DOI 10.66073/ReFocus-Conf/3010004

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭКЗОПОЛИСАХАРИД-ПРОДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ И ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА СКРИНИНГА ДЛЯ ПОЧВЕННЫХ ИЗОЛЯТОВ

Кудратуллаева Диёра Отабек кизи, **Тоштемирова М.Ж.**
Ташкентский государственный технический университет имени Ислама Каримова

Аннотация: Для первичного отбора экзополисахарид-продуцирующих (ЭПС) бактерий из почвенных образцов сравнены методы: визуальная оценка мукоидных колоний, скрининг на среде с конго красным, сканирующая электронная микроскопия, а также выделение ЭПС осаждением этанолом с количественным определением. Для первичного скрининга выбран метод конго красного агара в варианте, описанном корейской группой *Shaffique* и соавт. (2023): среда LB с 5% сахарозы и 0,8 г/л конго красного, инкубация 5 суток при 30-35 °C. Метод прост, подходит для массового просмотра колоний и совпадает по условиям с нашей схемой выделения. Его главное ограничение — качественный характер результата, поэтому отобранные изоляты нужно проверять выделением и количественным определением ЭПС.

Ключевые слова: экзополисахариды, конго красный агар, скрининг, почвенные бактерии, сравнение методов.

Ekzopolisaxarid ishlab chiqaruvchi bakteriyalarni aniqlash usullarini taqqoslash va tuproq izolatlari uchun skrining usulini tanlash asoslari

Annotatsiya: Tuproq namunalaridan ekzopolisaxarid ishlab chiqaruvchi (EPS) bakteriyalarni birlamchi tanlash uchun quyidagi usullar taqqoslandi: mukoid koloniyalarni vizual baholash, Kongo qizilini o‘z ichiga olgan muhitda skrining qilish, skanerlovchi elektron mikroskopiya va miqdoriy aniqlash bilan etanol cho‘ktirish orqali EPSni ajratish. Birlamchi skrining uchun Koreya guruhi *Shaffique* va boshqalar (2023) tomonidan tasvirlangan Kongo qizil agar usuli tanlandi: 5% saxaroza va 0,8 g/L Kongo qizili bo‘lgan LB muhit, 30-35 °C da 5 kun davomida inkubatsiya qilingan. Bu usul oddiy, koloniyalarni keng ko‘lamli skrining qilish uchun mos keladi va bizning izolyatsiya sxemamiz shartlariga mos keladi. Uning asosiy cheklovi natijaning sifat jihatidan xarakteri; shuning uchun tanlangan izolatlar EPSni ajratish va miqdoriy aniqlash orqali tekshirilishi kerak.

Kalit so‘zlar: ekzopolisaxaridlar, Kongo qizil agari, skrining, tuproq bakteriyalari, usullarni taqqoslash.

Comparison of methods for detecting exopolysaccharide-producing bacteria and justification for the choice of a screening method for soil isolates

Abstract: To select exopolysaccharide (EPS)-producing bacteria from soil samples, several methods were compared: visual assessment of mucoid colonies, screening on Congo red medium, scanning electron microscopy, and EPS isolation via ethanol precipitation followed by quantification. The Congo red agar method — specifically the variant described by the Korean research group *Shaffique* et al. (2023) — was selected for primary screening; this involves using LB medium supplemented with 5% sucrose and 0.8 g/L Congo red, with incubation for 5 days at 30-35°C. This method is simple, suitable for high-throughput colony screening, and compatible with the conditions

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ
Кудратуллаева Д.О., Тоштемирова М.Ж. Сравнение методов выявления экзополисахарид-продуцирующих бактерий и обоснование выбора метода скрининга для почвенных изолятов // Состояние и перспективы развития фундаментальной и прикладной микробиологии: точка зрения молодых учёных: материалы Республиканской научно-практической конференции. – Ташкент, 2026. – С. 33–36.
DOI: https://doi.org/10.66073/ReFocus-Conf/3010004

of our isolation protocol. Its main limitation is that it yields qualitative results; therefore, selected isolates require further verification through EPS isolation and quantification.

Keywords: exopolysaccharides, Congo red agar, screening, soil bacteria, method comparison.

