

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ФАНЛАР АКАДЕМИЯСИ  
МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

**НАВОИЙ КОН-МЕТАЛЛУРГИЯ КОМБИНАТИ**

*Қ.Д. Давранов, Қ. Санақулов, И.М. Халилов, Ф.Б. Қобилов*

**ҚИММАТБАҲО ВА НОДИР МЕТАЛЛАРНИ ЭРИТМАГА  
ЎТИШИДА (ДЕСОРБЦИЯ) ИШТИРОК ЭТУВЧИ  
МИКРООРГАНИЗМЛАРНИ АНИҚЛАШДА  
ИШЛАТИЛАДИГАН ЗАМОНАВИЙ УСЛУБИЙ  
ТЕХНОЛОГИЯЛАР БЎЙИЧА**

**А М А Л И Й - Қ ў л л а н м а**

**Навоий 2021 й.**

**Тузувчилар:** биология фанлари доктори, профессор Қ.Д. Давранов  
техника фанлари доктори, профессор Қ. Санақулов  
биология фанлари номзоди, катта илмий ходим И.М. Халилов  
кичик илмий ходим Ф.Б.Қобилов

**Такризчилар:**

биология фанлари доктори, профессор З.Р. Ахмедова  
биология фанлари номзоди, катта илмий ходим А.А. Махсумханов

Ушбу амалий-қўлланма Республикамиз тоғ-кон саноати шароитларида нодир ва қимматбаҳо металлларни биотехнологик усуллар ёрдамида эрувчанлик даражасини ошириб, ажратиб олишда иштирок этувчи микроорганизмларни таҳлил қилишда ва аниқлашда ишлатиладиган замонавий лаборатория услубларини ўз ичига олган бўлиб, мазкур қўлланма тоғ-кон саноати соҳасида илмий иш қилаётган докторантлар, таянч докторантлар, профессорлар, ўқитувчилар ҳамда соҳага оид ишлаб чиқаришда фаолият юритаётган ходимлар ва кенг оммага мўлжалланган.

## I. НОДИР ВА ҚИММАТБАҲО МЕТАЛЛАРНИ ЭРИТИШДА ИШТИРОК ЭТУВЧИ МИКРООРГАНИЗМЛАР ТАВСИФИ

Ҳозирги вақтда амалиётда нодир ва қимматбаҳо металлларни табиий рудалар таркибидан биологик эритиш усули орқали ажратиб олиш мақсадида кўпгина микроорганизмлар фаолиятдан фойдаланилади. Хусусан, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* ва *Leptospirillum ferrooxidans* каби бактериялар шулар жумласидандир. Ушбу бактериялар, бажарадиган вазифаларига қараб бир биридан бироз фарқ қилади. Масалан, *Acidithiobacillus ferrooxidans* бактериялари темирни оксидласа, *Acidithiobacillus thiooxidans* бактериялари олтингугуртни оксидлайди. Бундан ташқари, *Leptospirillum ferriphilum*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Bacillus licheniformis*, *Acidiphilium multivorum* sp., *Metallosphaera sedula*, *Sulfolobus solfataricus* каби бир гуруҳ бактериялар ассоциацияси ҳам тоғ-кон металлургия соҳасида нодир ва қимматбаҳо металлларни биологик эритиб, ажратиб олиш жараёнида фаол иштирок этувчи муҳим бактериялар ҳисобланади.



1-Расм. *Acidithiobacillus thiooxidans* бактериясининг

Электрон микроскопик кўриниши [2]

*Acidithiobacillus thiooxidans* бактерияси 2000 йилда Граммапротеобактериялар таркибида янги таснифланган *Acidithiobacillus* турига қайта киритилишидан олдин *Thiobacillus thiooxidans* деб номланган.

Морфологик жиҳатдан *A. thiooxidans* бактериялари грамм-манфий, таёқча шаклидаги бактериялардир. *A. thiooxidans* мезофил бактерия бўлиб, 10-37°C ҳарорат оралиғида ўсиб ривожланади, унинг ўсиши учун энг оптимал ҳарорат 28-30°C ҳисобланади. Ацидофил бактериялар pH кўрсаткичи энг мақбул, яъни 2,0 - 3,0 бўлган муҳитда яхши ривожланади [1]. *A. thiooxidans* кўпинча ғорларнинг биологик сиртларида учрайди ва ғор тизимларининг шаклланишида маълум даражада роль ўйнайди. *A. thiooxidans* бактериялари споралар ҳосил қилмайди. Хужайранинг ўртача узунлиги 1 мкм ва ундан кам, ўртача диаметри 0,5 мкм [2].

*Acidithiobacillus ferrooxidans* - бу грамм-манфий, таёқча шаклидаги бактерия бўлиб, анорганик кон шароитида ўсиши учун жуда мос келади. *A. ferrooxidans* хужайралари узунлиги 0,5 мкм - 0,6 мкм. Унинг энергия олиш манбалари қора (оксидланган) темир ва олтингугуртдир. Ушбу бактериялар деярли барча маълум сульфид минералларини, шу жумладан пирит, арсенопирит, мис сульфидларини оксидлайди. Ушбу бактерия, pH кўрсаткичи 1,0 дан 6,0 гача бўлган муҳитда ривожланади ва унинг максимал ўсиш тезлиги учун оптимал pH кўрсаткичи 2,0 дан 2,5 гача бўлган муҳитни талаб қилади. Худди шундай, у 2 дан 40°C гача бўлган ҳарорат оралиғида ривожланади, аммо унинг максимал даражада ўсиб ривожланиш ҳарорати 28-35°C оралиғида аниқланган. *A. ferrooxidans* ноёб металлларни рудалардан ажратиш олишда қўлланилади. Унинг асосий вазифаси сульфидли минералларга ҳужум қилишдир, яъни мис, қўрғошин, рух ёки никел каби металлларнинг эримайдиган сульфидларини, уларнинг эрувчан сульфатларига айлантириш қобилиятига эга эканлигидир. *A. ferrooxidans* одатда чуқур ғорларда ёки кислота кони дренажида, масалан кўмир чиқиндиларида учрайдиган грамм манфий таёқча шаклидаги бактериядир [3].

Ушбу *Acidophilic* тур бактериялари оптимал ривожланишининг рН кўрсаткичи 1,5 - 2,5 га тенг бўлиб, улар айнан мана шундай экстремал шароитда эримайдиган металларни эрувчан ҳолатга ўтказадилар. Ушбу металл ионларининг паст концентрацияси ҳам бошқа бактериялар учун жуда захарли бўлади. Бундан ташқари, ушбу бактериялар бошқа усуллар билан олинмайдиган металларни ажратиб олиш мақсадида, саноатда биологик эритиб олиш ишларида фойдаланилади.



**2-Расм. *Acidithiobacillus ferrooxidans* бактериясининг микроскопик кўриниши (<https://www.sciencephoto.com/media/798832/view/thiobacillus-ferrooxidans-sem>)**

*A. ferrooxidans* бактерияси қимматбаҳо металларни биологик эритиб олиш жараёнида дунё миқёсида кенг қўлланиладиган микроорганизмлардан ҳисобланади. *A. ferrooxidans* тўртта (АФ1, АФ2, АФ3 ва АФс) штаммларининг турли хил шароитларда (рН, ҳарорат, оғир метал ион концентрацияси) фаоллиги устида тадқиқот ишлари олиб борилган. Бунда АФ1 ва АФ2 штаммларининг оптимал рН муҳити 1,8, АФ3 ва АФс штаммлари ўсиши учун оптимал рН муҳити 2,0 ва 2,5 ташкил этади. Ушбу штаммларнинг энг паст рН кўрсаткичига чидамлилиги 1,0 га тенг бўлиб, АФ1 (рН 1,2) ва АФ2 (рН 1,4) штаммлариникига қараганда пастроқ. Ҳар тўрттала штаммларнинг ўсиш фаоллигини оптимал температураси 28-32°C га

тенг, АФ3-28°C дан паст ҳароратда энг фаол ўсадиган штамм. АФс штаммининг энг фаол оптимал ҳарорати 32°C. АФ2 штаммининг бу хусусияти ўзгарувчан бўлиб, у паст ҳароратда ҳам ўса олади [4].

***Leptospirillum*** - темирни оксидловчи бактериялар туркумидир. Ушбу бактериялар саноатда биологик эритиш жараёнида (металларни эрувчан ҳолатга ўтказиш) ва биооксидланишда (металларни экстракция қилишда) муҳим роль ўйнайди. Улар катъий аэроблардир. *Leptospirillum* саноатнинг доимий оқими бўлган биооксидланиш резервуарларидаги асосий темир оксидловчилари эканлиги аниқланган.

***Leptospirillum ferrooxidans*** [5] хужайралари грамм-манфий ва спирал шаклида, кенглиги 0,3-0,5 мкм ва узунлиги 0,9-3,0 мкм. *L. ferrooxidans* бактериялари учун оптимал ҳарорат 45 дан 50°C гача (максимал, 55 дан 60°C гача). *L. ferrooxidans* ларнинг саноатда энг кўп ишлатилиши ва бунинг асосий сабаби уларнинг оксидланиш потенциали тезлигининг (яъни  $Fe_{3+}/Fe_{2+}$  нисбати) билан боғлиқлигидир. *A. ferrooxidans* ларнинг ўсиши ва фаоллиги учун pH кўрсаткичи 1,8–2,5 оралиғи оптимал ҳисобланади. *L. ferrooxidans* бактериялари *A. ferrooxidans* ларга қараганда кислотали муҳитга бардошлилик хусусиятига эга ва pH кўрсаткичи даражаси 1-2 бўлганда яхши ривожланади.

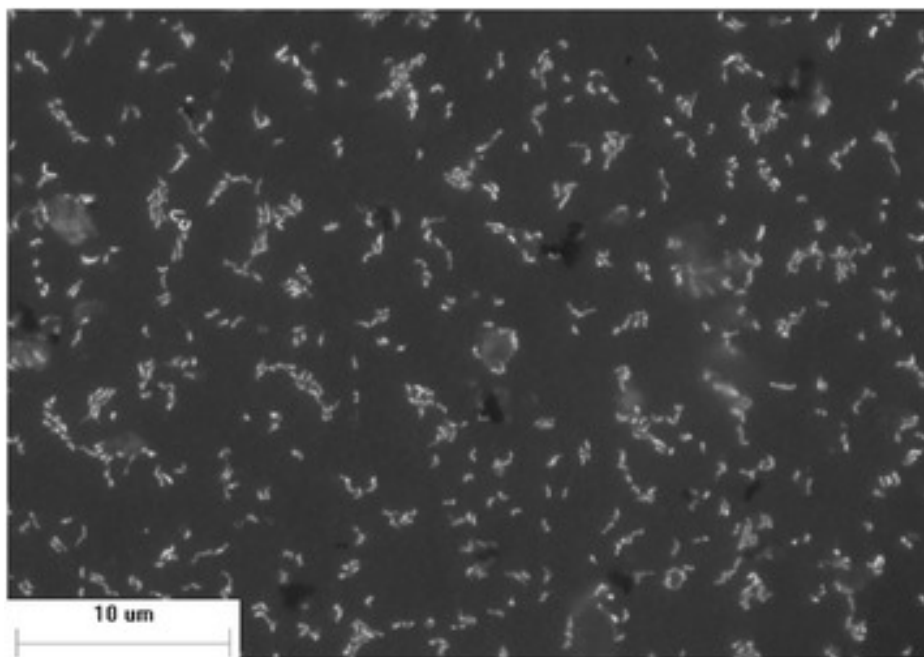


**3-Расм. *Leptospirillum* бактерия турларининг ёруғлик  
микроскопик кўриниши**

([http://wiki.biomine.skelleftea.se/wiki/index.php/Image:Lepto\\_SEM.jp](http://wiki.biomine.skelleftea.se/wiki/index.php/Image:Lepto_SEM.jp))

*L. ferrooxidans* бактериялари темир оксидловчи бактерияларнинг тури бўлиб, метоболик жараёнда фаол равишда электрон донор сифатида ва электрон қабул қилувчи сифатида кислород билан бирикади. Улар саноатда биологик тозалашда (металларни эрийдиган шаклга ўтказиш) ва биооксидланишда (металларни қазиб олишда) муҳим роль ўйнайди.

*Leptospirillum ferriphilum* - грамм-мусбат химолизототрофик бактерия ҳисобланиб, металлга бой моддаларда (рудаларда) кўп учрайди ва шунинг учун ҳам бу бактерияларни ажратиб олиш мақсадида, рудалардан фойдаланилади. Бу бактерия мезофил бўлиб, 25 дан 40°C гача ҳароратда ўсиб яхши ривожланади. pH кўрсаткичи 1,3 дан 2,0 гача бўлган кислотали муҳит бу бактерия учун оптимал ҳисобланади.



