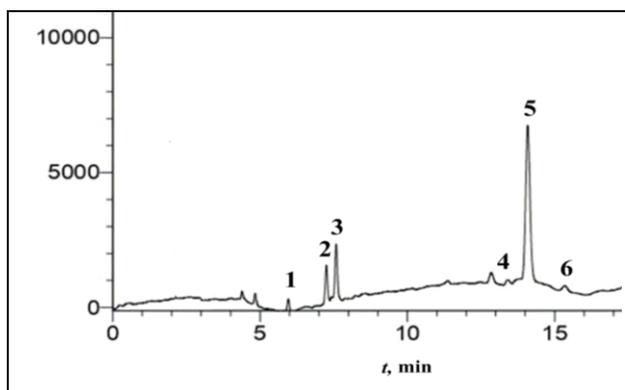
ЭПСнинг кимёвий таркиби ва оптимал шароитларда ҳосил бўлиш унуми

№	Культуралар	Курук биомасса, г/л	ЭПС, г/л	Умумий углевод миқдори, %	Умумий оқсил миқдори, %
1.	<i>Halomonas</i> sp. SS01	$7,22 \pm 0,16$	$2,83 \pm 0,34$	$88,5 \pm 0,41$	$4,9 \pm 0,04$
2.	<i>Halomonas</i> sp. UzAS102	$5,67 \pm 0,29$	$1,85 \pm 0,25$	$75,1 \pm 0,22$	$9,8 \pm 0,06$
3.	<i>Halovibrio variabilis</i> UzAS3	$7,29 \pm 0,17$	$9,75 \pm 0,31$	$78,2 \pm 0,19$	$8,6 \pm 0,08$
4.	<i>Salinicola</i> sp. DSS04	$5,89 \pm 0,18$	$1,44 \pm 0,33$	$72,1 \pm 0,23$	$8,8 \pm 0,21$
5.	<i>Halovibrio</i> sp. KAI105	$6,76 \pm 0,18$	$1,67 \pm 0,25$	-	-
6.	<i>Halomonas xianhensis</i> SUR308*		7,87	-	-
7.	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 36**		5,6	94,5	3,05

* J. Biswas et al. 2017; ** Расулов Б., 2019.

Шуни таъкидлаш керакки, ўрганилган ЭПСнинг 78,2% углеводлардан иборат ва оқсил аралашмалари миқдори 8,6% ни ташкил қилади.

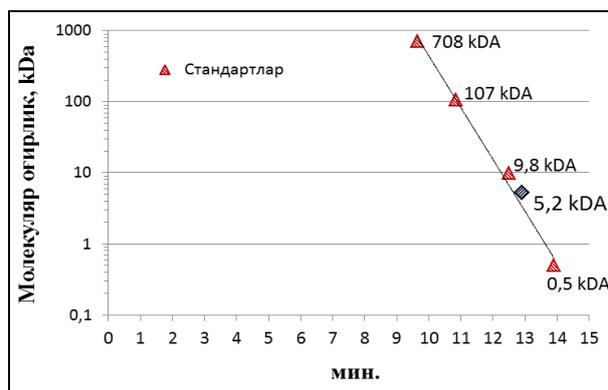
ЭПС нинг моносахарид таркиби ва молекуляр оғирлиги. ЭПС моносахарид таркибининг ГХ-таҳлили шуни кўрсатдики, *Halovibrio variabilis* UzAS3 штамми ҳосил қилган ЭПС намунасининг моносахаридлар таркиби бўйича глюкоза устунлик қилиб, 69% ни ташкил этган. Шунингдек, ЭПС намунасининг моносахаридлар таркибий таҳлили Glc:Xyl:Ara:Man:Rha:Gal = 30,0: 6,34:4,17:1,74:1,04:1,0 моляр нисбатдаги углеводлардан иборат гетерополисахарид эканлигини кўрсатди (6-расм).



6-расм. *Halovibrio variabilis* UzAS3

ЭПС нинг моносахарид таркиби:

- (1) L-рамноза, (2) L-арабиноза,
 (3) D-ксилоза, (4) D-манноза,
 (5) D-глюкоза, (6) D-галактоза.

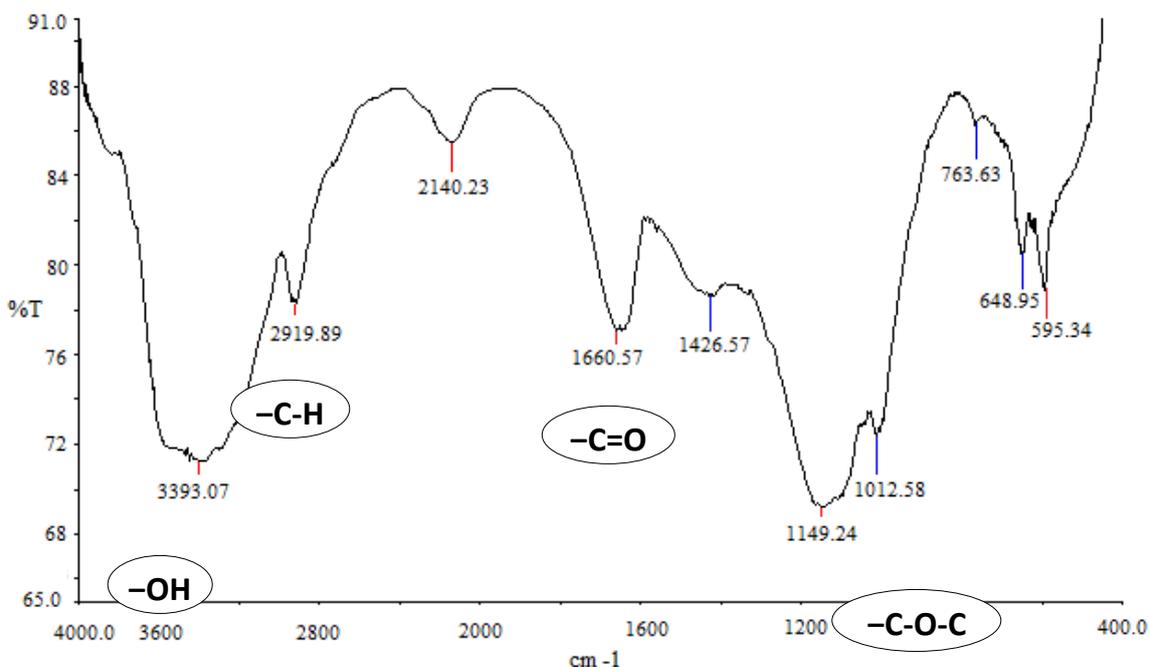


7-расм. ЭПС молекуляр оғирлиги.

Пуллулан стандартларининг молекуляр оғирлик қийматлари:
 1 – 708 кДа; 2 – 107 кДа; 3 – 9,8 кДа;
 4 – 0,5 кДа.

Тозаланаган ЭПСнинг молекуляр массаси тахминан 5,200 kDa ни ташкил этди (7-расм). Ўрганилган илмий адабиётларга кўра, *Halorubrum* sp. TBZ112 штаммининг ЭПС молекуляр оғирлиги 5,052 kDa бўлган (Hamidi M. ва бошқ., 2019).

Halovibrio variabilis UzAS3 штамми ҳосил қилган ЭПС намунасининг ИҚ-спектри олинди (8-расм). ЭПС намунасининг ИҚ-спектри унинг таркибида полисахаридларга хос бўлган кимёвий боғлар ва функционал гуруҳлар мавжуд эканлигини кўрсатади. Шунини кўриш мумкинки, 3393,07 см⁻¹ да гидроксил гуруҳи (-OH) тебранишларига хос бўлган кенг ва кучли ютилиш соҳаси кузатилди. 2919,889 см⁻¹ да типик углеводлардаги C-H ассиметрик боғи тебранишга хос ютилиш соҳаси қайд этилди. 1660,57 см⁻¹ даги ютилиш соҳаси карбонил гуруҳ (C=O) га хос. 1149,24 ва 1012,58 см⁻¹ даги кенг ютилиш соҳаси эса полисахаридларга хос бўлган гликозид боғлар тебранишларига мувофиқ келади. Барча ИҚ-спектрлари гликозид кўпригининг (C-O-C) тебранишларини ифодаловчи 1035 см⁻¹ интенсив чўкки (пик) асосий полисахарид занжирини аниқлайди.



8-расм. *Halovibrio variabilis* UzAS3 ҳосил қилган ЭПСнинг ИҚ-спектри.

Шунингдек, олинган ЭПС ҳидсиз, қаймоқрангда. 1% эритмасининг ковушқоқлиги - 2,03 Па·с ва 1% эритмасининг рН - 6,4-6,8 ни ташкил қилади.

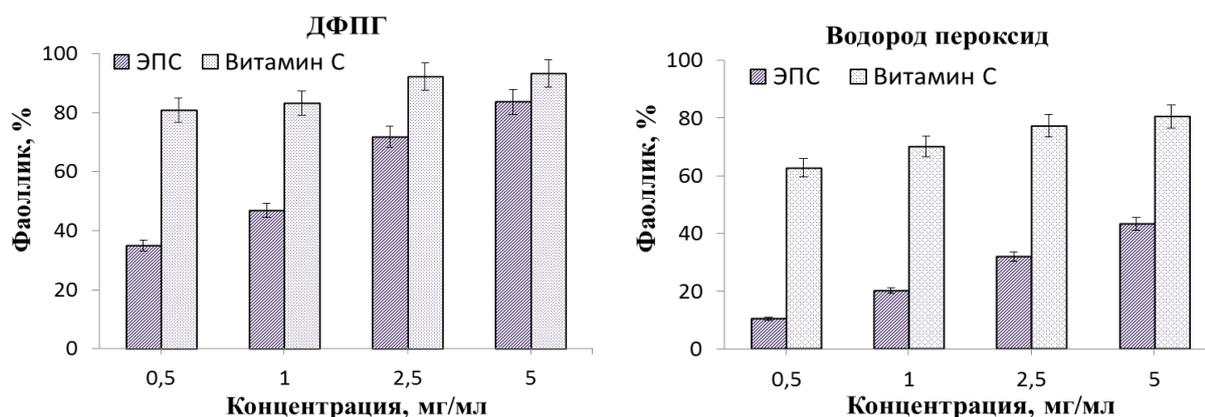
Олинган натижаларга кўра, *Halovibrio variabilis* UzAS3 штамми ўзига хос таркибли ЭПС ҳосил қилади. Уларнинг кимёвий таркиби штаммининг ўзига хос хусусиятига ва ўстириш шароитларига боғлиқ бўлади. Ўстириш шароитлари ва физиологик омиллар ЭПСнинг молекуляр оғирлигига ҳамда моносахаридлар таркибига таъсир қилиши мумкинлиги ҳақида адабиётларда таъкидлаб ўтилган (Finore I. ва бошқ., 2014).

Диссертациянинг «*Halovibrio variabilis* UzAS3 штамми ҳосил қилган

ЭПС намунасининг биологик хусусиятлари» деб номланган 3.6-бандида ЭПС намунасининг антибактериал, антиоксидантлик ва цитотоксиклик каби биологик хусусиятлари бўйича олинган натижалар келтирилган.