Введение

От выбора метода первичного скрининга зависит, какие изоляты попадут в дальнейшую работу, поэтому метод нужно обосновывать, а не брать по привычке. Бактерии, способные расти при низкой водной активности, используют синтез ЭПС как главную защиту от высыхания и засоления, а ЭПС-продуценты аридных регионов считаются перспективными для агротехнологий [1]. Для почв Узбекистана такой поиск только начинается, и первым шагом остаётся быстрый и недорогой скрининг колоний. Общие сведения о свойствах и методах получения бактериальных ЭПС изложены в нашем обзоре [2].

Цель статьи — сравнить методы, которыми выявляют ЭПС-продуцирующие бактерии, и обосновать выбор метода для скрининга почвенных изолятов.

Сравниваемые методы

Методы различаются тем, что именно они показывают: наличие ЭПС, их количество или структуру. Первые два дают быстрый отбор колоний, остальные подтверждают и измеряют результат.

Таблица 1. Сравнение методов выявления ЭПС-продуцирующих бактерий

Метод	Что показывает	Преимущества	Ограничения
Мукоидные колонии на среде с сахарозой	Слизистость колоний	Дёшево, не нужно оборудование	Не все продуценты мукоидны, оценка субъективна
Конго красный агар	Тёмные или чёрные колонии на красном фоне при продукции ЭПС	Быстро, много колоний на одной чашке, колонии остаются живыми	Качественный подтверждающий тест; создан для стафилококков
Сканирующая электронная микроскопия	ЭПС-матрица вокруг клеток	Прямое подтверждение	Сложная подготовка образцов, нужен микроскоп
Осаждение этанолом, диализ, сухая масса	Выход ЭПС	Просто, подходит для больших объёмов	Соосаждение белков и нуклеиновых кислот, сухая масса включает примеси
Фенол-серный метод	Общее содержание углеводов (490 нм, стандарт глюкоза)	Точный, простой, чувствительный	Неспецифичен, учитывает и сахара среды
HPLC, FTIR, NMR	Моносахаридный состав и структура	Детальная характеристика полимера	Сложность и стоимость

Корейский метод: протокол Shaffique и соавторов

Метод конго красного агара предложен для выявления слизеобразования у стафилококков: среда содержала 37 г/л бульона BHI, 50 г/л сахарозы, 10 г/л агара и 0,8 г/л конго красного, чашки инкубировали 24 ч при 37 °C, а чёрные колонии с сухой кристаллической консистенцией считали положительными [6]. Группа из Национального университета Кёнпук (Тэгу, Южная Корея) адаптировала его для почвенных бактерий в работе по биопраймингу пшеницы при засухе [7].

DOI: 10.66073/ReFocus-Conf/3010004

Протокол.

1. Среда: LB-бульон 25 г/л, агар 2%, сахароза 5%, конго красный 0,8 г/л; все компоненты смешивают и автоклавируют.
2. Посев и инкубация: 5 суток при 30-35 °C.
3. Учёт: чёрные колонии на красном фоне подтверждают наличие полисахаридов.
4. Подтверждение: сканирующая электронная микроскопия показала бактерии, погружённые в ЭПС-матрицу, а в среде определяли сахарозу методом HPLC.

Из ризосферной почвы вокруг *Artemisia vulgaris* (пляж Похан, около Тэгу) выделено 73 изолята; для штамма SH-8 установлена принадлежность к *Klebsiella aerogenes* (сходство 99,93% по 16S рРНК, номер GenBank OM535901). Штамм образовывал ЭПС, который в таблице обозначен как «+++», то есть без числовых значений [7].

Обоснование выбора метода

Для первичного скрининга почвенных изолятов выбран конго красный агар по протоколу [7] по следующим причинам.

1. Масштаб. На одной чашке оценивают много колоний без экстракции и центрифугирования, что важно для десятков почвенных образцов.
2. Совместимость с нашей схемой. Среда на основе LB с 5% сахарозы и инкубация 5 суток при 30-35 °C соответствуют условиям, которые мы использовали при выделении бактерий из почвы.
3. Адаптация к почвенным бактериям. В отличие от первоначальной версии для клинических штаммов (24 ч при 37 °C) [6], протокол [7] рассчитан на почвенную микробиоту.
4. Полная схема работы. В [7] скрининг сочетали с идентификацией по 16S рРНК и электронной микроскопией, и такую последовательность можно повторить.