**4-Расм. *L. ferriphilum* бактериясининг микроскопик кўриниши [6]**

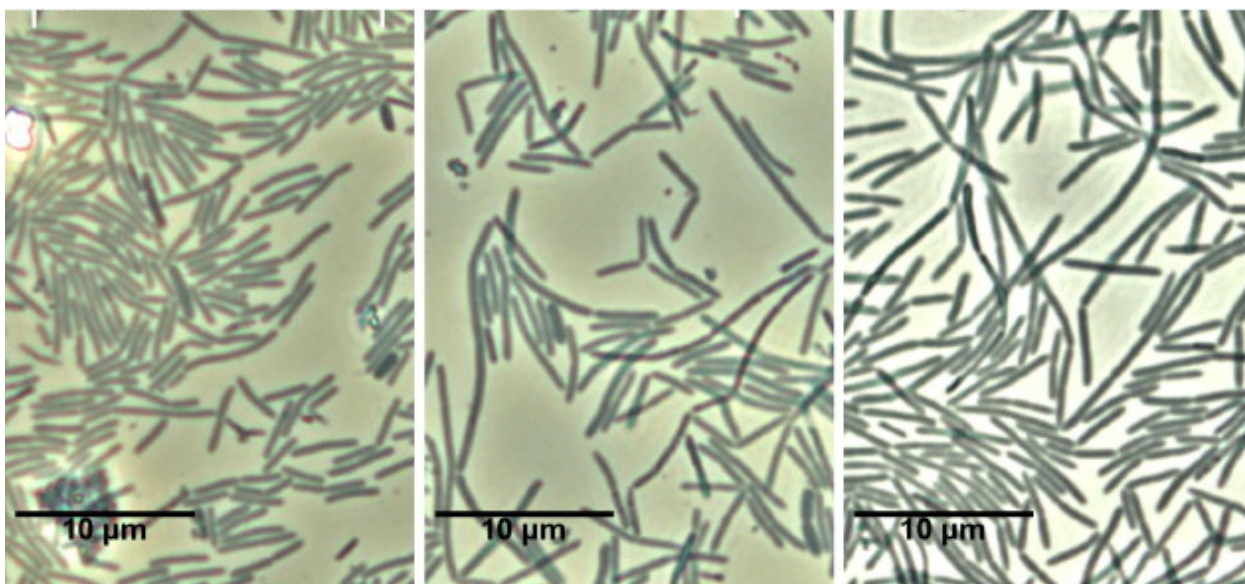
*L. ferriphilum* морфологияси ўзгарувчан бўлса ҳам одатда бу бактериялар узунлиги 0,3 дан 0,9 мкм гача, спирал шаклли ҳужайраларга эга, спираллари 3 дан 12 гача бўлган ҳужайралардан иборат. Махсус метаболитик йўллар, унинг кимёвий-автотрофик ўсишига имкон беради.

Бундан ташқари, бу бактерия мураккаб ҳужайра мембранасига эга бўлиб, ундан ҳужайрада синтез бўлган полимер моддалар, ҳужайра



ташқарисига чикиб туради. Шунингдек, бу бактериялар геномида оғир метал ионларига қаршилик кўрсатадиган оксиллар биосинтезини кодловчи кўплаб генлар мавжуд эканлиги ҳам аниқланган. Кислоталилик ва оксидланиш стресси унинг ўсиш шароитларига мослашишига ёрдам беради [7].

*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* - грамм-мусбат бактерия ҳисобланади. Бу бактерияларнинг оптимал pH кўрсаткичи 2,0 атрофида ва 45 дан 55°C гача бўлган оптимал ўсиш ҳароратига эга муҳитни афзал кўришади. *S. thermosulfidooxidans* бактерия штаммлари темир ва олтингугурт оксидловчи бактериялардир. *S. thermosulfidooxidans* - *Sulfobacillus* туркумидаги бактериялар бўлиб, булар ацидофил, микотрофик, ўртача термофил, споруляция факультатив анаэроблар. Номидан кўриниб турибдики, бу бактериялар олтингугуртни оксидлашга қодир [8].



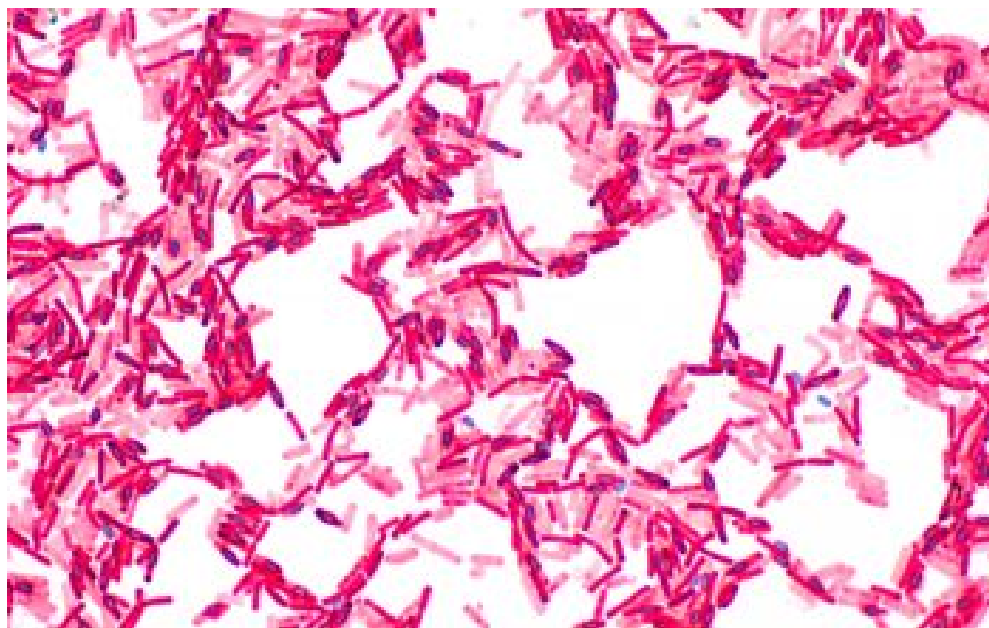
**5-Расм. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* бактериясининг  
микроскопик кўриниши [9]**

*S. thermosulfidooxidans* бактериялари металларни биологик эритиб олиш жараёнида *L. ferrooxidans*, *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* ва бошқа бир қанча бактериялар билан консорциум ҳолатида қўлланилади.



***Bacillus licheniformis*** - таёқча шаклидаги, грамм-мусбат бактерия [10].

Тупрокда споралар ҳосил қилишга мойилдир. Бу бактериядан ферментлар, антибиотиклар ва кичик молекулали метаболитлар ишлаб чиқариш каби саноат мақсадларида фойдаланишга тавсия этилган. Унинг оптимал ўсиш ҳарорати 50°C, лекин бу бактерия анча юқори ҳароратларда ҳам яшаши мумкин. Унинг фермент ҳосил қилиши учун оптимал ҳарорати 37°C га тенг. Ушбу бактерия оғир шароитларда спорага айланиб ҳаётчанлигини сақлаб қолиши мумкин, қулай муҳит ҳолатида бактерия вегетатив ҳолатга қайтади. *B. licheniformis* - одатда тупрокда ва қушларнинг патларида кўпроқ учрайди. Бу бактериялар, чумчуқлар, ўрдакларда ҳам учраб турсада, кўпроқ ерда туришга мойил бўлган қушлар, бу бактериянинг оддий ташувчилари ҳисобланади. Бу бактериялар асосан қушнинг кўкрак қафаси ва орқа анал тешигининг атрофида учрайди.

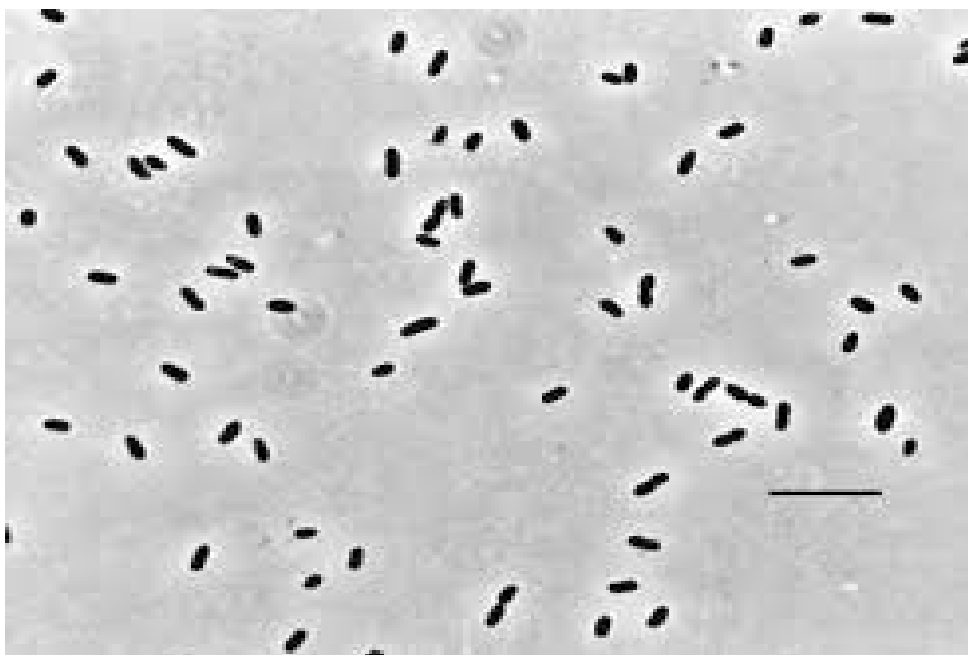


**6-Расм. *Bacillus licheniformis* бактериясининг микроскопик кўриниши**  
(<http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=398>)

*B. licheniformis* бактерияси *B. subtilis* ва *B. pumilus* билан бирга *subtilis* гуруҳига мансуб. Ушбу бактериялар одатда озиқ-овқат маҳсулотларини захарланишига олиб келади.

*B. licheniformis* бактерияси геномининг тўлиқ нуклеотидлар кетма-кетлиги NCBI маълумотлар базасида AE017333 рақами остида келтирилган бўлиб, у 4,222,336 жуфтли асосдан ташкил топган думалоқ хромосомага эга, таркибида 4,208 та тахмин қилинган оқсил кодловчи генлар (ўртача ҳажми 873 жа), 7 рРНА оперонлари ва 72 тРНА генлари мавжуд, G-C таркиби 46,2% ни ташкил қилади ва ДНК плазмидлар аниқланмаган. *B. licheniformis* хромосомаси *B. subtilis* ва *B. halodurans* га ўхшаш катта қисмларга эга [11].

*Acidiphilium multivorum* sp. (таржима қилинганда multus-кўп, varare-ютмоқ, яъни multivorum кўплаб турдаги моддаларни ютиш) [12]. *A. multivorum* бактерияси грамм-манфий, таёқча шаклида (0,5-0,9 дан 1,5-3,8 мкм гача). Колониялар бутун чеккалари билан думалоқ бўлиб, бироз қаварик, силлик, хира ва оч пушти рангга эга.



**7-Расм. *Acidiphilium multivorum* бактериясининг микроскопик кўриниши**

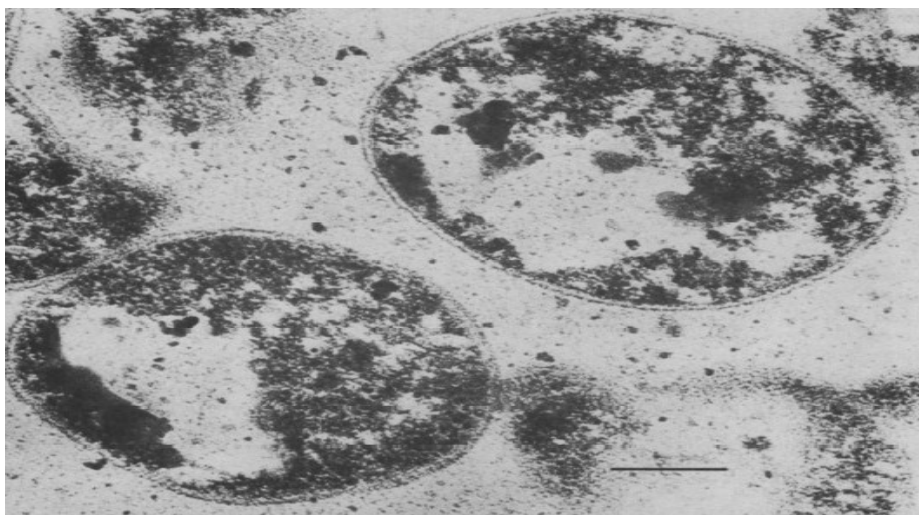
(<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9781118960608.gbm00877>)

Улар муҳитининг pH кўрсаткичи 1,9-5,6 га тенг бўлган шароитда яхши ривожланади. Оптимал ўсиши учун pH муҳити 3,2-4,0 ҳисобланади. Бу

бактериялар 17-42°C гача ўсади, яхши ўсишининг оптимал ҳарорати, 27 дан 35°C гача. Бу бактерияларнинг ўсиши учун 3% натрий хлорид ишлатилади. Азот манбалари сифатида аммиак, нитрат ва карбамиддан фойдаланилади. Ягона углерод ва энергия манбаи сифатида турли хил органик бирикмалардан фойдаланилади.

Юқори концентрацияли глюкоза, соя триптони ва хамиртуруш экстрактларида *A. multivorum* sp. 157 штамлари фаол ўсишини намоён этади. Ягона углерод ва энергия манбаи сифатида бактерияларнинг яхши ривожланиши учун метанол, этанол ва пропанол ишлатилади. *A. multivorum* бактериялари пирит кислота конларининг дренажларида кўпроқ учрайди. *A. multivorum* бактериясининг AIU 301 (JCM 8867), AIU 302 (JCM 8868), AIU 303 (JCM 8869), AIU 304 (JCM 8870), AIU 305 (JCM 8871), ва AIU 306 (JCM 8872) каби штамлари мавжуд.