ЭПСнинг антибактериал хусусиятлари ўрганилганда, *Halovibrio variabilis* UzAS3 штамми ҳосил қилган ЭПС намунаси шартли патоген микроорганизмларга (*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*) қарши фаоллик кузатилмади.

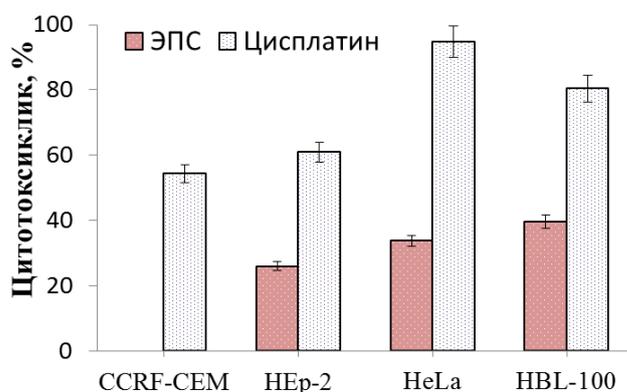
Галофил бактерия ҳосил қилган ЭПСнинг антиоксидант фаоллиги ЭПС концентрацияси 0,5 дан 5,0 мг/мл гача бўлган диапазонда ўрганилди. Назорат сифатида аскорбин кислота эритмасидан фойдаланилди.



9-расм. *Halovibrio variabilis* UzAS3 ЭПС нинг антиоксидант фаоллиги.

Halovibrio variabilis UzAS3 штамми ҳосил қилган ЭПС (5,0 мг/мл) 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) (83,63%) ва водород пероксид (43,37%) эркин радикаларини тозалаш бўйича антиоксидант фаолликка эга эканлиги аниқланди (9-расм).

Шу билан бирга, ЭПСнинг цитотоксик фаоллиги бўйича олинган натижаларга кўра, бачадон бўйни карциномаси HeLa ва кўкрак беши аденокарциномаси HBL-100 га қарши фаоллик кўрсатган (10-расм).

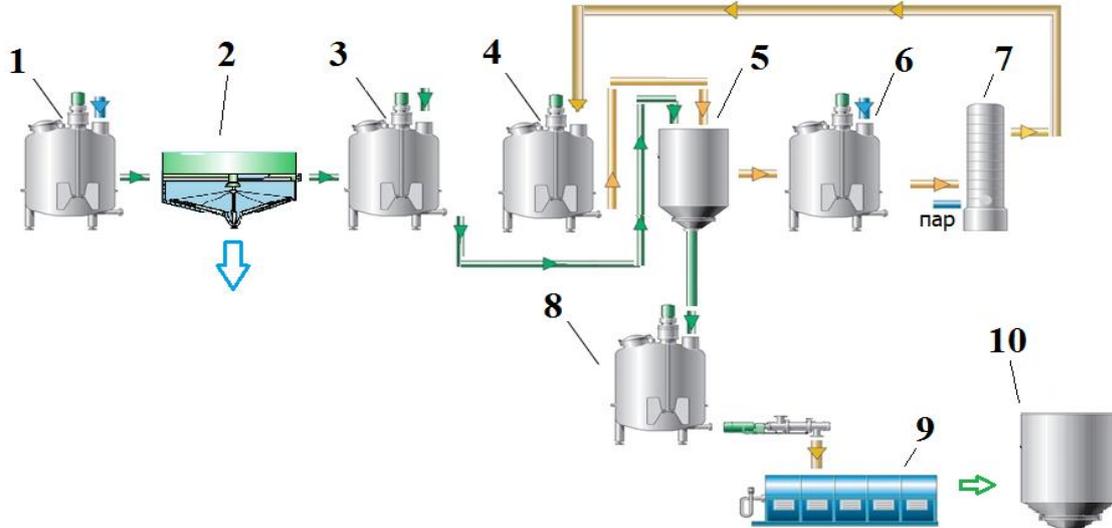


10-расм. *Halovibrio variabilis* UzAS3 ЭПС нинг цитотоксик фаоллиги. CCRF-CEM – Т-лимфобласт лейкомия; Hep-2 – ҳалқум аденокарциномаси; HeLa – бачадон бўйни эпителиал карциномаси; HBL-100 – кўкрак беши аденокарциномаси.

Бу тажрибада назорат сифатида Цисплатин препаратидан (100 мкг/мл)

фойдаланилди. Натижада ЭПС саратон хужайралари ўсишини мос равишда 33,8 дан 39,7% гача тўхтатди.

Бактериал ЭПС олиш технологияси. Олинган натижалар асосида бактерия полисахаридларини олиш технологик схемаси (10-расм) таклиф қилинди, у қуйидагиларни ўз ичига олади:



11-расм. Бактерия полисахаридларини олиш технологик схемаси.

1 - бактерияларни ўстириш учун ферментер; 2 - сепаратор; 3 – культурал суюқликни йиғиш учун реактор; 4 - этанол учун резервуар; 5 - ЭПС чўктириш учун реактор; 6 – сув-спирт аралашмасини йиғиш учун реактор; 7 - вакуумли ҳайдаш қурилмаси; 8 - ЭПС тозалаш учун реактор; 9 - қуритиш учун ускуна; 10 – тайёр маҳсулотни йиғиш учун резервуар.

100 л ҳажмдаги тайёр озуқа муҳити ферментерга (1) ўтказилади, ферментернинг ўзида стерилланади ва 37 °C гача совутилади. Кейин ферментерга 10 л ҳажмдаги бактерия инокуляти солинади. Муҳитда бактериялар титри 10^9 хужайра/мл ва ЭПС миқдори 1% ни ташкил қилганда, культурал суюқлик насос ёрдамида биомассани ажратиш учун сепараторга (2) юборилади. Шундан сўнг муҳитдаги ЭПС чўктириш учун биореакторга (5) ўтказилади ва резервуардан (4) 150 л ҳажмдаги этанол солиб аралаштирилади ва ЭПС чўкмаси тўлиқ чўкиши учун 4 соат давомида тиндирилади. Супернатант сув-спирт аралашмаси декантация йўли билан ажратилади, чўкма икки марта этанол билан ювилади (5 л), реакторда (8) тозалаш учун стандартлаштирилади ва қуритиш (9) учун юборилади. Кейин қолган суюқ қисм қайта ҳайдалиб тозаланади (7) ва олинган этил спирти яна резервуарга қайтарилади. Полисахаридларнинг қуруқ массаси ишлов берилиб, тайёр маҳсулот (10) сифатида йиғилади.

Олинган ЭПС амалиётга жорий қилиниши. Соя етиштиришда *Bradyrhizobium japonicum* ва 1% ЭПС асосида тайёрланган биопрепарати соя уруғларига ишлов берилиб, унинг биоэкологик хусусиятлари ва соя етиштиришда қўллаш миқдори ҳамда муддатлари ўрганилди. Биопрепарат соянинг Селекта-302 навида ўсимликнинг илдизида азот тўпловчи туганаклар ҳосил бўлишига эришиш ҳамда ўсимликнинг ўсиб ривожланиши

натijasида ҳосилдорликни ошириш ва ерни азот билан бойитиш мақсадида синов тажрибаси ўтказилди.

Тажрибада соя уруғларини экишдан аввал биопрепарат билан пуркагич ёрдамида ишлов берилган (1,5-2,0 л/га). Назорат варианты сифатида биопрепарат қўлланилмай, уруғларга тоза сув пуркаб экилди. Соя уруғларининг бир хил униб чиқиши ва тўлиқ ривожланиш фазасида биопрепарат ёрдамида амалга оширилган тажрибаларда назоратга нисбатан тўлиқ фотосинтетик ривожланиши, соя илдизларида туганаклар (пушти) кузатилган. Ҳосилдорлик назорат майдончасида етиштирилган соянинг Селекта навидан гектарига 20,5 центнерни ташкил қилган бўлса, тажриба майдончасида 23,5 центнерга ошиши аниқланган. Олинган ҳосилдорлик кўрсаткичларига кўра, биопрепарат қўлланилганда соя ҳосилдорлиги 3,0 (уч) центнерга (гектарига 2,0515 млн сўм қўшимча даромад) ошириш имконини берган. Шунингдек, олиб борилган дала тажрибаларининг рентабеллиги 50,4% ни ташкил қилган.

ХУЛОСАЛАР

1. Республикамининг юқори шўрланган ҳудудларидаги турли манбалардан (шўрсув, тузтош) ажратиб олинган *Halomonadaceae* оиласига мансуб 21 та галофил ва галотолерант бактерия изолятлари орасида ЭПС синтез қилиш потенциалига кўра ўтказилган скрининг натижасида 5 та штамм танлаб олинди. Айниқса, истиқболли *Halovibrio variabilis* UzAS3 штамми энг юқори ЭПС ҳосил қилиши (387,6 мг/100 мл) қайд этилди.
2. ЭПС ҳосил қилувчи маҳаллий галофил бактерияларнинг морфологик-културал ва биокимёвий хусусиятлари ўрганилди ҳамда генетик идентификация қилинди: 2 та штамм *Halovibrio*, 1 та штамм *Salinicola* ва 2 та штамм *Halomonas* авлодига мансуб эканлиги аниқланди.
3. *Halovibrio variabilis* UzAS3 штаммидан ажратиб олинган ЭПС гетерополисахарид бўлиб, молекуляр массаси 5200 Да эканлиги ва таркибида куйидаги: Glc:Xyl:Ara:Man:Rha:Gal = 30,0: 6,34:4,17:1,74:1,04:1,0 моляр нисбатдаги углеводлардан иборат эканлиги маълум бўлди. ЭПС антиоксидант (83,63%) ҳамда бачадон бўйни карциномаси HeLa ва кўкрак беzi аденокарциномаси HBL-100 ҳужайраларига қарши цитотоксик фаолликка (33,8% дан 39,7% гача) эга эканлиги аниқланди.
4. *Halovibrio variabilis* UzAS3 културасининг ЭПС ҳосил қилишини ошириш мақсадида оптимал озуқа муҳити, сахароза (10 г/л) ва ачитқи экстракти (5 г/л) ҳамда ўстириш шароитлари (ҳарорат - 35 °С; ўстириш давомийлиги 11 кун, рН - 7,5) танланди. Натижада културанинг ЭПС ҳосил қилиши дастлабки скрининг натижаларига нисбатан 3 мартагача (3,87 дан 9,75 г/л гача) ошиши аниқланди.
5. Галофил бактерияни 100 л озуқа муҳитда даврий равишда ўстириб, 10 кг бактериал ЭПС олиш технологик схемаси таклиф қилинди.

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

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

КУЛОНОВ АБДУЛАЗИЗ ИБРАГИМОВИЧ

**МЕСТНЫЕ ГАЛОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ – КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ
ПРОДУЦЕНТЫ ПОЛИСАХАРИДОВ**

03.00.12 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации доктора философии (PhD) по биологическим наукам

Ташкент – 2022

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером В2019.4.PhD/В415
Диссертация выполнена в Институте микробиологии.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском, английском (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (info-microbio@academy.uz) и Информационно-образовательном портале «Ziyouet» (www.ziyouet.uz).