Метод качественный: в [7] ЭПС оценён как «+++» без количественных данных, а конго красный агар в целом считают подтверждающим, но не количественным тестом [8]. Поэтому после скрининга нужно выделить ЭПС осаждением этанолом с диализом и определить выход, например фенол-серным методом, помня, что он учитывает все углеводы [4,8]. Схема такого выделения (удаление белков трихлоруксусной кислотой, осаждение холодным этанолом, диализ, лиофилизация, FTIR и UHPLC) описана корейской группой в [9]. Кроме того, результаты на среде LB нужно проверять на разных образцах, так как данные [8] получены для молочнокислых бактерий, а [6] — для стафилококков.

Применение метода к почвам Учкудукского района

Отобрано 14 образцов почвы в окрестностях Кулкудука и Зафарабада (Навоийская область) в мае 2025 г. (13 мая - 5 образцов, 14 мая - 5, 18 мая - 4) вдоль маршрута от окрестностей Кулкудука (точка 1) через центральную часть маршрута (точка 2) к окрестностям Зафарабада (точка 3). После посева на среду с конго красным доля $ЭПС^+$ колоний составила 20-30% в одной группе образцов и 10-15% в другой; всего учтено 9 колоний, из них $ЭПС^+$ 5. Выявлены тёмно-синие, малиновые и чёрные колонии, по совокупности признаков (окраска, слизистая консистенция, растекающийся край, крупный размер) отобрано 5 перспективных изолятов [10]. Это предварительные данные: цвет колоний не позволяет определить тип полисахарида, поэтому изоляты нужно довести до чистых культур и проверить выделением ЭПС.

Выводы

Методы выявления ЭПС делятся на быстрые качественные (мукоидные колонии, конго красный агар) и подтверждающие (микроскопия, выделение ЭПС, фенол-серный метод, HPLC, FTIR, NMR). Для первичного скрининга почвенных изолятов выбран конго красный агар по протоколу Shaffique и соавт. (2023) как простой, массовый и совместимый с нашей схемой выделения.

DOI: 10.66073/ReFocus-Conf/3010004

Метод даёт только качественную оценку, поэтому отобранные изоляты необходимо проверить выделением ЭПС и количественным определением.

Список литературы

1. Kondrasheva K.V., Yakimov M.M., La Cono V.L., Gavrilov S.N., Kalenov S.V., Tozhieva M.B., Davranov K.D. Xerotolerant microorganisms - producers of exopolysaccharides and potential of their use in agricultural technologies // Microbiology. - 2025. - Vol. 94, No. 5. - P. 363-374. - https:doi:10.7868/S3034546425050017.
2. Ramasamy K.P., Mahawar L. Coping with salt stress - interaction of halotolerant bacteria in crop plants: a mini review // Front. Microbiol. - 2023. - Vol. 14. - Art. 1077561. - https:doi:10.3389/fmicb.2023.1077561.
3. DuBois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. - 1956. - Vol. 28, No. 3. - P. 350-356. - https:doi:10.1021/ac60111a017.
4. Rühmann B., Schmid J., Sieber V. Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides // Front. Microbiol. - 2015. - Vol. 6. - Art. 565. - https:doi:10.3389/fmicb.2015.00565.
5. Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci // J. Clin. Pathol. - 1989. - Vol. 42, No. 8. - P. 872-874. - https:doi:10.1136/jcp.42.8.872.
6. Shaffique S., Imran M., Kang S.-M., Khan M.A., Asaf S., Kim W.-C., Lee I.-J. Seed bio-priming of wheat with a novel bacterial strain to modulate drought stress in Daegu, South Korea // Front. Plant Sci. - 2023. - Vol. 14. - Art. 1118941. - https:doi:10.3389/fpls.2023.1118941.
7. Yadav M.K., Song J.H., Vasquez R., Lee J.S., Kim I.H., Kang D.-K. Methods for detection, extraction, purification, and characterization of exopolysaccharides of lactic acid bacteria - a systematic review // Foods. - 2024. - Vol. 13, No. 22. - Art. 3687. - https:doi:10.3390/foods13223687.
8. Kim I., Woo H., Chhetri G., Park S., Seo T. A novel exopolysaccharide-producing bacterium, *Pseudescherichia liriopis* sp. nov. isolated from *Liriope platyphylla*, enhances the growth of *Daucus carota* subsp. *sativus* under drought and salinity stress // Front. Plant Sci. - 2024. - Vol. 15. - Art. 1417639. - https:doi:10.3389/fpls.2024.1417639.