*Metallosphaera sedula* грамм-мусбат бактерия бўлиб, оддий ва бироз нотекис коллоид хужайралардан иборат [13]. *M. sedula* бактериясининг эни тахминан 0,8 мкм ва узунлиги 1,2 мкм гача бўлади. Бу бактериялар мунтазам равишда жойлаштирилган оқсил бўлинмаларидан ташкил топган хужайра қавати билан ўралган.

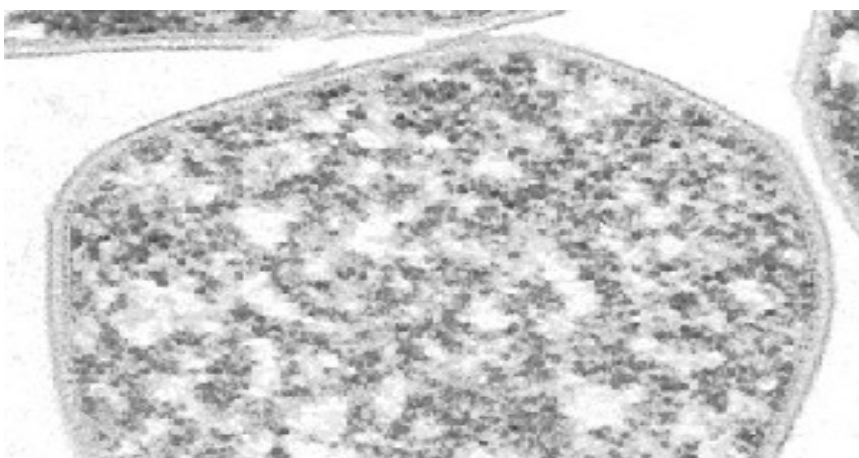


8-Расм. *Metallosphaera sedula* бактериясининг микроскопик кўриниши

([https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:M\\_sedula.jpg](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:M_sedula.jpg))

*Metallosphaera* бактерияларининг ноёб хусусиятларидан бири сульфидли рудалардан металл ионларини ажратиб олади ва олтингургурт кислоталарини ишлаб чиқаради.

*Sulfolobus solfataricus* бактерияси *thermoacidophile* бўлиб, биринчи марта Yellowstone миллий боғидаги олтингургуртга бой бўлган вулкон манбаларидан ажратиб олинган. Бу бактерияларнинг ўсиши учун оптимал ҳарорат 75°C бўлса, *S. solfataricus* бактериялари 55-90°C оралиғида яшаши мумкин. Бу бактериялар ўсишининг pH муҳити даражаси 0,9-5,8 оралиғида. *S. solfataricus* яхши ривожланиши учун оптимал pH муҳит даражаси 2-3 га тенг ҳисоблансада, ўзининг цитоплазмасини pH кўрсаткичини 6,5 да сақлайди. *S. solfataricus* П 2 геномининг нуклеотид кетма-кетлиги 2001 йилда аниқланган бўлиб, унинг таркиби 2992245 нуклеотид жуфтлигини ўз ичига олган битта думалоқ хромосомадан иборат. 2977 та оқсилни кодлайдиган 3032 гени мавжуд. *S. solfataricus* шарсимон шаклга эга.

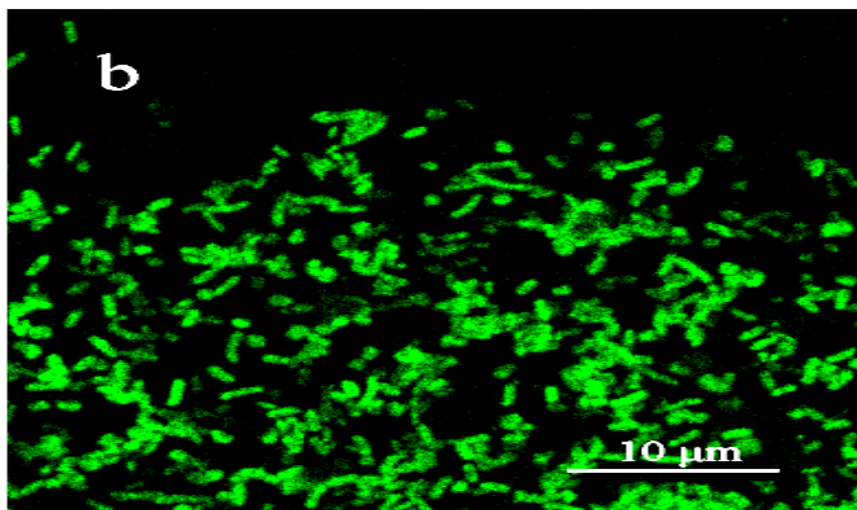


**9-Расм. *S. solfataricus* бактериясининг микроскопик тасвири  
(D.Jankovik ва V.Zilligning)**

**[[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Sulfolobus\\_solfataricus](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Sulfolobus_solfataricus)]**

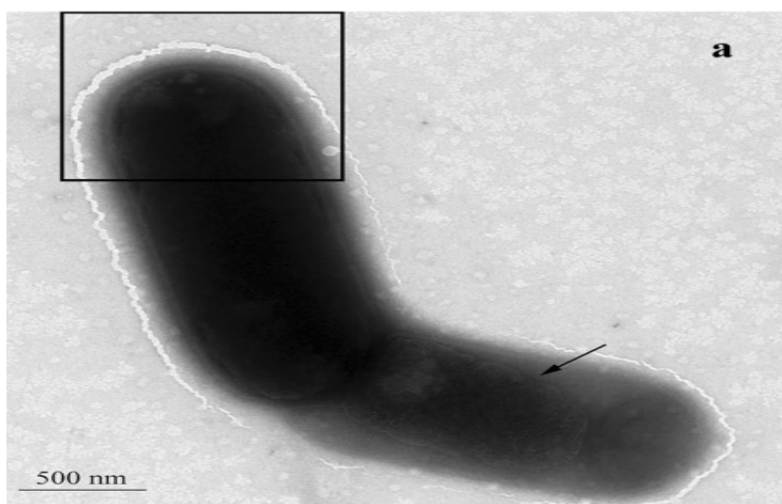
Италиянинг Неапол шимолидаги Солфатара кратеридаги иссиқ лой ҳавзаларида ҳам *S. solfataricus* штаммлари аниқланган. Шунингдек, у Салвадор ва Доминика давлатларида ҳам топилган [14].

*Bacillus paralicheniformis* - Грамм-мусбат, факультатив жихатдан анаэроб, ҳаракатчан, таёқча шаклидаги эндоспора ҳосил қилувчи бактерия ҳисобланади. Диаметри 0,63-0,71 мкм ва узунлиги 1,90-3,94 мкм.



10-Расм. *Bacillus paralicheniformis* бактериясининг микроскопик тасвири [16]

*B. paralicheniformis* бактериясининг 16S рДНК генини филогенетик таҳлили шуни кўрсатадики, бу штамм *Bacillus sonorensis* КСТС-13918Т (99,5%) ва *Bacillus licheniformis* DSM 13Т (99,4%) штаммлари билан ўхшашликка эга.



11-Расм. *B. paralicheniformis* FA6 нинг электрон микроскопик. *B. paralicheniformis* FA6 вегетатив ҳужайраси [16]

Бу штаммни тавсифлашда 15 дан 60°C ҳароратгача ўсиши ва NaCl нинг 10% (w/v) гача чидамли эканлиги аниқланган. Булардан ташқари, ушбу штамм, pH кўрсаткичи 6-11 бўлган озуқа муҳитида ривожлана олади (pH -7,0-8,0 кўрсаткичи оптимал ҳисобланади) [15].

## **II. ҚИММАТБАҲО МЕТАЛЛАРНИ ЭРИТИШДА ИШТИРОК ЭТУВЧИ МИКРООРГАНИЗМЛАРНИ ЎСТИРИШ УЧУН ОПТИМАЛ ОЗУҚА МУҲИТЛАРИ**

**1. 9К озуқа муҳити:** 9К озуқа муҳитини тайёрлашда дастлаб А ва Б эритмалар тайёрлаб олинади [17]. А эритмаси учун (700 мл): 3 г -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /л; 0,5 г -  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ /л; 0,5 г -  $\text{MgSO}_4$ /л; 0,1 г -  $\text{KCl}$ /л; 0,01 г -  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ /л; дистилланган сув 700 мл.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  билан pH кўрсаткичи 5,5 га етказилади ва 120°C ҳароратда автоклавда стерилизация қилинади. Б эритмаси учун (300 мл): 44,7 г -  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /л ва дистилланган сув 300 мл га тайёрланади.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  билан pH кўрсаткичи 1,4 га тўғриланади. Сўнгра А ва Б эритмалар алоҳида-алоҳида автоклав қилинади ва автоклавдан сўнг А ва Б эритмалар аралаштирилади. Озуқа муҳитининг бошланғич pH даражаси 2,0 қилиб белгиланади. Петри лycopчаларига 9К озуқа муҳитига 1% ли агар кукуни қўшиб тайёрланади. Штаммлар 250 мл ҳажмли колбага 100 мл 9К озуқа муҳити солиниб, 30°C ҳароратда 160 айлана/дақиқа тезликда тебратгичга (шейкерга) қўйиб ўстирилади. Инокуляция ҳажми бактериялар стационар кўпайиш фазасига етганда, жами культуранинг 2% (w/v) ни ташкил этади. Озуқа муҳитини узоқ муддатга сақлаш учун қоронғу жойда сақланиши керак.

### **2. *Acidithiobacillus ferrooxidans* бактерияси учун оптимал озуқа муҳити.**

|   |           |
|---|-----------|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                    | 0,4 г     |
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,4 г     |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                | 0,4 г     |
| $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 33,3 г    |
| 0,1 N $\text{H}_2\text{SO}_4$               | 1000,0 мл |

Сульфат кислота ёрдамида рН кўрсаткичи 1,4 га туширилади. 121°C хароратда 15 дақиқа давомида автоклавда стерилизация қилинади.

### **3. *Thiobacillus* бактериялари учун оптимал озуқа муҳити.**

|  |            |
|--|------------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                  | 0,10 г     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                  | 4,00 г     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                  | 4,00 г     |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                              | 0,10 г     |
| CaCl <sub>2</sub>  | 0,10 г     |
| FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                              | 0,02 г     |
| MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O                               | 0,02 г     |
| Agar (қаттиқ озуқа<br>муҳити учун)                               | 12,00 г    |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O | 10,00 г    |
| Дистилланган сув   | 1000,00 мл |

Тиосульфатдан ташқари барча қўшимча моддалар эритиб олинади ва рН кўрсаткичи 6,6 га тенглаштирилади. Сўнгра, пробиркаларга қуйилиб автоклавда стерилизация қилинади. Стерилланган концентрланган эритма тиосульфат қўшилади.

### **4. *Acidithiobacillus* бактериялари учун оптимал озуқа муҳити**

|                                     |             |
|-------------------------------------|-------------|
| NH <sub>4</sub> Cl                  | 0,10 г      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 3,00 г      |
| MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O | 0,10 г      |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O | 0,14 г      |
| Олтингургурт, (кукун)               | 10,00 г     |
| Дистилланган сув                    | 1000,00 мл. |

Озуқа муҳити тайёрлашда олтингургуртдан ташқари барча қўшимча моддалар эритиб олинади ва рН кўрсаткичи 4,2 га тенглаштирилади.



Олтингугуртни стерилизация қилиш учун бурама қопқоқли найчаларга ёки бутилкаларга солинади, бир неча томчи сув билан намланади. Сўнгра, кетма-кет ҳар уч кунда сув ҳаммомида уч соатдан 90 - 100°C гача қиздирилади. Ишлатишдан олдин стерилланган суюқ асосий озуқа муҳити юзасига олтингугуртни ацептик равишда сепилади. Тебратмасдан статик равишда инкубация қилиниши керак.

### ***Sulfobacillus* бактериялари учун озуқа муҳити**

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| А эритмаси | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                     | 3,00 г    |
|            | KCl   | 0,10 г    |
|            | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                     | 0,50 г    |
|            | MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                              | 0,50 г    |
|            | Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                   | 0,01 г    |
|            | Дистилланган сув  | 700,00 мл |
|            | Сульфат кислота ёрдамида рН кўрсаткичи 2,0 – 2,2 га тенглаштирилади |           |
| В эритмаси | FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                              | 44,20 г   |
|            | Дистилланган сув  | 300,00 мл |
|            | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10 N                               | 1,00 мл   |

Филтрлаш орқали стерилизация қилинади ёки темирни оксидланмаслиги учун автоклавдан олдин N<sub>2</sub> (азот газы) остида ушланади.

|            |   |          |
|------------|---|----------|
| С эритмаси | Ачитқи экстракти (1% о/х сувда эритилади) | 20,00 мл |
|------------|---|----------|

Автоклавлангандан сўнг учта (А,В,С.) эритмалар бир-бирига қўшилиб аралаштирилади. Ўртача рН кўрсаткичи 1,9 - 2,4 етказилади.