Научный руководитель: **Мирзарахметова Дилбар Тохтамуратовна**
доктор технических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Ташмухамедова Шахиста Сабировна**
доктор биологических наук, профессор

Насметова Саодат Мамажановна
доктор биологических наук

Ведущая организация: **Институт биоорганической химии**

Защита диссертации состоится **«06» декабря 2022** года в **10⁰⁰** часов на заседании Научного Совета DSc. 02/30.12.2019. В.38.01 при Институте микробиологии Адрес: 100128, г.Ташкент, Шайхантахурский район, ул. А.Кадырий 76, конференц-зал Института микробиологии. Тел.:(+99871)-241-92-28, Тел.:(+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 (зарегистрирована под № __). Адрес: 100128, г.Ташкент, Шайхантахурский район, ул. А.Кадырий 76, Административное здание Института микробиологии, __-й этаж, Института микробиологии. Тел.:(+99871) 241-92-28.

Автореферат диссертации разослан **«22» ноября 2022** года.

(реестр протокола рассылки № 9 от **«22» ноября 2022** года)



Арипов 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.

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

ВВЕДЕНИЕ (аннотация к диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. С повышением потребности промышленности в полисахаридах, уделяется большое внимание поиску и изучению микроорганизмов-продуцентов экзополисахаридов (ЭПС), а также их использованию. Роль микробных ЭПС возрастает в различных сферах деятельности человека: медицине, косметике, пищевой, нефтяной промышленности, сельском хозяйстве и других областях. Процесс получения ЭПС микроорганизмов не зависит от климата и времени года, экономически удобен и перспективен с точки зрения биотехнологии по сравнению с растительными и животными полисахаридами. В зависимости от условий культивирования галофильных бактерий есть возможность управлять свойствами получаемых ЭПС и культивировать их на питательных средах на основе недорогих субстратов, таких как промышленных отходов. Также большой интерес вызывают ЭПС галофильных бактерий в связи с их структурным и функциональным разнообразием. Поэтому важно получать и внедрять ЭПС из галофильных бактерий с высоким потенциалом.

Во всем мире ведутся научные исследования по выявлению новых полисахаридов и их продуцентов, постоянному расширению областей применения полисахаридов микроорганизмов. В частности, благодаря различным функциональным (водорастворимость, высокая вязкость растворов, способность гелеобразования) и биологическим (антиоксидантным, иммуномодулирующим, противовоспалительным, бактерицидным, радиопротекторным, ранозаживляющим, противоопухолевым, антиканцерогенным) свойствам ЭПС галофильных бактерий, уделяется особое внимание использованию полисахаридов со специфическими свойствами в различных областях, таких как пищевая промышленность, фармацевтика, медицина, косметика, биоремедиация в качестве гелеобразующих, стабилизирующих, эмульгирующих и загущающих агентов, а также в связи с тем, что они обладают полезными для здоровья действиями, такими как антиоксидантное, противораковое и цитотоксичность. В связи с этими, выделение ЭПС-продуцирующих галофильных бактерий и разработка биотехнологии получения различных форм ЭПС имеет большое научное и практическое значение.

В нашей республике уделяется особое внимание получению качественных, экологически чистых, импортозамещающих и отечественных биополимерных продуктов и их производству в промышленных масштабах. В связи с этим достигаются определенные результаты по оценке целесообразности использования отобранных штаммов-продуцентов и обоснованию их практически и экономических результатов. В четвёртом перспективном направлении Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан¹ определены задачи «производства готовой продукции с высокой добавленной стоимостью на основе глубокой

¹ Указ Президента Республики Узбекистан № УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии дальнейших действий по развитию Республики Узбекистан»

переработки местного сырья». При выполнении этих задач важно получение и применение новых микробных безвредных биопрепаратов на основе синтеза качественных, экологически чистых, высокомолекулярных экзополисахаридов, в том числе импортозамещающих, на основе местных галофильных штаммов бактерий и сырья.

Также данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Указы Президента Республики Узбекистан №УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан в 2017-2021 гг.» от 7 февраля 2017 года и №УП-60 «О стратегии развития нового Узбекистана на 2022-2026 гг.» от 28 января 2022 года, Постановлением Президента Республики Узбекистан №ПП-4899 «О комплексных мерах по развитию биотехнологий и совершенствованию системы биологической безопасности страны» от 25 ноября 2020 года, а также другими нормативно-правовыми документами, принятыми в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологий республики V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология и охрана окружающей среды».

Степень изученности проблемы. По имеющейся информации в мировой научной литературе широко освещены сведения о выделении галофильных штаммов бактерий, обладающих высокой биологической и функциональной активностью, скрининг по способности продуцировать экзополисахариды и использовании их в различных отраслях народного хозяйства (Casillo A. и др., 2018; Husseiny S.M. и др., 2015), выделены экзополисахарид-синтезирующие штаммы галофильных бактерий и определены их морфологические, физиологические и биохимические характеристики (Llamas I. и др., 2012, Finore I. и др., 2014; Pal A. и др., 2015). Экзополисахариды также применены в промышленности в качестве гелеобразователей, биосурфактантов, эмульгаторов и биосорбентов (Segretin A.B. и др., 2018), определены их антиоксидантные свойства, иммуномодулирующие и противоопухолевые активности (Dave Sh.R. и др., 2020; Boujida N. и др., 2018).

Учеными нашей республики выделены местные экстремофильные и галофильные штаммы микроорганизмов (Кондрашева К.В., 2010; Джураева Р.Н., 201; Зайнитдинова Л.И., Куканова С.И., 2017), отобраны местные штаммы ЭПС-продуцирующих лактобацилл (Елова Н.А., 2019) и изучены их биологически активные вещества, рекомендованы для применения во многие области народного хозяйства, а также исследованы экзополисахариды diaзотрофных ризобактерий, на предмет получения наночастиц серебра (Расулов Б.А., 2019).

Проведение исследований по технологии получения бактериальных полисахаридов, контролю образования полисахаридов в процессе управляемого культивирования бактерий, определение технологической

значимости полисахаридов с технологической и биохимической позиций, направленное изменение структуры полисахаридов, а именно увеличение вязкости, улучшение реологических свойств, а также получение новых производных с биологической активностью очень актуально и имеет научно-практическую значимость.

Связь темы диссертационного исследования с планами научно-исследовательских работ научно-исследовательского учреждения, где выполнена работа. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ Института микробиологии рамках фундаментального и прикладного проектов ПЗ-20170928599 «Создание технологий выращивания водорослей в условиях Узбекистана и получения на их основе биологически активных веществ» (2018-2020 гг.), А-ФА-2021-428 «Микробные сообщества современного Арала и зон Приаралья: разнообразие, свойства и биотехнологический потенциал» (2021-2023 гг.).

Целью исследования является выделение галофильных бактерий и оценка их ЭПС-синтезирующего потенциала.

Задачи исследования:

выделение галофильных бактерий из проб воды и почвы с высокой степенью засоления и определение их потенциала по продукции ЭПС;

определение видовой принадлежности наиболее активной ЭПС-синтезирующей галофильной бактерии;

выделение и характеристика ЭПС, продуцируемого наиболее активным штаммом бактерий;

оптимизация условий культивирования для повышения выхода ЭПС;

предложение технологической схемы получения ЭПС и расчёт технико-экономической эффективности.

Объектом исследования служили местные галофильные штаммы бактерий, выделенные из сильно засоленных природных источников, в частности, штамм *Halovibrio variabilis* UzAS3.

Предметом исследования являлся поиск активного ЭПС-синтезирующей галофильной бактерии из природных источников с высоким засолением и разработка подходов для повышения уровня продукции ЭПС.

Методы исследования. В диссертации использованы классические и современные методы микробиологии, биохимии, аналитической химии, молекулярной генетики и биотехнологии.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые в Узбекистане выделены и изучены в чистой культуре галофильные бактерии, относящиеся к родам *Halovibrio*, *Salinicola*, *Halomonas* и на их основе создана коллекция галофильных бактерий;

проведен скрининг местных штаммов галофильных бактерий по их способности продуцировать ЭПС, в результате чего наиболее активным штаммом был выбран *Halovibrio variabilis* UzAS3;

впервые обнаружена галофильная бактерия *Halovibrio variabilis*, продуцирующая ЭПС и определены оптимальные условия для продукции

ЭПС;

определены физико-химические, антиоксидантные и цитотоксические свойства ЭПС, выделенных из штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

обоснован выделение и изучение продуцентов-штаммов из сильно засолённых природных источников на примере штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3 – продуцент ЭПС;

определены оптимальные условия получения ЭПС штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3, являющегося активным продуцентом ЭПС (9,75 г/л) и создана технологическая схема получения ЭПС.

Достоверность результатов исследования обосновывается 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 состоит в том что впервые выделен галофильный штамм бактерий продуцирующий ЭПС и исследованы свойства ЭПС.

Практическая значимость результатов исследований заключается в том, что уровень продукции ЭПС бактерий позволяет рассмотреть их как потенциальный продуцент ЭПС для разработки биотехнологии ЭПС. Продукт, полученный на основе этой технологии, служит для разработки целевых технологий, направленных на повышение урожайности в сельском хозяйстве и др.

Внедрение результатов исследования. На основе полученных результатов по выделению и характеристики местного штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3 – продуцент ЭПС:

штамм ЭПС-продуцирующей галофильной бактерии *Halovibrio variabilis* UzAS3 защищен патентом Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан на полезную модель (№ FAP 01761 от 30.12.2021 г.). В результате это дало возможность использовать продуцент для производства бактериальных экзополисахаридов;

нуклеотидная последовательность 16S рРНК штамма галофильных бактерий *Halovibrio variabilis*, выделенного из Приаралья, включена в базу данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) как *Halovibrio variabilis* UzAS3 под номером MW722894.1 (Справка № 4/1255-3067 АН РУз от 08.11.2021 г.). В результате это дало возможность обогатить коллекцию галофильных и галотолерантных бактерий и сформировать электронную базу данных информационно-аналитической системы;

ЭПС в качестве добавки к биопрепарату при возделывании сои внедрено в фермерском хозяйстве «Кумушкент Хумо-куши» Окдарьинского района Самаркандской области (Справка Министерства сельского хозяйства РУз № 07/25-04/7246 от 07.10.2022 г.). В результате, это дало возможность

увеличить урожайность сои на 3,0 (три) ц/га.

Апробация результатов исследования. Результаты исследований были обсуждены на 11 научно-практических конференциях, в том числе на 5 международных и 6 республиканских.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 5 научных статей, в том числе 3 в республиканских и 2 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций, а также получен 1 патент на полезную модель.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 113 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснованы актуальность и востребованность проведенных исследований, охарактеризованы цель и задачи, объект и предмет исследований, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологии республики, изложены научная новизна и практические результаты исследования, раскрыты научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Анализ состояния вопросов и тенденции развития технологий получения бактериальных полисахаридов»** представлен обзор состояния вопросов, тенденции развития технологий получения бактериальных полисахаридов и значение ЭПС микроорганизмов в народном хозяйстве.