### ***Leptospirillum* бактериялари учун оптимал озук мухити**

|          |   |          |
|----------|---|----------|
| А эритма | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  | 132,0 мг |
|          | $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$                                 | 53,0 мг  |
|          | $\text{KH}_2\text{PO}_4$  | 27,0 мг  |
|          | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                                 | 147,0 мг |
|          | Дистилланган сув  | 950,0 мг |
|          | 10N $\text{H}_2\text{SO}_4$ билан pH кўрсаткичи<br>1,8 га тенглаштирилади |          |
| В эритма | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                                 | 20,0 г   |
|          | 0.25N $\text{H}_2\text{SO}_4$   | 50,0 мл  |
|          | Эритма pH 1,2   |          |
| С эритма | Микроэлементлар эритмаси<br>(таркиби пастда)                              | 1,00 мл  |

### **Микроэлементлар (С) эритмасини тайёрлаш рецептураси**

|   |           |
|---|-----------|
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 76,0 мг   |
| $\text{ZnCl}_2$                           | 68,0 мг   |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 64,0 мг   |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                   | 31,0 мг   |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4$                 | 10,0 мг   |
| $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 67,0 мг   |
| Дистилланган сув                          | 1000,0 мл |

20 дақиқа давомида 12°C ҳароратда А ва С эритмаларини ва 30 дақиқа давомида 112°C ҳароратда В эритмани автоклавда стерилизация қилинади. Эритмалардан фойдаланишдан олдин, А ва В эритмалари аралаштирилиб, микроэлементлар (С) эритмаси қўшилади. Мухитнинг охирги pH кўрсаткичи 1,8 га тенг бўлиши керак.

Тебратмасдан статик равишда инкубация қилиб ўстирилади [18].

## **II. 1. Нодир ва қимматбаҳо металлари биологик эритиб олиш жараёнига таъсир этувчи омиллар**

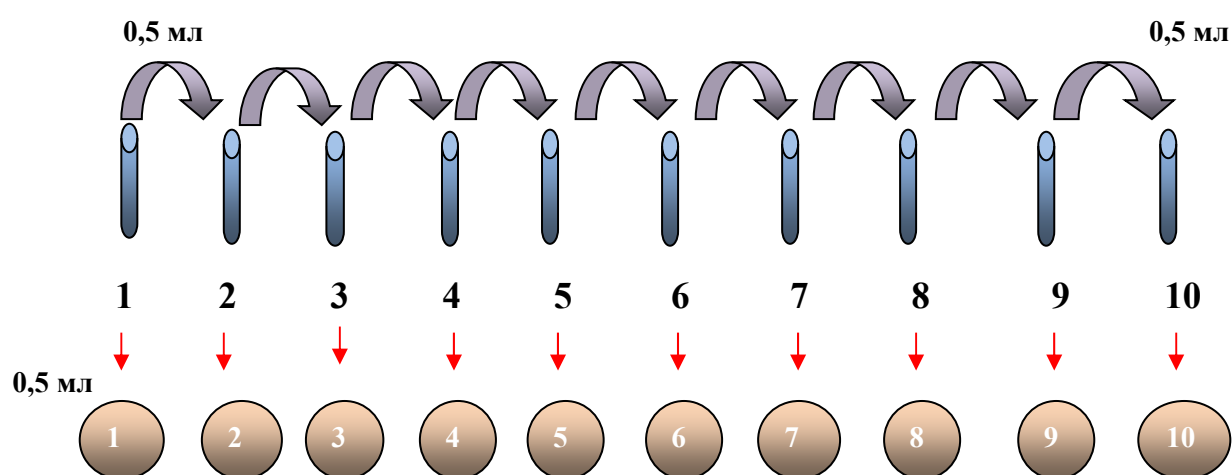
Ҳарорат ва муҳитнинг водород (pH) кўрсаткичлари биологик эритиб олиш жараёнининг энг асосий омилларидан ҳисобланади. Микроорганизмларнинг ўсиши ва фаолияти (биооксидланиш) буткул узилиб қолиши мумкин. Бу омиллар эса микробларнинг ривожланишини ажралмас қисми ҳисобланади [19].

**pH омили.** Биологик эритиб олиш жараёнида иштирок этувчи микроорганизмларнинг фаолияти pH кўрсаткичига қараб ўзгариб туради. *A. ferrooxidans* ва *L. ferrooxidans* ларнинг саноатда энг кўп ишлатилиши ва бунинг асосий сабаби уларнинг оксидланиш потенциали (яъни  $Fe_3^+ / Fe_2^+$  нисбати) билан боғлиқлигидир. *A. ferrooxidans* ларнинг ўсиши ва фаоллиги учун муҳитнинг pH кўрсаткичи, 1,8-2,5 оралиғида оптимал ҳисобланади. *L. ferrooxidans* бактериялари *A. ferrooxidans* ларга қараганда кислоталироқ муҳитга бардошлилик хусусиятига эга ва муҳитнинг pH кўрсаткичи 1-2 бўлганда яхши ривожланади.

**Ҳарорат омили.** *L. ferrooxidans* бактериялари *A. ferrooxidans* ларга қараганда юқори ҳароратга чидамлироқ ҳисобланади. *L. ferrooxidans* бактериялари учун оптимал ҳарорат 45 дан 50°C гача (максимал, 55 дан 60°C гача). *A. ferrooxidans* бактериялари юқори ҳароратга чидамсиздир. *A. ferrooxidans* лар учун оптимал ҳарорат 30-35°C ҳисобланади, ҳамда 10°C да ушбу штаммларни фаолланиши бошланади. Олтинни рудадан ажратиб олиш усуллари ва концентратлар билан ишлашнинг кўп қисми 40°C ҳароратда ва муҳитнинг pH кўрсаткичи 1-6 гача бўлган қийматда амалга оширилади.

### **III. НОДИР ВА ҚИММАТБАҲО МЕТАЛЛАРНИ ЭРИТИШДА ИШТИРОК ЭТУВЧИ МИКРООРГАНИЗМЛАРНИ СУЮЛТИРИШ УСУЛИ БИЛАН МИКРОБИОЛОГИК ТАҲЛИЛ ҚИЛИШ**

Бу усул, микробиологиянинг биотехнологик ҳовузлардаги металлларни эритиб олиш жараёнида иштирок этувчи бактерия штамmlарини тур таркибини ва сонини (титрини) аниқлаш мақсадида қўлланиладиган микробиологиянинг, анъанавий усули ҳисобланади. Бунинг учун очиқ даладаги ҳовузлардан 500 мл ҳажмли колбага 100 мл ҳажмда эритма намунаси олиниб лабораторияга олиб келинади. Суюлтиришдан олдин бўш пробиркаларга 4,5 мл ҳажмда стерил 9К озиқа муҳитидан стерил шароитда пипетка ёрдамида солиб чиқилади. Сўнгра пробиркаларга ҳовуздан олиб келинган намунадан 1- пробиркага 0,5 мл ҳажм олиб қўшилади (1-расм). Натижада намунанинг ҳажми 10 марта суюлади. Кейинчалик 1- пробиркадан 0,5 мл ҳажмда 2- пробиркага, 2 чи пробиркани яхшилаб аралаштириб 3чи пробиркага ва шу каби жараён 10- пробиркагача давом эттирилади. Бу усулни суюлтириш усули деб аталади.



**Петри лископчалари**

**12-Расм. Суюлтириш усули ёрдамида бактерия колонияларини ҳосил қилиш ва сонини аниқлаш**

Сўнгра, 1- пробиркадан бошлаб то 10- пробиркача 0,5 мл ҳажмда намуна олиниб, 9К озиқа муҳитида тайёрланган агар-агарли қаттиқ озиқа муҳитига 3 та (такрор қилиб) Петри ликобчасига солиб шпатель ёрдамида экилади. Петри ликобчасига экилган бактерияларни ривожланишини назорат қилиш учун, уни термостатга 35°C ҳароратда 3 кун давомида ушлаб турилади.

Бактериялар титрини аниқлаш учун суюлтирилган Петри идиши рақамига қараб, қайси суюлтириш даражасида алоҳида колония бўлиб ўсган бўлса шу колониялар саналади. Мисол учун: 6 марта суюлтирилган Петри идишининг 1- такрор Петри ликобчасида 6 та колония саналса, 2-такрорли Петри ликобчасида 13 та колония ўсганлиги аниқланса ва ниҳоят 3-такрорли Петри ликобчасидаги 18 та колония саналадиган бўлса, бу 3 Петри идишидаги жами колониялар қўшилади ва ўртачасини топиш учун 3 га бўлинади. Ҳисобланган 12,3 сонидан кейин 6 марта суюлтирилган эритмадаги бактериялар сони ҳисобга олиб  $10^6$  сони ёзилади. Бунда чиққан сон  $12,3 \cdot 10^6$  ёки  $1,23 \cdot 10^7$  бўлади. Бу сон бактериянинг 2 марта 0,5 мл ҳажмда суюлтирилганини ҳисобга олиб, 1 мл миқдорини топиш учун 4 га кўпайтирилади ва бактериянинг 1 мл даги сони  $4,92 \cdot 10^7$  эканлиги белгиланади. Шу билан бир вақтнинг ўзида, алоҳида бўлган колониялардан суртмалар олиб микроскоп ёрдамида бактерия штаммларининг морфологияси бўйича тур таҳлили амалга оширилади.

#### **IV. БАКТЕРИЯЛАРДАН ДНК АЖРАТИБ ОЛИШ УСУЛЛАРИ**

##### **IV. 1. ДНК ажратиб олиш учун керак бўладиган умумий реактивлар рўйхати**

1. СУЮҚ АЗОТ;
2. СТАВ (Hexadecy trimethy-ammonium bromide);
3. ТРИС (трис (гидроксиметил) аминометана) - асосий;
4. ЭДТА (Этилендиаминтетрасирка кислотаси);
5. ХЛОРОФОРМ;

6. ИЗОАМИЛ СПИРТИ;
7. ИЗОПРОПАНОЛ;
8. 96% ЛИ ЭТАНОЛ;
9. АГАРОЗА;
10. ЭТИДИУМ БРОМИД;
11. КСИЛЕНЦИАНОЛ;
- 12.30% ЛИ ГЛИЦЕРИН;
13. БРОМ-ФЕНОЛ КЎК;
14. RNK-аза ФЕРМЕНТИ;
15. ПРОТЕНАЗА К ФЕРМЕНТИ;
16. SDS (Sodium dodecyl sulfate-додецил сульфат натрий);
17. ЛИЗОЦИМ (ферменти);
18. ДНК га мухтож ДНК полимераза ферменти (Taq, Pfu, Fusion polymerase);
19. Глюкоза;

#### **IV. 2. СТАБ усули орқали бактериялардан ДНК ажратиш**

Фойдаланиладиган реактивлар [20]:

1. Суюқ азот;
2. 2х СТАБ экстракция буфери;
3. 10х СТАБ\NaCl буфери;
4. Чўктирувчи СТАБ буфер;
5. 24:1 нисбатдаги хлороформ\изоамил спирт аралашмаси;
6. High-salt TE буфер;
7. Изопропанол спирти;
8. 70 % ли этанол;
9. TE (10:1 mM) буфери.

#### **2х СТАБ экстракция буфери:**

**300 мл**

100 mM Трис pH-8,0;

1M Трис pH-8,0 30 мл

200 mM ЭДТА pH-8,0;

0,5 M ЭДТА pH-8,0 12мл

|             |      |           |
|-------------|------|-----------|
| 1,4 M NaCl; | NaCl | 24,5448 г |
| 2% СТАБ     | СТАБ | 6 г       |

|                             |               |       |
|-----------------------------|---------------|-------|
| <b>10x СТАБ\NaCl буфери</b> | <b>100 мл</b> |       |
| 0,7M NaCl;                  | NaCl          | 4,1 г |
| 10 % СТАБ;                  | СТАБ          | 10 г  |

|                               |                   |      |
|-------------------------------|-------------------|------|
| <b>Чўктирувчи СТАБ буфери</b> | <b>100 мл</b>     |      |
| 50 mM Трис pH-8,0;            | 1M Трис pH-8,0    | 5 мл |
| 10 mM ЭДТА pH-8,0;            | 0,5 M ЭДТА pH-8,0 | 2 мл |
| 2% СТАБ                       | СТАБ              | 1 г  |

|                             |                   |         |
|-----------------------------|-------------------|---------|
| <b>High-salt ТЭ буфери;</b> | <b>200 мл</b>     |         |
| 10 mM Трис pH-8,0;          | 1M Трис pH-8,0    | 2 мл    |
| 0,1mM ЭДТА pH-8,0;          | 0,5 M ЭДТА pH-8,0 | 40 мл   |
| 1M NaCl;                    | NaCl              | 11,68 г |

|                            |                   |        |
|----------------------------|-------------------|--------|
| <b>TE (10:1 mM) буфери</b> | <b>50 мл</b>      |        |
| 10 mM Трис pH-8,0;         | 1M Трис pH-8,0    | 0,5 мл |
| 1mM ЭДТА pH-8,0;           | 0,5 M ЭДТА pH-8,0 | 0,1 мл |

### **Ишнинг бажарилиши:**

1. Пробиркадаги ўсган културадан 2 мл пластик пробиркага солинади ва 5 дақиқада 13000 айланма/дақиқа тезликда центрифугаланади, чўкма устидаги суюқлик тўкиб ташланади ва чўкмага 1,5 мл стерил дистилланган сув солиниб, яхшилаб аралаштирилади ва яна юқоридагидек, центрифуга қилиниб сув билан ювилади. Стерил дистилланган сув билан ювиш ишлари 3 марта такрорланади. Сув билан ювиш натижасида озиқа муҳит қолдиқлари ва бактерия томонидан синтез қилинган баъзи моддалардан холос бўлинади.



2. 2 мл ли пробиркага 2х СТАБ экстракция буферидан 750 мкл пробиркага солинади ва вортексда аралаштирилиб 30-40 дақиқа давомида 65°C ли ҳароратда инкубацияланади (вақти-вақти билан вортексда аралаштирилиб турилади).

3. Пробиркадаги намуна устига тенг ҳажмда (750 мкл) 24:1 нисбатдаги хлороформ/изоамил спирт аралашмаси солинади ва у 5 дақиқа давомида қўл ёрдамида яхшилаб аралаштирилади. Сўнгра 5 дақиқа давомида 10000 айланма/дақиқада центрифугаланади.

4. Янги 2 мл ли пластик пробиркага суюқ фазали юқори қисми ўлчаб олинади (600 мкл) ва устига 0,1 ҳажмда (60 мкл) 65°C ли ҳароратдаги 10х СТАБ экстракция буфери солинади ва у 5 дақиқа давомида аралаштирилади. Сўнгра тенг ҳажмда (660 мкл) 24:1 нисбатдаги хлороформ/изоамил спирт аралашмаси қўшилади ва 2 дақиқа давомида вортексда аралаштирилиб, 5 дақиқа давомида 10000 ай/дақ центрифугаланади.

5. Янги пробиркага чўкмани суюқ фазали юқори қисми ўлчаб олинади (500 мкл) ва унга тенг ҳажмда чўктирувчи СТАБ буфери солинади ва 5 дақиқа давомида ДНК чўкиши учун қўйилади ва 3 дақиқага 14000 ай/дақ центрифугада чўктирилади.

6. Пробирканинг суюқ қисми тўкиб ташланиб, унга 500 мкл High-salt TE буфери қўшилади (ДНК чўкмаган ҳолларда 25 дақиқа давомида 65°C ли ҳароратда инкубация қилинади) шу тариқа ДНК эригунча давом эттирилади.

7. Пробиркадаги намунага 0,6 ҳажмда (300 мкл) изопропанол спирти қўшилади ва 5 дақиқа давомида хона ҳароратида ДНК чўкиши учун қўйилади. Сўнгра 15 дақиқа давомида 14000 ай/дақ центрифугада чўктирилади.

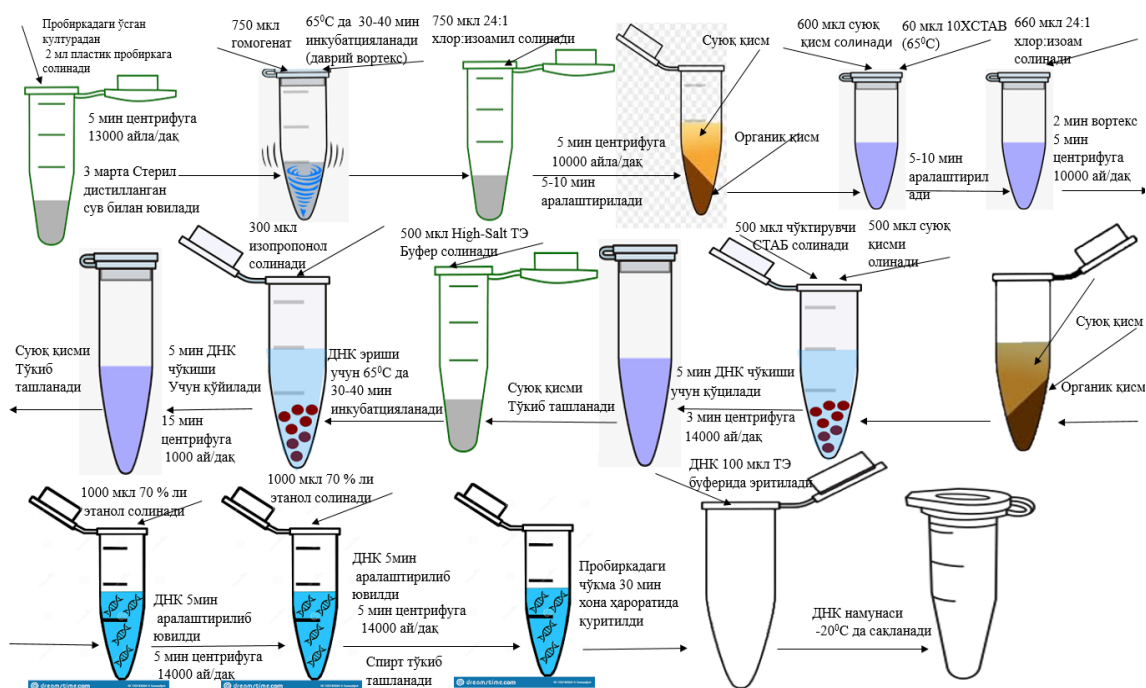
8. Суюқ қисми тўкиб ташланиб, унга 1 мл 70% ли этанол қўшилади ва пробиркадаги ДНК 5 дақиқа давомида секин аралаштириб ювилади. Сўнгра 5 дақиқа давомида 14.000 ай/дақ чўктирилади ва спирт тўкиб ташланади.

9. 8 - босқич яна бир маротаба такрорланади.

10. Чўкма 30-60 дақиқа давомида хона ҳароратида қуритилади.

11. Пробиркадаги ДНК чўкмаси 100 мкл TE (10:1) буфериди эритилади.

12. ДНК намуналари -20°C ҳароратда музхонада сақланади.



**13 -Расм. Бактериялардан ДНК ажратиш олиш схемаси**

#### **IV. 3. Бактерия ҳужайраларини модификацияланган фенолли оксилсизлантириш усули ёрдамида умумий ДНК ажратиш усули (Маниатис бўйича)**

Фойдаланиладиган реактивлар:

1. Трис-НСl - 2 М (рН-8,0);
2. ЭДТА -0,5 М (рН-8,0);
3. Глюкоза 2 М;
4. Лизоцим (ферменти) ;
5. SDS - 20%;
6. Протеиназа К - 10 мг/мл;
7. Натрий ацетат – 3 М рН-5,3;
8. 1 М ли (рН-8,0) Трис-НСl билан тўйинтирилган фенол эритмаси;
9. 24:1 нисбатдаги хлороформ\изоамил спирт аралашмаси;
10. Трис-НСl (1 М, рН-8,0) билан тўйинтирилган фенол эритмаси;
11. 96% ли этанол;
12. TE (10:1 мМ) буфери.

### **Ишнинг бажарилиши:**

1. 1.5 мл пластик пробиркага колбада оптимал муҳит ва шароитларда ўстирилган културадан 1 мл солинади ва 5 дақиқада 13000 ай/дақ тезликда центрифугада чўктирилади, ортиқча суюқлик тўкиб ташланиб, шу иш яна такрорланади (агарда култура биомассаси кам бўлган ҳолатда) ва дозатор ёрдамида тепа суюқлик қисми олиб ташланади. Сўнгра чўкмага стерил дистилланган 1 мл сув солиниб яхшилаб аралаштириб, яна юқоридагидек центрифуга қилиниб сув билан ювилади. Стерил дистилланган сув билан ювиш ишлари 3 марта такрорланади. Сув билан ювиш натижасида озиқа муҳит қолдиқлари ва бактерия томонидан ишлаб чиқарилган баъзи моддалардан холи бўлинади.

2. Кейин устига глюкоза эритмаси (50 mM): трис (25 mM, pH-8,0): ЭДТА (10 mM pH-8,0) буферидан 500 мкл солинади ва 10 сония давомида вортексда айлантрилади. Сўнгра, унинг устига охириги концентрацияси 2 мкг/мл микдорда лизоцим ферменти қўшилади ва 15 дақиқа музга қўйилади.

3. Сўнгра устига охириги концентрацияси 2% ли бўлган SDS эритмасидан солинади ва яхшилаб қўл билан яхшилаб чайқатилади. Кейин устига Протеназа К ферментидан охириги концентрацияси 0,2 мг/мл солиниб, термостатга 65°C га 30 дақиқага қўйилади.

4. Кейин унинг устига охириги концентрацияси 0,3 M бўлган натрий ацетат pH-5,3 эритмадан қўшилади ва бироз чайқатилиб муз (+4°C) га 30 дақиқага қўйилади.

5. Сўнгра 13000 ай/дақ тезликда 10 дақиқа давомида центрифугада чўктирилади.

6. Пробирканинг устки қисми янги пластик пробиркага ўтказилади ва унинг устига трис-HCl (1 M, pH-8,0) билан тўйинтририлган фенол эритмасидан тенг ҳажмда қўшилади ва қўл ёрдамида 3-4 дақиқа аралаштрилади. Аралашма 13000 ай/дақ тезликда 10 дақиқа центрифугаланади. Аралашма 2 фазага ажралгандан сўнг унинг юқори қисми янги пластик пробиркага олинади.

7. 6 -жараён яна бир марта такрорланади.

8. Устки қисми янги пластик пробиркага ўлчанган ҳолда эҳтиёткорлик билан олинади ва суюқликка тенг миқдорда хлороформ/изоамил спиртидан (24:1) қўшилади. 3-4 дақиқа қўл ёрдамида аралаштирилиб, 13000 ай/дақ тезликда 10 дақиқа центрифуга қилинади. Аралашма 2 фазага ажралгандан сўнг унинг юқори қисми янги пластик пробиркага олинади.

9. 8 -жараён яна бир марта такрорланади.

10. Устки қисми янги пластик пробиркага ўлчаган ҳолда эҳтиёткорлик билан олинади ва устига охириги концентрацияси 0,3 М бўлган натрий ацетат pH-5,3 эритмасидан солинади ва 30 дақиқа музга қўйилади.

11. Сўнггра 13000 ай/дақ тезликда 10 дақиқа давомидида центрифугада чўктирилади.

12. Пробирканинг устки қисми тоза пробиркага олиниб, устига 2,5 баробар кўп ҳажмда 96% ли этанол спиртидан қўшилади ва -20°C га музлаткичга 1 суткага қўйилади.

13. Музлаткичдан олиниб 13000 ай/дақ тезликда 10 дақиқа центрифуга қилиниб, устки супернатант қисми тўкиб ташланади.

14. Кейин устига 100 мкл ТЕ буферидан солиб эритилади ва -20°C ҳароратда сақланади.

## **V. ПОЛИМЕРАЗА ЗАНЖИР РЕАКЦИЯСИ (ПЗР) УСУЛИ ЁРДАМИДА БАКТЕРИЯЛАРНИ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ҚИЛИШ**

Полимераза занжир реакцияси (ПЗР) усули, ажратиб олинган ген ёки ДНК қисмларини махсус праймерлар ёрдамида кўпайтириш учун амалга оширилади. Полимераза занжирли реакция қурилмаси термоциклер, ПЗР машинаси ёки ДНК амплификатори ҳам деб аталади. ПЗР - молекуляр-биологиянинг сезгирлиги энг юқори бўлган экспериментал усулларида бўлиб, у биологик намуналардаги нуклеин кислоталарнинг маълум бир фрагментларини бир неча баробар миқдорда кўпайтириш (клонлаш) усули ҳисобланади. ДНК матрица - анализ қилинаётган ДНК бўлаги. Оптимал

матрица бўлиб, музлатилмаган фақат 1 ой +4°C да сақланган матрица ҳисобланади. ДНК молекуласи парчаланиб кетмаслиги учун бир неча марта музлатиб ва яна қайтиб эритиш мумкин эмас.

**Полимераза занжир реакциясининг бошқа усуллардан афзаллиги:**

- Универсаллиги: ПЗР ёрдамида ҳар қандай биологик намунадаги ДНК ни аниқлаш мумкин;

- Максимал даражадаги сезгирликка эришиш имконини берувчи тўғри усул;

- Усулнинг ўзига хослиги (спецификлиги) 100% га яқин;

- Ҳар қандай материални ПЗР - анализ қилиш имкони мавжуд;

- Бу усул ёрдамида намунадаги ДНК нусхалар сонини назорат қилиш ва динамикани кузатиш мумкин;

- Усулни бажариш оддий ва уни тўлиқ автоматик тизимлаштириш мумкин;

- Натижалар бир неча соатлардан кейин олинади, яъни бир иш кунида.

Мана шу босқичларнинг ҳар бири 25-40 мартаба такрорланиб, ПЗР циклини ҳосил қилади. Биринчи ва қисман иккинчи циклларда нусхалар (ампликонлар) ҳосил бўлади, улар амплификацияланаётган генга мос тушмаслиги мумкин, сабаби занжир узунлигини чегаралайдиган иккинчи праймернинг ҳали жойлашиб олмаганлиги туфайли. Учинчи циклдан бошлаб ампликонлар узунлиги стандарт бўлади. Бу жараён занжирли ҳарактерга эга, яъни синтезланган ампликонлар келгусида матрица вазифасини бажаради. Геометрик прогрессия усулида ампликонлар йиғилиб боради. Уни қуйидаги формула ёрдамида аниқлаш мумкин:  $P=2^n$ , бу ерда  $P$  - ҳосил бўлган специфик маҳсулот миқдори,  $n$  - реакциядаги цикллар сони.