С критических позиций проведен анализ состояния вопросов и тенденции исследований свойств микробных полисахаридов и их функций, а также освещено современное состояние получения бактериальных экзополисахаридов. Приведены данные об условиях существования галофильных микроорганизмов, механизмах адаптации к среде повышенной солености и их классификации, штаммах галофильных бактерий-продуцентов ЭПС. Освещены существующие представления о закономерности регуляции образования полисахаридов микроорганизмами, биологической и функциональной активности их ЭПС, а также их использование в различных отраслях народного хозяйства. Анализ литературных источников показывает, что спрос на бактериальные полисахариды очень высок, поиск новых продуцентов экзополисахаридов и получение полисахаридов с новыми свойствами очень актуален, и существуют неиспользованные технологические возможности для получения бактериальных экзополисахаридов. Исходя из этого, сформулирована цель и задачи исследования.

Во второй главе диссертации «Выделение, идентификация галофильных бактерий, получение ЭПС и аналитические методы исследования» подробно описаны объекты, материалы и методы исследования, такие как идентификация местных галофильных штаммов бактерий морфологически-культуральными, физиолого-биохимическими и хемотаксономическими и молекулярно-генетическими методами, оптимизация питательных сред и условий культивирования бактерий, выделение и очистка ЭПС, методы определения физико-химических и биологических свойств ЭПС.

В третьей главе диссертации «Выделение галофильных бактерий, оптимизация условий культивирования и получение бактериальных экзополисахаридов» представлены данные по выделению штаммов галофильных бактерий из различных источников с высоким содержанием солей, исследование их морфологических, культуральных, физиологических и биохимических свойств, определение видовой принадлежности выделенных галофильных бактерий, оценка способности выделенных штаммов галофильных бактерий продуцировать ЭПС, состав питательной среды для биосинтеза ЭПС и оптимизация условий культивирования, изучение состава и физико-химических свойств получаемого ЭПС, рекомендации по технологии получения ЭПС из галофильных бактерий и результаты исследований ее технико-экономической эффективности.

Для выделения галофильных и галотолерантных штаммов бактерий использовали пробы, отобранные из соленых водоемов и соляных копей сильнозасоленных регионов Республики Узбекистан: Республики Каракалпакстан (Нукус, Кунград, Муйнак), Кашкадарьинской (Декханабад, соляные копи «Ходжаикон»), Ферганской (Язьяван), Наманганской (Чустской, Мингбулакской) областей. Из источников, указанных выше, выделены 21 галофильные и галотолерантные бактериальные изоляты (табл. 1). Скрининг бактерий по потенциалу продукции ЭПС проводили на специальной питательной среде НМ 20% (Halophilic medium) (Luque R. и др., 2014).

Таблица 1

Предварительный ЭПС скрининг выделенных галофильных изолятов

№	Изоляты	ЭПС, мг/100 мл	№	Изоляты	ЭПС, мг/100 мл
12.	SS01	283,7±0,34	22.	UzAS101	–
13.	SS02	–	23.	UzAS102	185,1±0,25
14.	SS101	0,12±0,08	24.	UzAS104	–
15.	SS103	–	25.	DSS01	–
16.	AS01	–	26.	DSS03	–
17.	AS02	0,5±0,11	27.	DSS04	143,7±0,33
18.	AS103	0,2±0,08	28.	DS045	0,07±0,03
19.	AS105	–	29.	KAI4	–
20.	UzAS1	–	30.	KAI105	16,7±0,25
21.	UzAS3	387,6±0,31	31.	KAI109	–
22.	UzAS4	–			

Примечание: I-наличие достоверных различий от показателя контрольного варианта при P<0,05.

Клетки большинства изолятов подвижны, граммотрицательны и не образуют спор, короткие или длинные палочки (UzAS102, SS01), изогнутые палочки (UzAS3, KAI105) и кокки (DSS04), некоторые из них плеоморфны (UzAS3, KAI105). Все изоляты галофильных бактерий являются мезофильными, расщепляют D-глюкозу, сахарозу и продуцируют кислоту в среде и проявляют уреазную активность (табл. 2).

Таблица 2

Морфо-физиологическая и биохимическая характеристика галофильных бактерий

Характеристики	UzAS3	SS01	UzAS102	DSS04	KAI105
Колония: форма	Круглая	Круглая	Круглая	Круглая	Круглая
Пигментация (цвет)	Красный	Красный	Красный	Розовый	Кремовый
Маржа (края)	Целый	Целый	Целый	Целый	Целый
Поверхность	Гладкий	Гладкий	Гладкий	Гладкий	Гладкий
Возвышения по Граму	Выпуклый	Выпуклый	Выпуклый	Выпуклый	Выпуклый
Форма клетки	Изогнутые палочки	Палочки	Длинные палочки	Кокки	Палочки, спирлла
Подвижность	+	+	+	+	+
Диапазон конц. солей (%)	10-25	5-20	5-20	10-25	5-15
Опт. конц. солей (%)	15	9.3	9.3	10	11.7
Диапазон рН	6-9	6-8,5	6-8,5	5,5-8,5	6-8
Оптимум рН	7.5	7.0	7.0	7.0	7.0
Диапазон температур (°C)	15-43	25-40	25-40	15-43	15-40
Опт. температура (°C)	35	33	33	35	30
Индольный тест	-	-	-	-	-
H ₂ S-тест	-	-	-	-	-
Метил красный	-	+	-	-	+
Фогес-Проскауер	-	-	-	-	-
Нитрат редукция	-	-	-	-	+
Цитрат утилизац.	-	-	-	-	-
Уреаза тест	+	+	+	+	+
Каталаза тест	+	+	+	-	-
Оксидаза тест	+	+	-	-	-
Гидролиз: Tween 80	+	-	+	-	+
Казеин	-	-	-	-	-
Крахмал	-	-	-	+	+
Желатин	-	-	-	-	-
Ферментация: D-глюкоза	+	+	+	+	+
Манноза	+	-	+	+	-
Сахароза	+	-	-	+	+
L-рамноза	-	-	-	+	-
D-ксилоза	+	-	+	-	-
Лактоза	+	-	+	+	-

+, положительная реакция; - отрицательная реакция.

Изоляты UzAS3, UzAS102 и DSS04 являются кислотообразующими в питательной среде, содержащей маннозу и лактозу. Активность каталазы и оксидазы отчетливо наблюдалась в изолятах UzAS3 и SS01. Все изоляты галофильных бактерий являются хемоорганотрофами и не растут в анаэробных условиях. Кроме того, изоляты UzAS3, UzAS102 и KAI105 проявляют эстеразную активность, а DSS04 и KAI105 способны гидролизовать крахмал. Ни один изолят не продуцирует индол, H_2S , не гидролизует казеин и желатин, также не утилизирует цитрат.

Краткое описание штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3

Клетки ЭПС-продуцирующего штамма UzAS3 подвижны, грамтрицательны, имеют изогнутую палочковидную форму (0,4-0,7 x 1,0-3,0 мкм), эндоспор не образуют, аэробны. Культура *Halovibrio variabilis* штамма UzAS3 образует круглые, слизистые, красные, гладкие колонии на 20% агаризованной среде НМ, содержащей 1% глюкозы (Рис.1). *Halovibrio variabilis* UzAS3 обладает способностью гидролизовать Tween 80, но не гидролизует казеин и крахмал. Продуцирует карбоновые кислоты из D-фруктозы, лактозы, мальтозы, сахарозы и D-глюкозы. Изолированные клетки не используют цитрат и не продуцируют индол. Изолят UzAS3 может расти в диапазоне концентрации соли от 15% до 25%, оптимально при 15,6%. Кроме того, они растут на твердой среде НМ в интервале 15-43°C и pH 6,0-8,5.

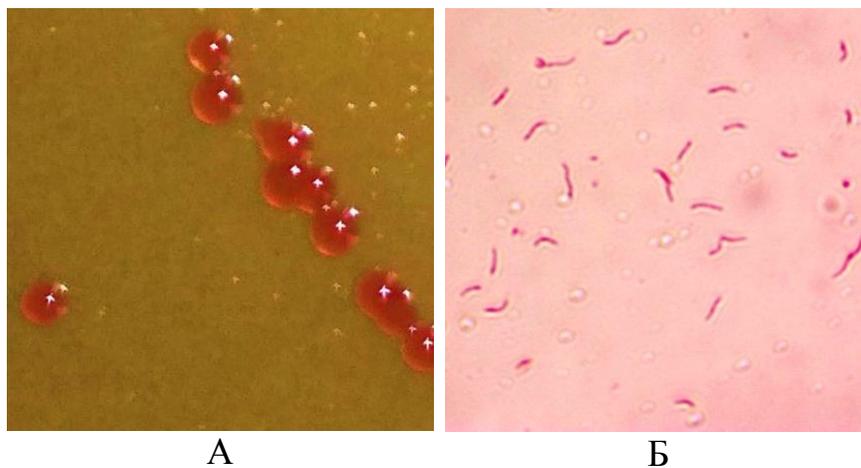


Рисунок 1. А – микроскопия колоний штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3 и Б – грамтрицательно окрашенные клетки (увеличение в 1000х раз).

Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК изолята UzAS3 была определена путем секвенирования, а полученные данные анализировали путем выравнивания в программе BLAST по международной базе данных NCBI, и установлено, что она на 99% сходна с видами *Halovibrio variabilis*, относящимися к роду *Halovibrio*. Полученные результаты зарегистрированы в международной базе данных NCBI как *Halovibrio variabilis* UzAS3 под номером MW722894.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MW722894.1/>) и на его основе построено филогенетическое древо штамма (Рис.2).

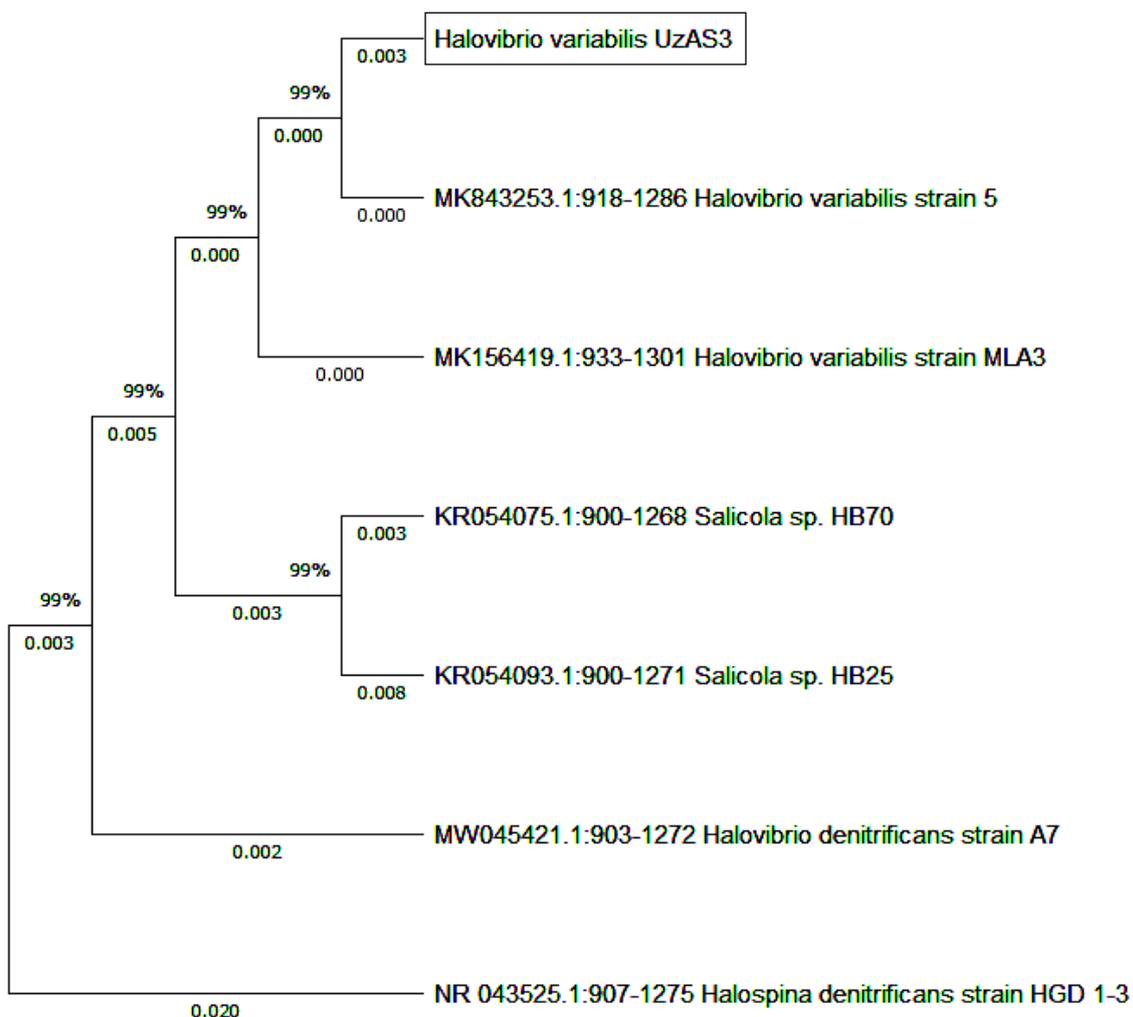


Рисунок 2. Филогенетическая родословная штаммов.

Таким образом, на основании проведенных исследований штамм *Halovibrio variabilis* UzAS3 был отобран для дальнейших исследований как наиболее активный продуцент ЭПС.

В разделе 3.3 диссертации на тему «Оптимизация состава питательных сред и условий роста для ЭПС-продуцирующего штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3» указаны источники углерода, источники азота и их концентрация, а также условия культивирования (время инкубации, температура, начальный pH среды, концентрация солей, уровень аэрации, количество инокулята).

В качестве питательной среды для оптимизационных экспериментов использовали жидкую питательную среду, приготовленную на основе искусственных морских солей (НМ г/л: NaCl - 156,0; MgCl₂·6H₂O - 13,0; MgSO₄·7H₂O - 20,0; CaCl₂·6H₂O - 1,0; KCl - 4,0; NaHCO₃ - 0,2; NaBr - 0,5; глюкоза - 10,0; дрож. экстракт - 5,0). При выборе оптимального состава среды в качестве источника углерода использовали глюкозу и мелассу (1, 2, 3%), сахарозу, маннозу и глюкозу+сахарозу, а в качестве источника азота использовали хлорид аммония, нитрат натрия, пептон и дрожжевой экстракт (0,5; 1,0; 1,5%).

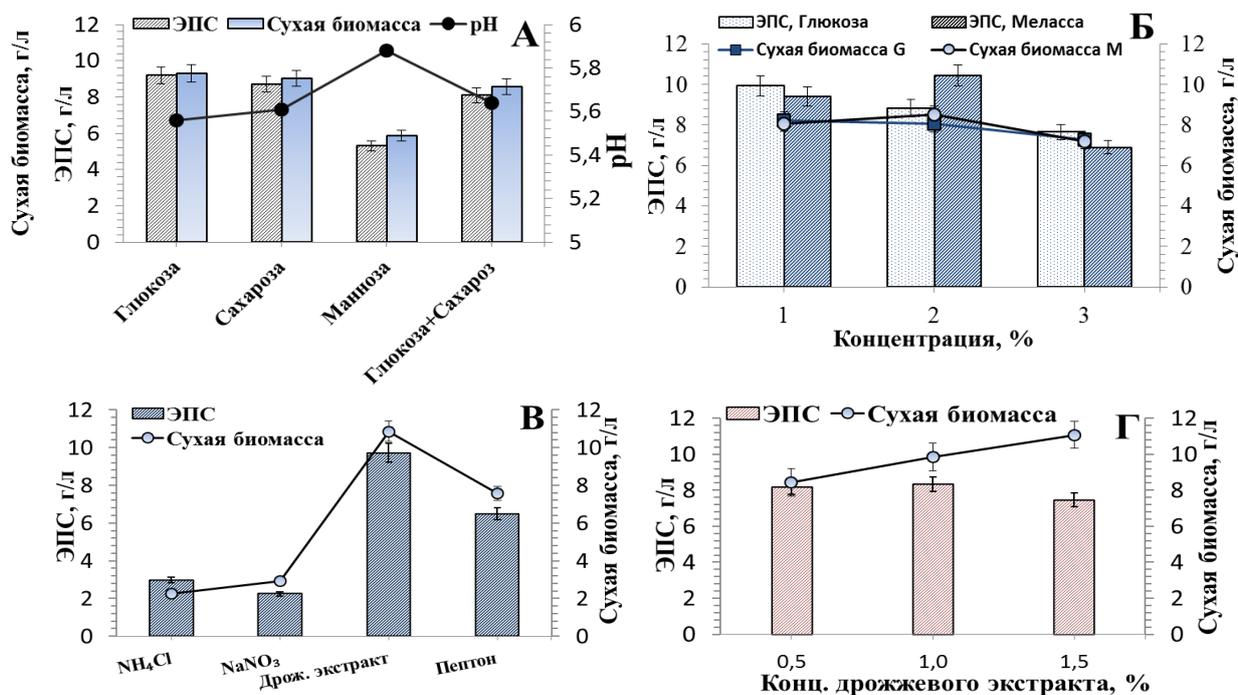


Рисунок 3. Оптимальный состав среды штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3. Влияние А) различных источников углерода, Б) концентраций источников углерода, В) различных источников азота и Г) конц. дрож. экстракта на биомассу и продукцию ЭПС.

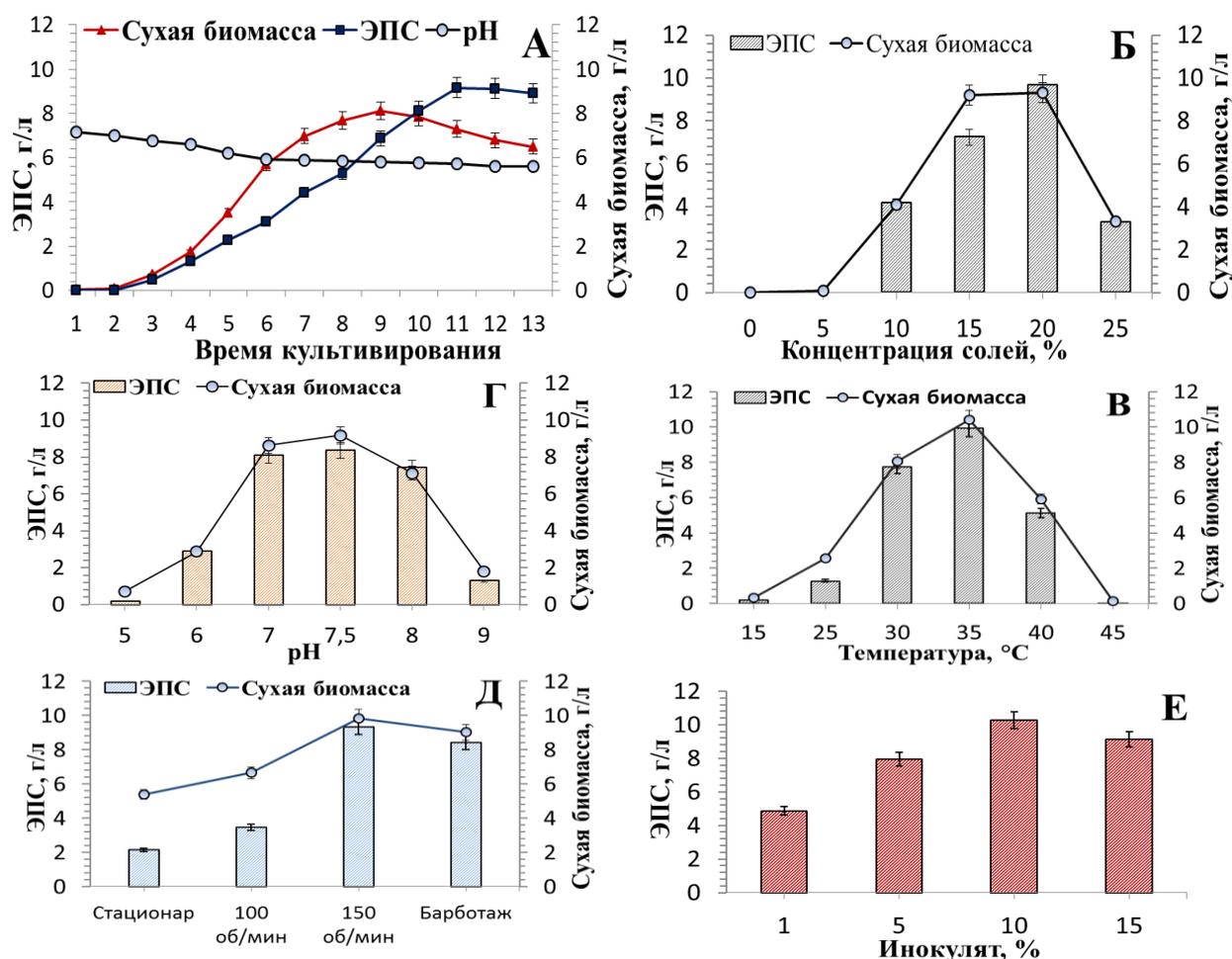


Рисунок 4. Оптимальные условия роста штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3. Влияние А) длительности ферментации, Б) концентрации солей, В) температуры, Г) pH среды, Д) степени аэрации и Е) количество инокулята на рост и продукцию ЭПС.

Результаты исследования показали, что наибольшее влияние на активность биосинтеза ЭПС культуры *Halovibrio variabilis* UzAS3 оказывали глюкоза и дрожжевой экстракт. Для получения ЭПС использовали также и сахарозу в качестве источника углерода выход ЭПС был близок к результатом с глюкозой (Рис.3).

Согласно полученным результатам, оптимальными условиями выращивания были выбраны: содержание солей в среде 20%, температура 35 °С, продолжительность культивирования 11 дней, значение рН питательной среды 7.5, количество инокулята 10 % (10^8 клеток/мл) и условия постоянного встряхивания (150 об/мин) (Рис.4). Барботирование среды воздухом вместо встряхивания показало, что можно также получить ЭПС в количестве 1% (Рис.4, Д). В результате оптимизации состава питательной среды и условий культивирования продукция ЭПС *Halovibrio variabilis* UzAS3 до 3 раза превысила исходную $3,876 \pm 0,31$ г/л и выход ЭПС составил $9,758 \pm 0,31$ г/л.