**Праймер дизайни** - праймер танлашда праймерлар ДНК - матричасига комплементар бўлиши керак. Бунинг учун ДНК нуклеотидлар кетма-кетлигини билиш талаб этилади. Буни билиш учун эса халқаро генбанкка мурожаат қилинади, яъни NCBI маълумотлар базасининг [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) сайтидан

керакли бактерия генининг нуклеотидлар кетма-кетлиги аниқлаб олинади. Мисол учун: *Acidithiobacillus ferrooxidans* бактерияси геном ДНК сининг 16S рДНК си гени нуклеотидлар кетма-кетлиги. Мақсаддаги бактериянинг нуклеотидлар кетма-кетлиги аниқлаб олингандан сўнг, PRIMER 3 INPUT программаси орқали керакли праймерлар мақсаддаги генга комплементар равишда автоматик тарзда дизайн қилинади. ПЗР қилинаётган фрагмент узунлиги 100-3000 ж.н. гача оралиқда бўлиши лозим. PRIMER 3 INPUT программаси орқали дизайн қилишнинг ўзига хос бир қанча афзалликлари мавжуд:

- керакли миқдорда нуклеотидлардан олигонуклеотидларни ҳосил қилиши;
- генга комплементар праймерларнинг ҳар томонлама қулай дизайн қилиниши;
- G - C ларни автоматик ҳисоблаш орқали Праймерлар уланиши (отжиг) босқичи учун ҳароратни белгилаб бериши.

**ПЗР сани бажариш учун асосан 3 та босқичда амалга оширилади:**

1. Денатурация (парчалаш-ажратиш);
2. Праймерлар уланиши (отжиг);
3. Элонгация (узайтириш).

**1. Денатурация** (парчалаш-ажратиш) - қўш спиралнинг бир-биридан ажралиши ва полинуклеотид занжирнинг ҳосил бўлишидир. Бунда реакцион аралашма 94-98°C гача қиздирилади, натижада қўш занжирли ДНК молекуласи иккига ажралиб, иккита бир-бирига комплементар бўлган занжирли молекула ҳосил бўлади. Геном ёки плазмид ДНК денатурацияси 2-3 дақиқа ичида амалга оширилиши тавсия этилади.

**2. Праймерлар уланиши (отжиг)** - праймер ва бир занжирли ДНК - нишоннинг комплекс ҳосил бўлиши (гибридизацияси). ДНК синтези учун мономер бўлиб дезоксирибонуклеотидтрифосфат зарур бўлади. Уланишнинг оптимал ҳарорати 40-72°C оралиғида бўлиши керак. Баъзи ҳолларда уланиш

хароратини одатдагидан 3-5°C га кўтариш реакция спецификлигини ошириши мумкин. Праймерлар уланиш хароратини паст даражага туширилса ПЗР маҳсулотининг спецификлик миқдори камайиши мумкин.

**3. Элонгация (полимеризация ёки узайтириш)** - ДНК-матрица синтези ҳисобланади, яъни ДНК-матрицага келиб ўтирган праймернинг 3'-ОХ учидан бошлаб 3'-5' йўналиши бўйича ДНК полимераза ферменти ёрдамида ДНК га комплементар бўлган занжирнинг ҳосил бўлишидир. Элонгация кўп ҳолларда 72°C хароратда олиб борилади. Элонгация вақти ДНК-матрица узунлигига боғлиқ (1 дақиқада 1-1.5 минг ж.н.). ПЗР маҳсулоти унумли чиқиши учун ПЗР нинг охириги циклида (Final) элонгация билан тугатиш тавсия этилади.

*Acidithiobacillus ferrooxidans* ва *Leptospirillum ferrooxidans* ларнинг 16S рДНК амплификацияси учун қуйидаги праймерлардан фойдаланилади [21]:

***A. Ferrooxidans,***

Forward (олдинга) 1\_Thio (Sense) ATGCGTAGGTCTGTCTTT

Reverse (орқага) 1\_Thio (Antisense) CGACTTAACCCAACATCTCA

***L. Ferrooxidans,***

Forward (олдинга) 1\_Lepto (Sense) GGGTGAGTAATACATGGGGTG

Reverse (орқага) 1\_Lepto (Antisense) AACTTGTCGCTGGCAGTC

Булардан ташқари, юқоридаги 2 та авлод бактерияларини идентификация қилиш учун умумий универсал праймерлардан фойдаланиб ПЗР амплификациясини амалга ошириш мумкин.

***Универсал праймерлар,***

341 F (Sense) CCTACGGGAGGCAGCAG

1100 R (Antisense) GGGTTGCGCTCGTTG

*Acidithiobacillus ferrooxidans* ва *Leptospirillum ferrooxidans*лар учун ПЗР реакциясида фойдаланилган махсус праймерлар Ribosomal Database Project II (RDPII) фойдаланиб дизайн қилинади (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).



16S рДНК генларининг 1472 бп нуклеотидлар кетма-кетлигини қиёсий филогенетик таҳлиллари асосида НТ-4 штамм *Sulfobacillus termosulfidooxidans* деб таснифланди. *S. termosulfidooxidans* 16s рДНК генининг кетма-кетлигини ПЗР амплификация қилиш учун қуйидаги праймерлар қўлланилади:

11 F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'),

519 R (5' GTATTACCGCGG CTGCTG 3') [22].

*Bacillus licheniformis* бактериясининг ПЗР амплификациясини амалга оширишда 16S рДНК генини секвенси учун қуйидаги универсал праймерлар қўлланилади [23]:

16S F: GAGTTTGATCCTGGCTCAG

16S R: AGAAAGGAGGTATCCAG CC

*Acidiphilium* 16S рДНК генини ПЗР амплификацияси учун (Т-Gradient Thermoblock, Biometra) универсал праймерлардан фойдаланилади:

27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') [24].

Универсал бактериал праймерларни қўллаган ҳолда *Acidithiobacillus ferrooxidans* штаммларининг геном ДНК си 16S рДНК гени амплификацияси амалга оширилади.

F 27 (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3')

R 1492 (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3') [25].

Roberto A. Bobadilla Fazzin ва бошқа олимлар *A. thiooxidans* бактериясининг 16S рДНК ва *rusB* генлари устида молекуляр биологик тадқиқот ишлари олиб боришган. Умумий бактериялар учун сақланиб қолинган 16S рДНК қарши йўналтирилган праймерлар:

Forward 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3',

Reverse 5 ' CCGTCAATTCCTTTAGAGTT-3'),

rusticyanin гени rusB *A. ferrooxidans* DSM 16786 учун

Forward 5'-GGACACCACCTGGAAAAC-3',

Reverse 5'- TCCCTTGTTGGTGTGATG-3'

*A. thiooxidans* DSM 17318 16S рДНК гени учун

Forward 5'-ТААТАТСГССТГСТГТТГАС-3',

Reverse 5'-TTTCACGACAGACCTAATG-3'

Бачаси Biosigma S.A. томонидан патентланган. Биологик эритиш жараёнида қатнашадиган микроорганизмларни идентификация қилиш ва миқдорий таҳлил учун фойдаланиш мумкин (патент учун ариза № CL 0660-2007) [26].

**ПЗР усулини амалга ошириш учун қуйидаги таркибий қисмлар ишлатилади:**

| Таркибий қисмлар   | Миқдори, µL,<br>1 реакция учун (50мкл) |
|--|--|
| ДНК матрица  | 1                                      |
| Праймерлар: Forward  | 3                                      |
| Праймерлар: Reverse  | 3                                      |
| ДНК полимераза (Тақ полимераза-5U)                                   | 1                                      |
| 10 мМ<br>Дезоксрибонуклеозидтрифосфатлар<br>(dATP, dGDP, dCTP, dTTP) | 3                                      |
| 10 x PCR Buffer  | 5                                      |
| steril H2O   | 33                                     |
| BSA  | 1                                      |
| ЖАМИ   | 50                                     |

*Acidithiobacillus ferrooxidans* ва *Leptospirillum ferrooxidans* ларнинг 16S рДНК амплификациясини ПЗР ёрдамида амалга ошириш, қуйидаги дастур асосида амалга оширилади:

1. 94°C - 3 дақиқа.
2. 94°C - 45 сония.
3. 55°C - 30 сония.
4. 72°C - 1 дақиқа.
5. 72°C - 10 дақиқа.
6. +4°C - ∞ дақиқа.



35 марта қайталанадиган босқич ( цикл)

Бу ПЗР дастурлаш тизими қуйида келтирилган барча бактерияларнинг 16S рДНК генининг амплификацияси учун тавсия этилади.

**ПЗР Master Mix** - бу ПЗР таҳлилини ўтказиш учун зарур бўлган таркибий қисмларнинг кўп қисмини ўз ичига олган, олдиндан тайёрланган эритма. Аралаш таркибида Тақ ДНК полимераза, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, шунингдек, ПЗР ёрдамида ДНК ни кучайтириш учун оптималлаштирилган буфердаги кучайтиргичлар ва стабилизаторлар мавжуд. ПЗР Master Mix -дан фойдаланишнинг афзалликлари унинг қулайлиги ва вақтнинг кам талаб қилинишидир. Компонентларнинг аксарияти аллақачон қўшилган ва формуласи аллақачон оптималлаштирилган, шунинг учун таҳлилга тайёргарлик вақтини сезиларли даражада қисқартиради.



**14- Расм. Bio-Rad компаниясининг T100 Thermal Cycler ПЗР амплификатори**

Асосий ПЗР аралашмаларидан фойдаланиш, ҳатто юқори ҳажмли таҳлил муҳотида ҳам юқори даражадаги самарадорликни таъминлайди ва камроқ пипетка босқичлари, шунингдек, ифлосланиш учун имкониятларнинг камлигини англатади. ПЗР мастер аралашмасидан фойдаланиш, шунингдек, компонентларни қўшилишида тасодифан эсдан чиқариб юбориш каби хатолик эҳтимолини камайтиради.

Умумий ПЗР Master Mix тайёрланиши:

| Ҳажми           | Таркиби                          | Сўнги концентрацияси      |
|-----------------|----------------------------------|---------------------------|
| 5 $\mu$ L       | 10X PCR Buffer                   | 1X                        |
| 1 $\mu$ L       | dNTPs (10 mM)                    | 200 $\mu$ M               |
| 1 - 2 $\mu$ L   | Forward primer                   | 50 - 100 pmol             |
| 1 - 2 $\mu$ L   | Reverse primer                   | 50 - 100 pmol             |
| 0.5 - 1 $\mu$ L | Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ L) | 2.5 - 5 U                 |
| 1 - 5 $\mu$ L   | Template DNA                     | 1 - 200 ng                |
| 1 $\mu$ L       | MgCl <sub>2</sub> (50 mM)        | 1 mM                      |
| Ўзгарувчан      | Сув                              | Add to q.s. to 50 $\mu$ L |
| 50 $\mu$ L      | Жами ҳажми                       |                           |

### ПЗР Master Mix компонентлари

Фермент

Буфер (лар)

Кофактор – Магний хлорид (MgCl<sub>2</sub>), энг кенг тарқалган. Баъзида MgSO<sub>4</sub> маълум ферментлар билан ишлатилади.

dNTP

Праймерлар

ДНК намунаси (агар барча намуналар бир хил бўлса)

Нуклеаза ёки ПЗР даражасидаги сув.

## **VI. ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ УСУЛИНИ АМАЛГА ОШИРИШ**

Мазкур усул ёрдамида биологик намуналардан ажратилган ДНК ни детекция қилиш ва ПЗР маҳсулотининг нуклеотидлар кетма-кетлиги сонини аниқлаш учун қўлланилади. Геном ДНК сани детекция қилишда 1-0,8% ли агароза гели ишлатилади. ПЗР маҳсулотининг нуклеотидлар сонини аниқлаш учун ПЗР фрагменти узунлигига қараб, 1-3% гача бўлган агароза гелидан фойдаланилади.

### **Асосий қисмлар:**

1. Электрофорез камераси;
2. Электр қувват манбаи;
3. Гелни қуйиш учун пластинка.

### **Фойдаланиладиган реактивлар:**

1. Агароза;
2. 0.5x ТБЕ буфери ёки 1xТАЕ (Трис: Сирка кислотаси: ЭДТА) буфери;
3. Этидиум бромид;
4. Бром-фенол кўк бўёғи;
5. Ксиленцианол;
6. 30% ли глицерин;
7. ДНК намунаси;
8. Деионлаштирилган ёки дистилланган стерил сув.

### **Қўшимча керак бўладиган ускуналар:**

1. Микротўлқинли иситгич;
2. Автопипетка;
3. Тарози;
4. Транслюминатор (Гелларни хужжатлаштирадиган тизим, WiseDoc);
5. Колбалар.



**15-Расм. Гель-электрофорез ускунаси ва унинг асосий жихозлари  
(Ишлаб чиқарувчи: Edvotek™ 5063)**

**Ишнинг бажарилиши:**

1. Энг аввало 100 мл 1% ли агароза гелини тайёрлаб олинади. Бунинг учун тарозида 1 г агарозани тортиб олиб, 100 мл 1x TAE буфер билан аралаштириб олинади. Колбани устига 1% агароза деб ёзиб қўйилади.

2. Сўнгра микротўлқинли иситгичда эритилади ва совутилиб 40°C бўлганида унга автопипеткада тортиб олинган 7 мкл этидиум бромид солинади. Хона температурасида бироз совутилади.