В разделе 3.4 диссертации на тему «Выделение ЭПС из штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3» приведены результаты исследований по выделению и очистке ЭПС из культуральной жидкости местного галофильного штамма бактерий, по которым бактерии выращивали при следующих параметрах: продолжительность выращивания 13 сут, количество солей в среде 5, 10, 15, 20 и 25%; температура 25 °С, 30 °С, 35 °С, 40 °С и 45 °С; исходный рН среды 5,0-9,0.

Для получения ЭПС из культуры *Halovibrio variabilis* UzAS3 всего 10 л НМ 20% жидкой питательной среды, рН 7,5, температура 35 °С выращивали в течение 11 сут. Первоначально культуральную жидкость центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 минут для извлечения биомассы (76,3 г сухой биомассы). Супернатант концентрировали (4 раза) на вакуумно-роторном испарителе и обрабатывали реактивом Sevage (смесь хлороформа и н-бутанола в соотношении 4:1) для удаления из среды белковых и жировых соединений. Образовавшийся в смеси маслянистый слой отделяли центрифугированием (4000 об/мин, 10 минут).

Полученный супернатант (9,913 л) смешивали с 96%-ным этиловым спиртом в соотношении 1:1,5 (4,745 л надосадочной жидкости : 7,1 л этанола) оставляли на ночь при 4 °С для осаждения ЭПС, которые выделили из смеси декантированием. Для полного удаления остаточных солей в среде полученный осадок ЭПС растворяли в минимальном количестве дистиллированной воды (300 мл) и осуществляли диализ, повторно смешивали с этанолом и осаждали (168,9 г). Образовавшийся осадок сушили в сушильном шкафу при температуре 40 °С и собраны в виде порошка (93,35 г) (Рис. 5). Оставшуюся после осаждения и промывки ЭПС водно-спиртовую смесь перегоняли и полученный этиловый спирт повторно использовали в технологическом цикле для осаждения ЭПС.

В разделе 3.5 диссертации «Состав и физико-химические свойства ЭПС *Halovibrio variabilis* UzAS3», описаны физико-химические свойства выделенного ЭПС. На Рис.5. представлена схема выделения и очистки ЭПС из культуральной жидкости в лабораторных условиях.

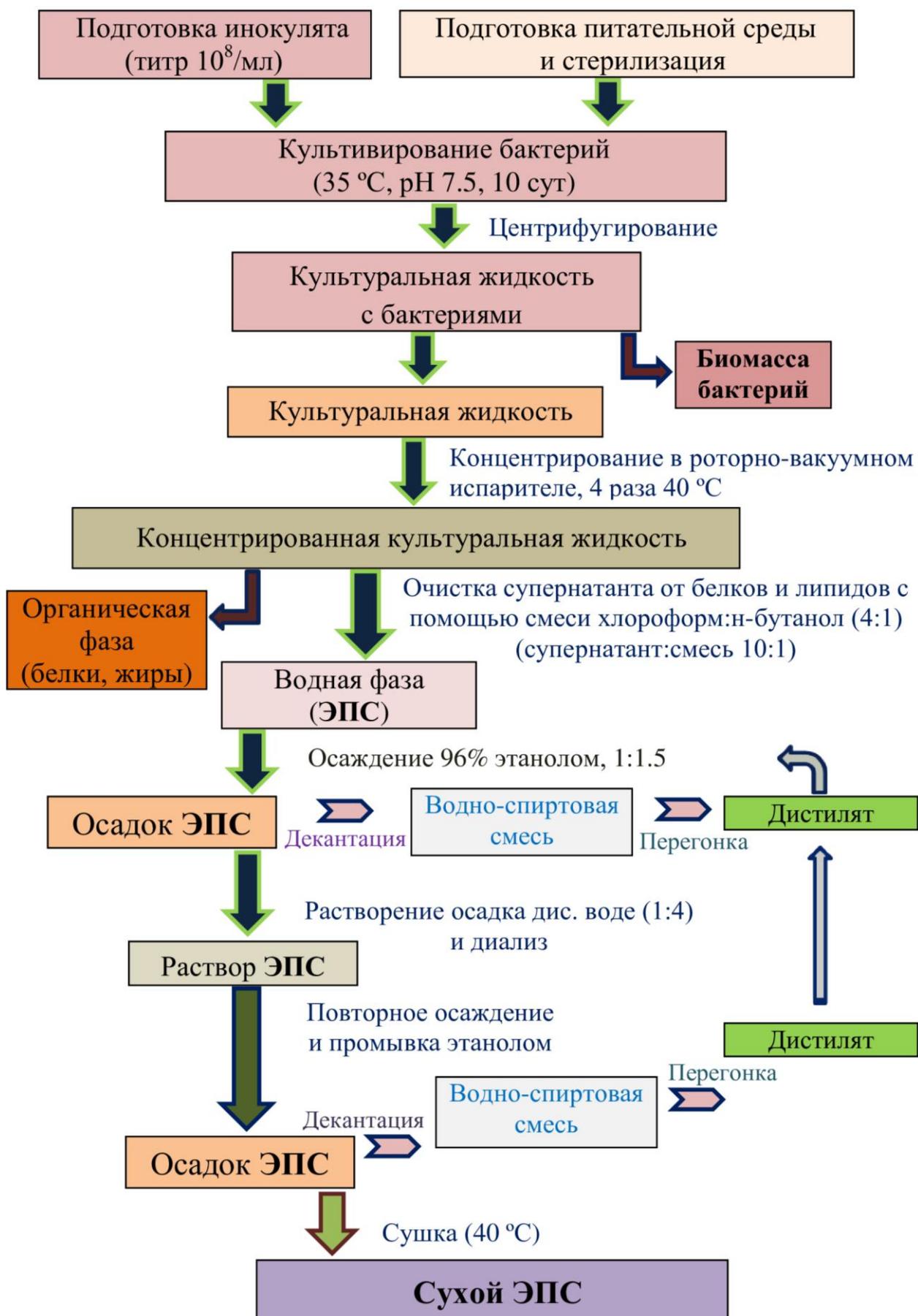


Рисунок 5. Схема выделения и очистки ЭПС из культуральной жидкости в лабораторных условиях.

ЭПС *Halovibrio variabilis* UzAS3 ($9,75 \pm 0,31$ г/л) и его состав представлены в таблице 3.

Таблица 3

Химический состав ЭПС и их выход по итогам оптимизации

№	Культуры	Сухая биомасса бактерий, г/л	ЭПС, г/л	Общее содержание углеводов, %	Общее содержание белка, %
1.	<i>Halomonas</i> sp. SS01	$7,22 \pm 0,16$	$2,83 \pm 0,34$	$88,5 \pm 0,41$	$4,9 \pm 0,04$
2.	<i>Halomonas</i> sp. UzAS102	$5,67 \pm 0,29$	$1,85 \pm 0,25$	$75,1 \pm 0,22$	$9,8 \pm 0,06$
3.	<i>Halovibrio variabilis</i> UzAS3	$7,29 \pm 0,17$	$9,75 \pm 0,31$	$78,2 \pm 0,19$	$8,6 \pm 0,08$
4.	<i>Salinicola</i> sp. DSS04	$5,89 \pm 0,18$	$1,44 \pm 0,33$	$72,1 \pm 0,23$	$8,8 \pm 0,21$
5.	<i>Halovibrio</i> sp. KAI105	$6,76 \pm 0,18$	$1,67 \pm 0,25$	-	-
6.	<i>Halomonas xianhensis</i> SUR308*		7,87	-	-
7.	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 36**		5,6	94,5	3,05

* J. Biswas *et al.* 2017; ** Расулов Б., 2019.

Следует отметить, что исследованный ЭПС на 78,2% состоит из углеводов, а общее содержание белка 8,6%.

Определение моносахаридного состава и молекулярной массы ЭПС. ГХ-анализ моносахаридного состава ЭПС, полученного из культуры *Halovibrio variabilis* UzAS3 показал, что глюкоза доминирует в моносахаридном составе ЭПС и составляет 69%. Также было показано, что ЭПС гетерополисахарид, состоящий из углеводов с молярным соотношением Glc:Xyl:Ara:Man:Rha:Gal = 30,0:6,34:4,17:1,74:1,04:1,0 (Рис. 6).

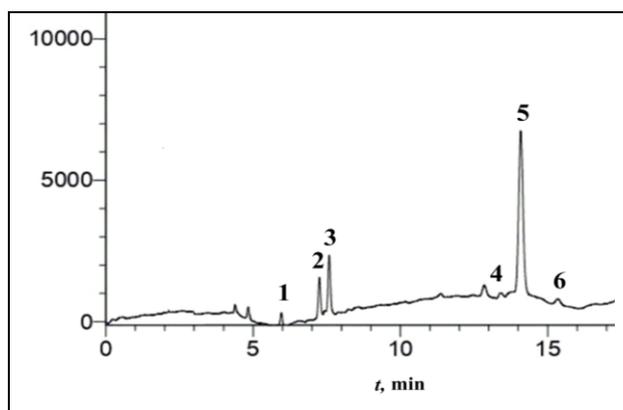


Рис. 6. Моносахаридный состав ЭПС штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3: (1) L-рамноза, (2) L-арабиноза, (3) D-ксилоза, (4) D-манноза, (5) D-глюкоза, (6) D-галактоза.



Рис. 7. Молекулярная масса ЭПС. Значения молекулярной массы стандартов пуллулана: 1 - 708 кДа; 2 - 107 кДа; 3 - 9,8 кДа; 4 - 0,5 кДа.

Молекулярная масса очищенного ЭПС составляла 5,200 кДа (Рис. 7). По данным изученной научной литературы, ЭПС штамма *Halorubrum* sp. TBZ112 имел молекулярную массу 5,052 кДа (Hamidi M. и др., 2019).

Соответственно был получен ИК-спектр образца ЭПС, продуцируемого штаммом *Halovibrio variabilis* UzAS3. ИК-спектр образца ЭПС показывает, что он содержит химические связи и функциональные группы типичные для полисахаридов (Рис. 8). Видно, что при $3393,07\text{ см}^{-1}$ наблюдается широкая и сильная область поглощения, характерная для колебаний гидроксильных групп (-OH). При $2919,889\text{ см}^{-1}$ была зарегистрирована область поглощения, характерная для колебаний асимметричной связи C-H в типичных углеводах. Область поглощения при $1660,57\text{ см}^{-1}$ характерна для карбонильной группы (C=O). Широкая область поглощения при $1149,24$ и $1012,58\text{ см}^{-1}$ соответствует характерным для полисахаридов колебаниям гликозидных связей. Все ИК-спектры обнаруживают интенсивный пик (пик) при 1035 см^{-1} , представляющий собой колебания гликозидного мостика (C-O-C) основной цепи полисахарида. Этот интенсивный пик уширяется, так как перекрывается с другими пиками ($1010\text{-}1090\text{ см}^{-1}$).