3. Тайёр бўлган агароза гелини пластинкага қўйилади. Чуқурчалар ҳосил бўлиши учун ўзининг махсус пластик қовурғалари ўрнатилади. Гел қотгунича кутилади. Қотгандан сўнг пластик қовурғалар олиб ташланди ва чуқурчалар (қудукчалар) ҳосил бўлади. Қовурғалар ёпишмаслиги ва осон кўчиши учун пипеткада озгина буфер қўйилади.

4. Пластинкада қотган агарозани пластинкаси билан олиб электрофорез камерасига қўйилади. Камерани ичи TAE буфери билан тўлдирилган бўлади ва чуқурчалар тўлиқ қопланиши керак.

5. Гелга наmunани солиш учун бўёқ тайёрлаб олинади. Энди шиша ойначанинг устига автопипетка ёрдамида сал аввал тайёрланган бўёқдан 3 мкл олиб ойна устига томчилаб солинади.

6. Сўнг олдиндан ажратиб олинган, музлатгичда  $-20^{\circ}\text{C}$  ли ҳароратда сақланаётган ДНК намунаси керакли ҳажмда пробиркалардан автопипетка ёрдамида олинади. Ойначанинг устидаги томчиларни устига қуйиб аралаштирилади. Аралаштириш ҳолати 2-3 марта қайтарилади, сўнг камерадаги чуқурчаларга намуналар тартиби бўйича солинади. Таркибида глицерин бўлганлиги сабабли томчи намуналар ўзи сирғалиб чуқурчаларга жойлашиб олади.

7. Камерани қопқоғи ёпилади, электр симлари зарядига мос равишда тўғрилаб уланади ва қувват манбаи ёкилади. Гель-электрофорез усулида геном ДНК сини детекция қилиш учун 120 Вт ли электр зарядида 30 дақиқа мобайнида бажарилса, ПЗР маҳсулотини нуклеотидлар сонини аниқлаш учун 120 Вт ли электр токи таъсирида 40 дақиқа давомида амалга оширилади.

8. Гелда қисқа ДНК бўлаги, катта ДНК бўлагига нисбатан тезроқ ҳаракат қилади. Натижани кўриш учун электр қувват манбаи ўчирилади ва эҳтиёткорлик билан қўлқоплар ёрдамида гель олинади. Устидаги буфер тўкилади ва трансиллюминатор пластинкаси гелнинг ўзи қўйилади.

9. Трансиллюминатор ультрабинафша нурлари ёрдамида этидиум бромид қўшилган ДНК намуналарини кўриш мумкин бўлади.

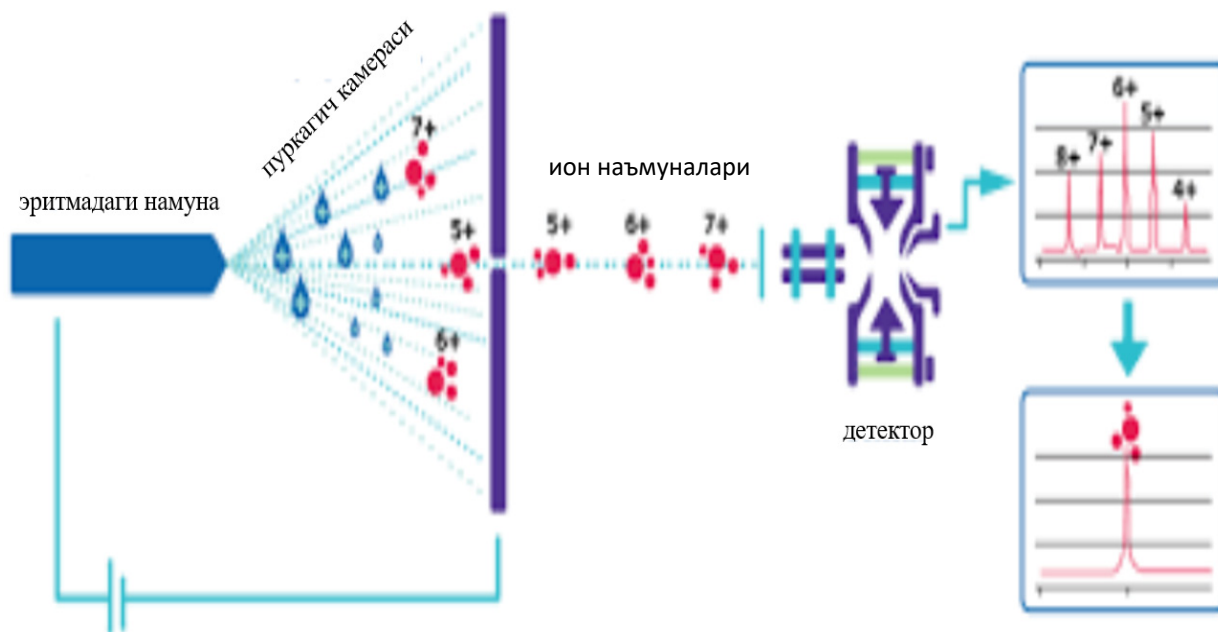
## **VII. MALDI-TOF MS АППАРАТИДА МИКРООРГАНИЗМЛАРНИ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ҚИЛИШ**

MALDI-TOF MS ёрдамида микробларни идентификациялаш маълумотлар базасида мавжуд бўлган PMF (Peptide Mass Fingerprint ёки пептидларнинг ионланишидан ҳосил бўлган спектр изи) номаълум



организмнинг PMF билан солиштириш ёки номаълум организм биомаркерлари массаларини протеом маълумотлар базаси билан таққослаш орқали амалга оширилади. PMF ни таққослаганда номаълум микробиал изолатларнинг MS спектри маълумотлар базасида мавжуд бўлган маълум микробиал изолатларнинг MS спектрлари билан таққосланади. Микроб хужайраси куруқ массасининг 60-70 фоизини ташкил этадиган юқори даражада бойитилган рибосома оқсилларининг ўзига хос тузилиши 2-20 кДа масса оралиғида [27]. Маълум бир микроорганизмни аниқлаш учун унинг PMF нақшини кенг очик маълумотлар базасида жойлашган рибосомал оқсилларнинг PMF лари билан таққослаш орқали фойдаланилади. Шундай қилиб, микроорганизмнинг ўзига хослигини турга қадар, кўп ҳолларда штамм турлари ва даражасига қараб аниқлаш мумкин [28]. Ушбу ёндашув микробларни идентификациялашда кенг қўлланилади, чунки у содда ва агар организмнинг PMF си кўплаб намуналари маълумотлар базасида мавжуд бўлса, уни микробиал диагностика лабораториясида қўллаш мумкин. Биомаркер массаларини геном кетма-кетлигидан прогноз қилинган оқсил молекуляр массалари билан таққослаш орқали микробларни идентификациялаш, микробиологик диагностика лабораторияларида унчалик кенг тарқалмаган, чунки у прогноз қилинган оқсил молекуляр массалари маълумотлар базасини яратиш учун организмнинг тўлиқ геном кетма-кетлигини билишни талаб қилади.

Ўстириш шароитлари микроблар физиологиясига ва оқсил экспрессион профилига кучли таъсир кўрсатиши мумкин бўлсада [29], улар MALDI-TOF MS ёрдамида микроорганизмларни аниқлашга таъсир қилмайди. Нэнси Валентин ва бошқа олимлар томонидан учта бактериал турни тўрт хил культурал муҳитда ўстириш, кўриш, микробларни MALDI-TOF MS ёрдамида аниқлаш ўстириш шароитига боғлиқ эмаслигини аниқлаганлар [30].



**16-Расм. MALDI-TOF MS-даги иш жараёнини кўрсатадиган схематик диаграмма**

MALDI-TOF MS учун матрицалар сифатида бир қатор органик бирикмалар ишлатилган, аммо микробиологик дастурлар учун  $\alpha$ -цияно-4-гидроксициннамик кислота (CHCA), 2,5-дигидроксибензой кислотаси (ДХБ) ва 3,5-диметокси-4-гидроксициннамик кислота (синапик кислота) энг фойдали деб топилди. Матрица эритмаси сувдан ва таркибида этанол /метанол ёки ацетонитрил ва матрицани эритадиган трифтороацетик кислота (ТФА) каби кучли кислота бўлган органик эритувчи аралашмаларидан иборат. Эритувчилар микроорганизмларнинг ҳужайра деворига кириб, ҳужайра ичидаги оксилларни чиқариб ташлайди. Эритувчи буғланганда оксил молекулалари ва ҳужайранинг бошқа бирикмалари матрица эритмасида ушланиб "кристалланади". MALDI-TOF MS ёрдамида микробларни идентификация қилиш учун намуналарни тайёрлаш жараёни, ажратилган манбага боғлиқ ёки бактерия ҳужайра деворининг таркибий қисмларининг кимёвий табиатидан фойдаланилади. Тадқиқотчилар микроорганизмларнинг турли гуруҳлари учун турли хил намуналарни тайёрлаш усуллари белгилаганлар. Баъзи микробларни тўғридан-тўғри MS

аниқлаш мумкин, бу тўғридан-тўғри хужайранинг профилланиши деб аталади, бошқалари учун бутун хужайра лизатлари ёки аҳамиятсиз хужайра экстрактлари тайёрланади. Тўғридан-тўғри хужайраларни профиллашда микроорганизмларнинг битта колонияси олинади ва тўғридан-тўғри намунавий идишга жойлаштирилади ва дарҳол матрица эритмаси билан қопланади.

MALDI-TOF MS да бактериялар қайноқ сувда эритилиб, сўнгра оксилларни этанол билан чўктирилади, чўккан оксиллар қуритилиб, 70% ли чумоли кислота ва ацетонитрилда эритилиб MALDI-TOF MS ёрдамида таҳлил қилинади. Тадқиқотчилар MALDI-TOF MS ёрдамида микобактерияларни аниқлаш учун турли хил намуналарни тайёрлаш усулларини ишлаб чиқиш орқали, тўғридан-тўғри бактерияларни идентификация қилиш ёки чумоли кислота билан аниқлаш мумкинлигини баён қилишган. Бунда ҳар кун ишлаш мобайнида, хавфсизлик масаласига кўпроқ эътибор қаратилганди [31]. Бунинг учун бураладиган қопқоқли найчаларда тўпланган микобактериал колониялар таркибидаги сув ва 0,5% Твин 20 дан фойдаланилган мавжуд ва 95°C да 1 соат давомида қиздириш орқали фаолсизлантирилган. Микобактерияларнинг хужайра деворини бузиш учун шиша қолдиқлари иштирокида центрифугада тебратилади ва олинган чўкма, чумоли кислотада ҳамда ацетонитрилда эритилади, сўнгра яна центрифуга қилиб чўктирилди. Якуний босқичда супернатант Maldі нишон-ликопчасига жойлаштирилади ва матрица билан қопланади.

Бактерияларда бўлгани каби, ачитқини идентификациялаш учун турли хил намуналарни қайта ишлаш усуллари MALDI-TOF MS ёрдамида текширилган ва бунда келтирилган маълумотларга кўра, чумоли кислота билан "тегишли экстракция" амалга ошириш энг ижобий усул ҳисобланган [32, 33].



**17-Расм. MALDI-8020 Benchtop Linear MALDI-TOF Mass Spectrometer  
(Shimadzu Biocompare.com)**

Қўзиқорин гифалари ва споралари намуналари тайёрлашнинг беш усули ўрганилган. Сўнгра улар намуна тайёрлаш усуллари ишлаб чиқиб, бунда қўзиқорин агарда Sabouraud гентамицин-хлорамфеникол билан 72 соат давомида 27°C да ўстирилганда, этанолда инкубация қилингандан сўнг чумоли кислота билан экстракция қилинган. Сўнгра ацетонитрил қўшилиб, центрифуга қилинган ва супернатант MALDI-TOF MS да таҳлил қилиш учун ишлатилган.

Усулнинг хусусиятлари (MALDI Biotyper):

- Сезгирлиги - ўлчов диапазони  $10^4$ - $10^5$  хужайралар;
- Усул, культура ёки атроф-муҳит хусусиятларига боғлиқ эмас;
- Тез ва осон намуналарни тайёрлаш: 5 дақиқагача / намуна;
- Ўлчов тезлиги: ~ 1 мин / намуна;
- Тадқиқотнинг барча босқичларини автоматлаштириш қобилияти;
- Идентификация аниқлиги тахминан 97-99%;

- Арзон нарх: 0,5 евро / намуна;
- Очiq маълумотлар базаси тизими - яратиш қобилияти маълумотлар базаларига эгалик қилиш ва уларни бошқа фойдаланувчилар билан алмаштириш мумкинлиги.

## **VIII. ОҚИМЛИ ЦИТОМЕТРИЯСИ УСКУНАСИ ЁРДАМИДА БАКТЕРИЯЛАРНИНГ СОНИНИ АНИҚЛАШ ВА БОШҚА ХУСУСИЯТЛАРИНИ ТАДҚИҚ ҚИЛИШ**

Оқим цитометрияси (ФСМ) - бу ҳужайралар ёки заррачалар популяциясининг физик-кимёвий хусусиятларини аниқлаш ва ўлчаш учун ишлатиладиган усулдир. Ушбу жараёнда ҳужайралар ёки заррачаларни ўз ичига олган намуна суюқликка қўшилади ва оқим цитометри асбобига қуйилади. Намуна лазер нурлари орқали бир вақтнинг ўзида битта ҳужайрани оқишига йўналтирилган, бу ерда тарқалган нур ҳужайралар ва уларнинг таркибий қисмлари учун характерлидир. Ҳужайралар кўпинча флуоресцент маркерлар билан белгиланади, шунинг учун ёруғлик сўрилади ва кейин тўлқин узунликларида тарқалади. Ўн минглаб ҳужайраларни тезда текшириш мумкин ва йиғилган маълумотлар компьютер томонидан қайта ишланади.