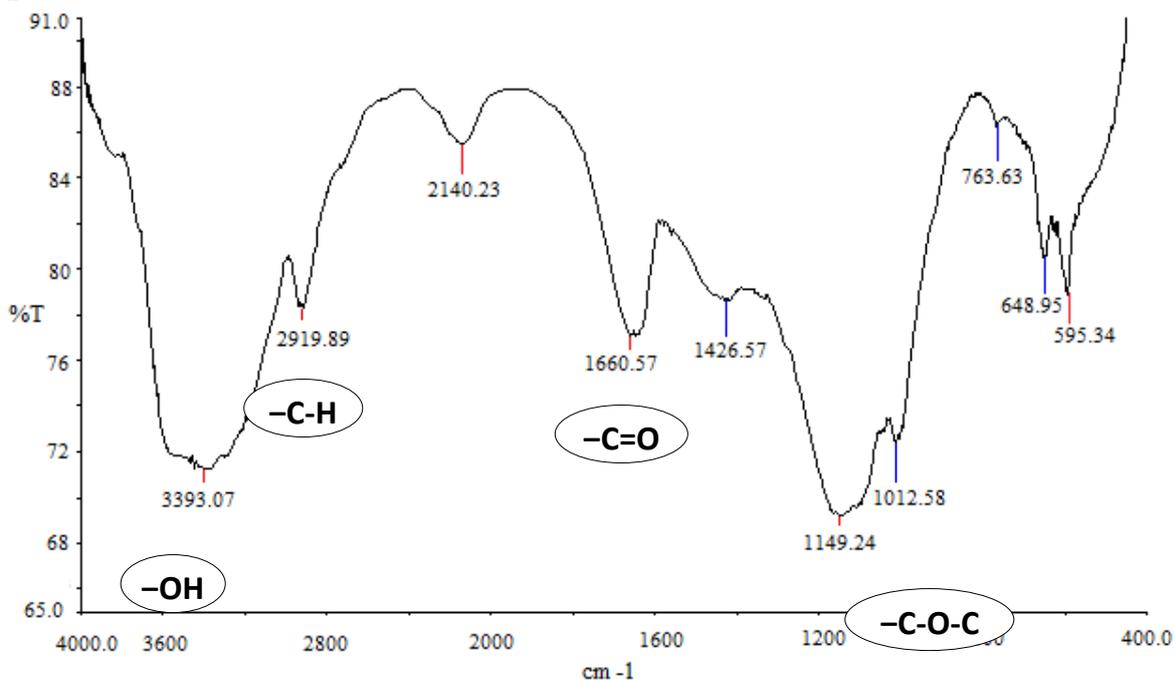


Рисунок 8. ИК-спектр образца ЭПС штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3.

Полученный ЭПС не имеет запаха, имеет молочный цвет. Вязкость 1% раствора составляет 2,03 Па·с, pH 1% раствора 6,4-6,8.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что штамм *Halovibrio variabilis* UzAS3 продуцирует ЭПС специфического состава. Их химический состав зависит от конкретных особенностей штамма и условий выращивания. В литературе отмечено, что условия выращивания и физиологические факторы могут влиять на молекулярную массу и моносахаридный состав ЭПС (Finore I. и др., 2014).

В разделе 3.6 диссертации «Биологические свойства образца ЭПС,

продуцируемого штаммом *Halovibrio variabilis* UzAS3» представлены результаты, полученные по антибактериальным, антиоксидантным и цитотоксическим свойствам ЭПС.

Согласно полученным результатам, образец ЭПС, продуцируемый штаммом *Halovibrio variabilis* UzAS3, не обладал антибактериальной активностью в отношении условно-патогенных микроорганизмов (*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*).

Антиоксидантную активность ЭПС галофильных бактерий исследовали в диапазоне концентраций ЭПС от 0,5 до 5,0 мг/мл. В качестве контроля использовали аскорбиновую кислоту в тех же концентрациях.

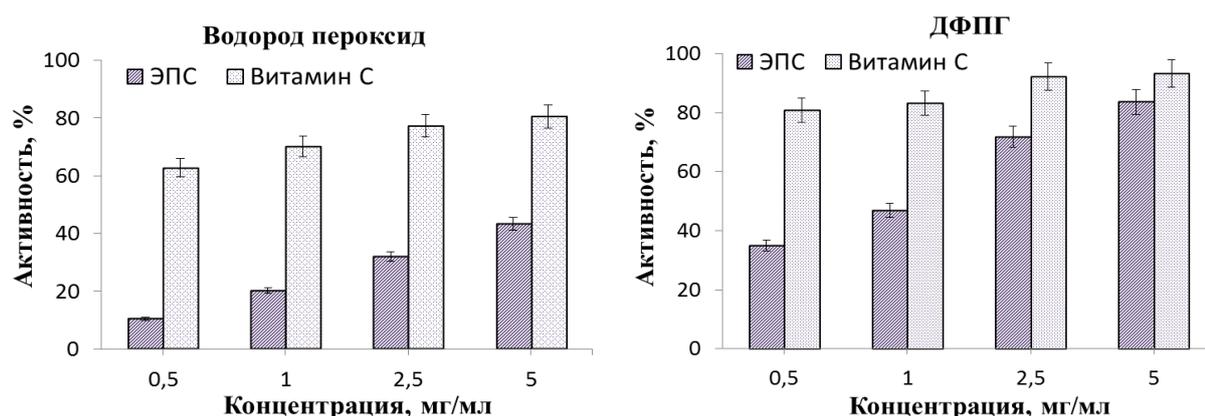


Рисунок 9. Антиоксидантная активность галофильного штамма бактерий ЭПС.

Установлено, что ЭПС (5,0 мг/мл), штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3 обладает антиоксидантной активностью по 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилу (ДФПГ) - 83,63% и по перекиси водорода - 43,37% (Рис. 9).

Полученной ЭПС (100 мкг/мл) проявлял также цитотоксическую активность в отношении клеток карциномы шейки матки HeLa и аденокарциномы молочной железы HBL-100 (Рис. 10).

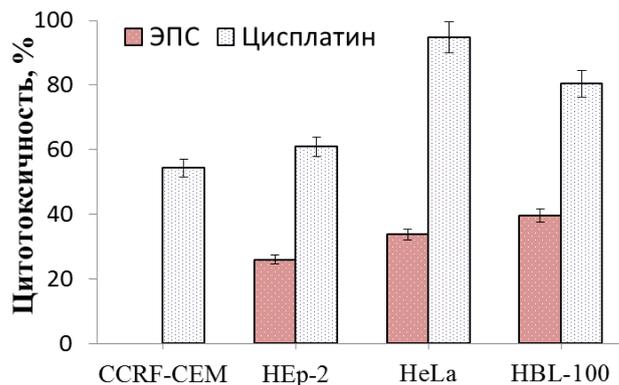


Рисунок 10. Цитотоксическая активность образца ЭПС.

CCRF-CEM – Т-лимфобластная лейкемия; **HEP-2** – аденокарцинома гортани; **HeLa** – эпителиальная карцинома шейки матки; **HBL-100** – аденокарцинома молочной железы.

Контролем служил препарат Цисплатин в количестве 100 мкг/мл. ЭПС

останавливал рост клеток от 33,8 до 39,7% соответственно.

Технология получения бактериальных ЭПС. На основании полученных результатов предлагается технологическая схема получения бактериальных полисахаридов (Рис. 11), по которой готовую питательную среду объемом 100 л переносят в ферментер (1), стерилизуют в самом ферментере и охлаждают до 37 °С. Затем в ферментер добавляют 10 л бактериального инокулята (титр 10^8 клеток/мл).

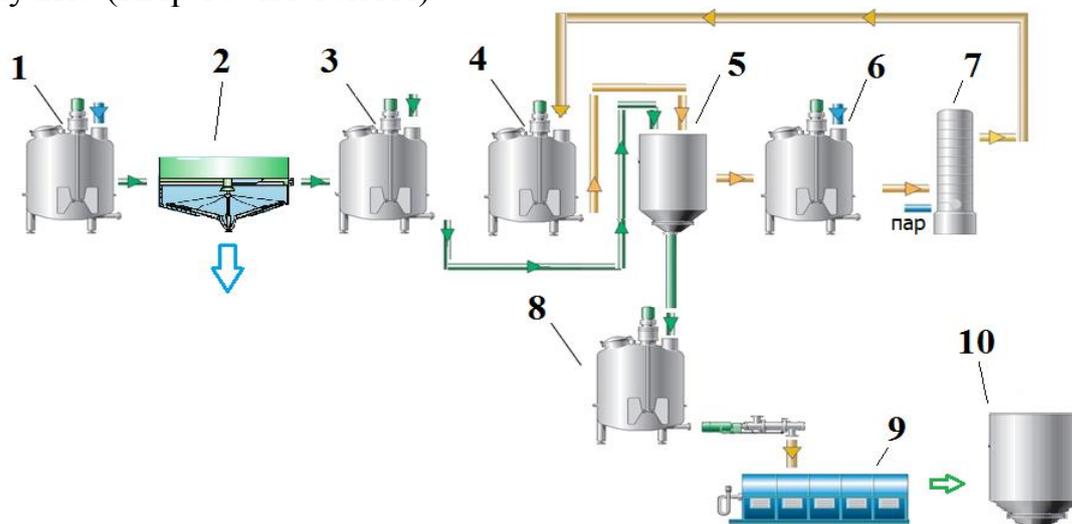


Рисунок 11. Технологическая схема получения бактериальных полисахаридов. 1 - ферментер для культивирования бактерий; 2 - сепаратор; 3 – сборник для КЖ; 4 - резервуар для этанола; 5 - реактор для осаждения полисахаридов; 6 – сборник для водно-спиртовой смеси; 7 - вакуум выпарной аппарат; 8 - реактор для очистки полисахаридов; 9 - сушильный аппарат; 10 – сборник для готовый продукт.

Культивирование бактерий в ферментере проводится при следующих условиях: питательная среда с концентрацией солей 20%, 35-37 °С, рН 7.5, в течение 11 суток. При титре бактерий в среде 10^8 клеток/мл и количестве экзополисахаридов 1% культуральная жидкость направляется в сепаратор (2) для отделения биомассы из культуральной жидкости, после чего культуральная жидкость переносится в биореактор (5) для осаждения полисахаридов. Туда до этого вносится 150 л этанола из емкости (4), добавляется культуральная жидкость, перемешивается и оставляется на 4 часа для полного осаждения полисахаридов. Надосадочная водно-спиртовая смесь отделяется декантацией, осадок промывается этанолом (общий объем этанола 5 л), стандартизируется для очистки в реакторе (8) и направляется на сушку (9). Оставшаяся водно-спиртовая смесь перегоняется (7), полученный дистиллят используется в технологическом процессе. Сухая масса полисахаридов перемалывается и собирается в виде готового продукта в сборнике (10).

Внедрение результатов исследования. Испытание полученных ЭПС был проведен при возделывании масличной сои сорта Селекта-302 с целью образования на корнях растения азотфиксирующих клубеньков, тем самым повышения урожайности и развития растения. В опыте семена сои перед

посевом обрабатывали биопрепаратом на основе бактерий *Bradyrhizobium japonicum* (10^9 клеток/мл) и 1% ЭПС с помощью опрыскивателя (расход 1,5-2,0 л/га). В качестве контроля семена опрыскивали чистой водой без применения биопрепарата. В опытах, проведенных с биопрепаратом, при одинаковой фазе прорастания и полного развития семян сои, по сравнению с контролем, полного фотосинтетического развития в корнях сои наблюдались клубеньки. Установлено, что урожайность сои, выращенной на контрольном поле, составила 20,5 ц/га, а на опытном поле увеличилась до 23,5 ц. По урожайным показателям урожайность сои увеличилась на 3,0 (три) ц (дополнительный доход 2,0515 млн.сум с гектара) при применении биопрепарата. Также, опытная рентабельность составила 50,4%.

ВЫВОДЫ

1. Среди 21 галофильного и галотолерантного бактериального изолята, принадлежащих к семейству *Halomonadaceae*, выделенных из различных источников в районах с высоким уровнем засоления нашей республики, в результате скрининга на потенциал синтеза ЭПС было отобрано 5 изолятов среди которых, наиболее продуктивным являлся штамм UzAS3 (387,6 мг/100 мл).
2. Изучены морфологические, культуральные и биохимические особенности местных ЭПС-продуцирующих галофильных бактерий и проведена генетическая идентификация: установлена принадлежность к роду 2 штаммов *Halovibrio*, 1 штамм *Salinicola* и 2 штамма *Halomonas*.
3. ЭПС, выделенный из штамма *Halovibrio variabilis* UzAS3 представляет собой гетерополисахарид с молекулярной массой 5200 Да и нейтральным моносахаридным остатком и молярным соотношением углеводов: Glc:Xyl:Ara:Man:Rha:Gal = 30,0:6,34:4,17:1,74:1,04:1,0. Установлено, что ЭПС, полученный из культуры *Halovibrio variabilis* UzAS3, обладает антиоксидантной (83,63%) и цитотоксической активностью в отношении клеток карциномы шейки матки HeLa и аденокарциномы молочной железы HBL-100 (от 33,8 до 39,7%).
4. Оптимизирован состав питательной среды для культивирования *Halovibrio variabilis* UzAS3, сахароза (10 г/л), дрожжевой экстракт (5 г/л) и условия культивирования (температура - 35 °С; pH - 7,5; течение 11 дней, барботирование воздухом) с целью повышения синтеза ЭПС культуры *Halovibrio variabilis* UzAS3. Установлено, что продукция ЭПС культурой увеличивается в 3 раза (с 3,87 до 9,75 г/л) по сравнению с результатами первичного скрининга.
5. Предложена технологическая схема получения бактериальных ЭПС в периодическом режиме с загрузкой питательной среды 100 л, по которой можно получить 10 кг ЭПС.

**SCIENTIFIC COUNCIL DSc.02/30.12.2019.B.38.01 ON AWARD
OF SCIENTIFIC DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCES
AT INSTITUTE OF MICROBIOLOGY**

INSTITUTE OF MICROBIOLOGY

KULONOV ABDULAZIZ IBRAGIMOVICH

**THE LOCAL HALOPHILIC BACTERIA AS A POTENTIAL PRODUCER
OF POLYSACCHARIDES**

03.00.12-Biotechnology

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

Tashkent – 2022

The subject of Doctor of Philosophy (PhD) dissertation is registered at the Supreme Attestation Commission under the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan numbered B2019.4.PhD/B415.

The dissertation has been done at the Institute of Microbiology.

The abstract of the dissertation in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages is placed on the website of the Scientific Council (info-microbio@academy.uz) and the website of the Information and Education portal «Ziyonet» (www.ziyonet.uz).

Scientific supervisor: **Mirzarakhmetova Dilbar Tokhtamuratovna**
Doctor of technical sciences, Professor

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

Nasmetova Saodat Mamajanovna
Doctor of biological sciences

Leading organization: **Institute of Bioorganic chemistry**

The defense of the dissertation will take place on «06» December 2022 in 10⁰⁰ at the meeting of the Scientific Council DSc.02/30.12.2019.B.38.01 of the Institute of Microbiology AS RUz at the following address: 100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str., 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, 7B A.Kadyri str., 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 the dissertation is distributed on «22» November 2022.

(Protocol at the register № 9 on «22» November 2022)



Aripov Takhir Fatikhovich
Chairman of the scientific council awarding scientific degrees, D.B.Sc., Academician

Juraeva Rokhila Nazarovna
Scientific secretary of the scientific council awarding scientific degrees, PhD, Senior researcher

Gulyamova Tashkhan Gafurovna
Chairman of the academic seminar under the scientific council on award of scientific degrees, D.B.Sc., Professor

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of the dissertation is to isolate EPS-producing halophilic bacteria and evaluate their potential for EPS synthesis.

The objects of the study were local halophilic bacterial strains isolated from saline natural sources.

The scientific novelty of the study is as follows:

for the first time in Uzbekistan, halophilic bacteria belonging to the genera *Halovibrio*, *Salinicola*, *Halomonas* were isolated and studied in pure culture and a collection of halophilic bacteria was created on their basis;

local strains of halophilic bacteria were screened for their ability to produce EPS, as a result of which *Halovibrio variabilis* UzAS3 was chosen as the most active strain;

for the first time, the halophilic bacterium *Halovibrio variabilis* producing EPS was isolated and the optimal conditions for the production of EPS were studied;

physic-chemical, antioxidant and cytotoxic properties of EPS isolated from the *Halovibrio variabilis* UzAS3 strain were determined.

Implementation of the research results. Based on the results obtained on the isolation and characterization of the local strain *Halovibrio variabilis* UzAS3 – producer of EPS:

the patent was obtained from the Intellectual Property Agency of the Republic of Uzbekistan for the invention (No. FAP 01761) for the strain of the EPS-producing halophilic bacterium *Halovibrio variabilis* UzAS3. As a result, this made it possible to use the producer for the production of bacterial exopolysaccharides;

the 16S rRNA nucleotide sequence of the halophilic bacteria strain *Halovibrio variabilis* isolated from the Aral Sea region is included in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) as *Halovibrio variabilis* UzAS3 under the number MW722894.1 (certificate of No. 4/1255-3067 Uzbek Academy of Sciences dated November 08, 2021). As a result, this made it possible to enrich the collection of halophilic and halotolerant bacteria and form an electronic database of the information and analytical system;

EPS as an additive to a biological product based on EPS + *Bradyrhizobium japonicum* in soybean cultivation was introduced in the “Kumushkent Khumokushi” farm of the Okdarya district of the Samarkand region (certificate of the Ministry of Agriculture of the Republic of Uzbekistan No. 07/25-04/7246 dated October 7, 2022). As a result, this made it possible to increase the soybean yield by 3.0 (three) centners per hectare.

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 113 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т. Ўзбекистоннинг шўрланган худудларида тарқалган галофил бактериялар экологияси ва уларнинг экзополисахаридлар ҳосил қилиш потенциали. НамДУ илмий ахборотномаси - 2019. №10. С. 143-149. (03.00.00; № 17).
2. Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т., Тураева Н. Получения бактериальных полисахаридов. Химия и химическая технология, 2020. №. 4. С. 63-67. (02.00.00; № 3).
3. Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т. Липиды умеренно галофильных бактерий соленого озера региона Аральского моря. Universum: химия и биология, 2021. 12(90). С. 19-22. (02.00.00 №2).
4. Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т. Галофильная бактерия из засоленных вод приаралья – продуцент экзополисахаридов. Узбекский биологический журнал, 2022. № 4. (03.00.00; № 5).
5. Kulonov A.I., Mirzarakhmetova D.T. Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria in saline environments of Aral Sea region. Universum: химия и биология, 2022. 8(98). С. 31-34. (02.00.00 №2).

II бўлим (II часть; II part)

6. Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т. Галофил ва галотолерант микроорганизмларни биотехнологияда қўллаш истикболлари. “Science and Education”, 2020. Vol. 1, Iss.2. P. 120-124.
7. Кулонов А.И., Тонких А.К., Мавжудова А.М., Мирзарахметова Д.Т. Микроорганизмы гиперсолёных озёр Узбекистана и их биотехнологический потенциал. VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. «Микробиология в современной медицине – Новые технологии при поведении микробиологических исследований». Казань, 2019. С. 57.
8. Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т. Местные галофильные микроорганизмы – потенциальные продуценты полисахаридов. Международная конференция молодых ученых «Наука и инновации». Ташкент, 2019. С. 57.
9. Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т. Галофильные бактерии гиперсолёных водоемов Узбекистана и их потенциал образования экзополисахаридов. Материалы докладов 84-й научно-технической конференции. Минск. 3-14 февраля, 2020. С. 319-320.
10. Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т., Нурмуродов Б., Хашимова И. Получение бактериальных экзополисахаридов. «XXI аср – интеллектуал ёшлар асри» республика илмий ва илмий-назарий анжуман, Тошкент. 24 апрель, 2020. С. 93-94.
11. Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т. Выделение и применение

- микробных полисахаридов. «Актуальные проблемы и инновационные технологии в области естественных наук», международной научно-технической on-line конференции, Ташкент, 2020. С. 590-595.
12. Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т. Ўзбекистоннинг галофил ва галотолерант бактериялари экологияси. «Янги Ўзбекистонни қуриш ва ва ривожланишида ёшларнинг фаоллиги» мавзусидаги IV онлайн конференция. Наманган, 2020. С.194-196.
 13. Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т. Технология получения бактериальных экзополисахаридов. Материалы конференции «Технология органических веществ», Минск, 2021. С. 280-285.
 14. Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т. Ўзбекистонда тарқалган галофил ва галотолерант бактериялар экологияси. «Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари», Тошкент, 18 май 2021. С. 229-231.
 15. Кулонов А.И. Галофильные бактерии - продуценты экзополисахаридов. Конференция «Ломоносов 2021», Москва, 14 апрель, 2021.
 16. Kulonov A.I., Mirzarakhmetova D.T. Isolation and Characterization of Halophilic Bacteria from Saline Lake in Karakalpakstan. "Biology and Biotechnology of Microorganisms", International conference (online), Tashkent, September 16-17, 2021. P. 74.
 17. Kulonov A.I., Mirzarakhmetova D.T. Isolation and Characterization of Halophilic Bacteria Producing Exopolysaccharides. "14th Int.Symp. Chemistry and Natural Compounds". Tashkent, October 7-8, 2021. P. 232.

Автореферат “Ўзбекистон кимё журналы” тахририятида тахрирдан
ўтказилди.

Босишга рухсат этилди: 22.11.2022
Бичими: 60x84 ^{1/16} «Times New Roman»
гарнитурада рақамли босма усулда босилди.
Шартли босма табағи 3. Адади 100. Буюртма: № 146
Тел: (99) 832 99 79; (99) 817 44 54
Гувоҳнома reestr № 10-3279
“IMPRESS MEDIA” МЧЖ босмахонасида чоп этилди.
Манзил: Тошкент ш., Яккасарой тумани, Қушбеги кўчаси, 6 уй.