### **Оқимли цитометрияси қуйидаги вазифаларни бажаради:**

Ҳужайраларни сонини ҳисоблаш;

Ҳужайраларни саралаш (тирик ва нобуд бўлган ҳужайраларни аниқлайди ва саралайди);

Ҳужайра хусусиятлари ва функциясини аниқлаш (морфологик ва биофизикавий хусусиятлари асосида аниқлайди);

Микроорганизмларни тур таркибини аниқлаш;

Биомаркерни аниқлаш;

Протеин муҳандислигини аниқлаш;

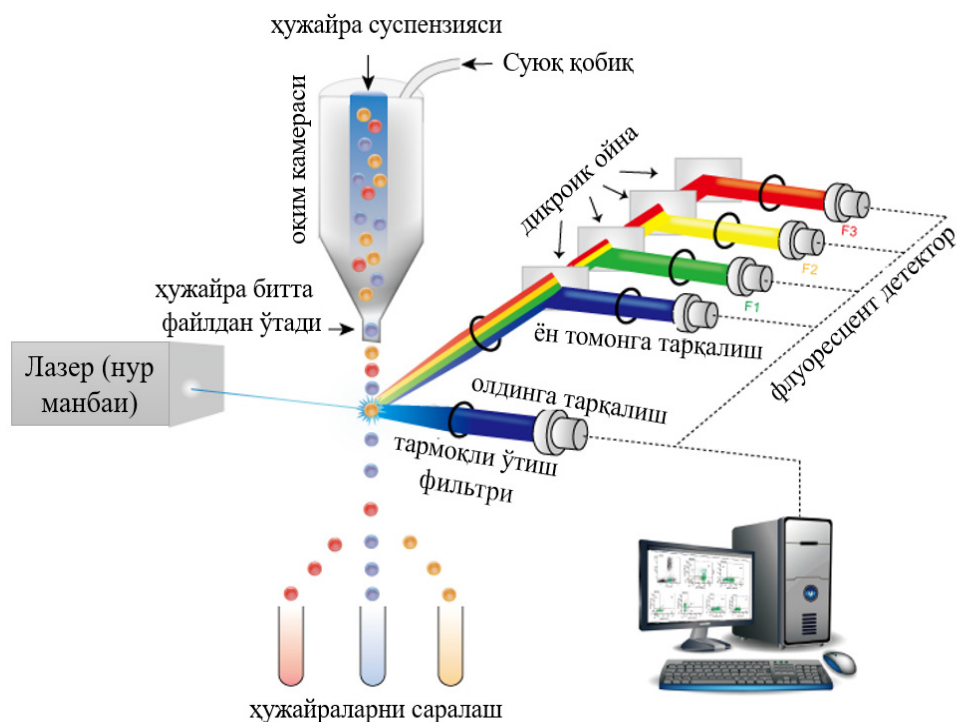
Қон саратони каби ҳужайравий касалликларнинг диагностикасини амалга оширади.

Замонавий оқим цитометрлари сонияда минглаб зарраларни "реал вақтда" таҳлил қилишга қодир. Агар ҳужайра саралаш мосламаси сифатида тузилган бўлса, шунга ўхшаш ставкаларда белгиланган оптик хусусиятларга эга бўлган зарраларни фаол равишда саралаш ва ажратиши мумкин. Оқим цитометрияси микроскопга ўхшайди, фақат ҳужайра тасвирини ҳосил қилиш ўрнига, оқим цитометрияси ҳужайралар бўйича аниқланган оптик параметрларнинг юқори ўтказувчанлигини, автоматлаштирилган миқдорини тақдим қилади. Қаттиқ тўқималарни таҳлил қилиш учун аввал битта ҳужайрали суспензияни тайёрлаш керак.

#### **Оқим цитометриясида бешта асосий компонент мавжуд:**

1. Оқим ҳужайраси;
2. Ўлчаш тизими;
3. Детектор;
4. Кучайтирувчи тизим;
5. Сигналларни таҳлил қилиш учун компьютер.

Оқимли цитометр анализатори - бу намунадан миқдорий маълумотларни тақдим этувчи асбоб. Оқим цитометриясидан фойдаланадиган бошқа асбобларга ҳужайра саралаш мосламалари киради ва улар ҳужайраларни оптик хусусиятларига қараб тозалайдилар. Ҳужайраларни саралаш усули - бу ўзига хос физикавий хусусиятларнинг мавжудлиги ёки йўқлиги асосида ҳужайралар популяциясини тозалайдир. Ускуна ҳужайраларни саралаш ва экспериментдан кейин фойдаланиш учун ҳужайра катталиги, морфологияси, оқсил экспрессиясини ва томчи технологияси каби параметрлардан фойдаланган ҳолда ҳужайраларни аниқлайди.



**18-Расм. Оқимли цитометр аппаратида молекулалар ажралишининг кўриниши**

#### **Ўлчанадиган параметрлар:**

Апоптоз (микдорни аниқлаш, ДНК деградациясини ўлчаш, митохондриал мембрана потенциали, ўтказувчанликнинг ўзгариши, каспаза фаоллиги);

Хужайранинг адгезияси (масалан, патоген-хўжайин хужайраларнинг ёпишқоқлиги);

Хлорофил ёки фитоэритрин каби хужайра пигментлари;

Хужайра юзаси антигенлари;

Хужайранинг тириклиги;

Айлана ўсимта хужайралари: изоляция ва тозалаш;

Саратон хужайраларида кўп дори-дармонларга чидамлилигини (КДДЧ) тавсифлаш;

Хромосомаларни таҳлил қилиш ва саралаш (маълумотлар базасини яратиш, хромосома бўйлиши);

ДНК нусхаси сонининг ўзгариши (Flow-FISH ёки BACs-on-Beads технологияси бўйича);

Ферментатив фаоллик;

Хужайра ичидаги антигенлар (турли хил цитокинлар, иккиламчи воситачилар ва бошқалар);

Мембрананинг суюқлиги;

Ядро антигенлари;

Оксидланиш портлаши;

pH, хужайра ичидаги ионлашган кальций, магний, мембрана потенциали;

Оқсил экспрессияси ва локализацияси;

Оқсил модификациялари, фосфооқсиллар;

Ёруғликнинг тарқалиши хужайраларни ёки бошқа заррачаларнинг, ҳаттоки флуоресцент бўлмаганларнинг ҳажмини (олдинга тарқалиши билан) ва морфологик мураккаблигини (ёнма-ён тарқалиши билан) ўлчаш учун ишлатилиши мумкин;

ДНК нинг умумий таркиби (хужайра циклини таҳлил қилиш, хужайра кинетикаси, ўсиши, плоидлиги, анеуплоидлиги, эндоредупликация ва бошқалар);

РНК нинг умумий таркиби;

*In vivo* олинган трансген маҳсулотлар, хусусан, яшил флуоресцент оқсил ёки тегишли флуоресцентли оқсиллар;

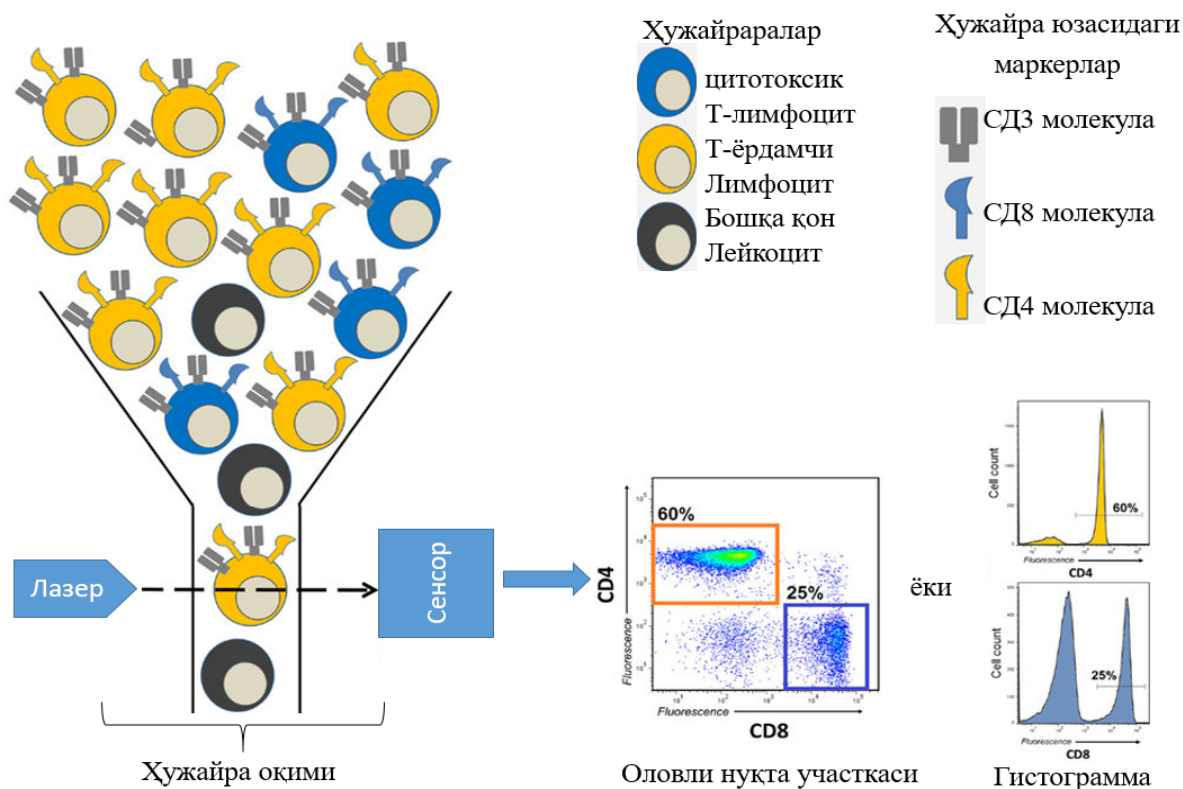
Турли хил (ДНК) комбинацияли сирт антигенлари ва бошқалар.

### **Оқимли цитометри аппаратининг афзалликлари:**

- Оқим тезлигига қараб юқори тезликда таҳлил қилиш имкониятига эгалиги (100.000 дона/сония);
- Битта хужайра ва кўп сонли хужайраларни ўлчашлиги;
- Бир вақтнинг ўзида бир нечта параметрларни таҳлил қилиши;
- Кичик популяцияларни аниқлаши;
- Флуоресцент интенсивлигининг миқдорини аниқлаши;



- Олдиндан аниқланган хужайралар популяциясини саралаш имкониятига эгаллиги (70.000 намунагача);
- Ускуналарни ихчамлиги.



## 19-Расм. Оқимли цитометрия апаратининг ишлаш схемаси

Ушбу қурилманинг имкониятлари туфайли оқим цитометриясини қўллаш соҳалари жуда хилма-хилдир. Дастлаб ДНК ва РНК каби хужайра ичидаги таркибий қисмларни миқдорий таҳлил қилиш усуллари интенсив равишда ишлаб чиқилган. Ушбу йўналишдаги ишлар тадқиқотчиларни хужайра цикли параметрларини таҳлил қилишнинг турли усулларини ишлаб чиқишга олиб келди. Ўз навбатида, бу бўлинадиган хужайраларни ва ДНК нинг ғайритабиий таркибидаги хужайраларни ташҳислаш усулларини ишлаб чиқиш учун асос бўлиб хизмат қилади [34].

## Фойдаланилган адабиётлар:

1. Kelly, Donovan P., Wood, Ann P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov and *Thermithiobacillus* gen. nov// International J. of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2000. V. 50. PP.511–516. doi:10.1099/00207713-50-2-511.
2. Waksman Selman A, Joffe J. S. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil: II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil// J. of Bacteriology. 1922. V.7 (2). PP. 239–256.
3. Jorge Valdés, Inti Pedroso, Raquel Quatrini, Robert J Dodson, Herve Tettelin, Robert Blake, Jonathan A Eisen and David S Holmes. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. doi:10.1186/1471-2164-9-597.
4. Hong Chen, Bo Yang, Xinhua Chen. Identification and characterization of four strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolated from different sites in China// Microbiological Research. December 2007. V.164 (6) PP.:613-23 doi: 10.1016/j.micres.2007.09.002
5. A Microbial Biorealm page on the genus *Leptospirillum ferrooxidans*// <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Leptospirillum>.
6. Francisco IssottaPedro A. Galleguillos, Ana Moya-Beltrán, C. Davis-Belmar, G. Rautenbach, Paulo C. Covarrubias, M. Acosta, Francisco J. Ossandon, Yasna Contador, D.Holmes, Sabrina Marín-Eliantonio, R. Quatrini C. Demergasso Draft genome sequence of chloride-tolerant *Leptospirillum ferriphilum* Sp-Cl from industrial bioleaching operations in northern Chile//Standards in Genomic Science. Published 2016. doi:10.1186/s40793-016-0142-1.
7. Juan Pablo Cárdenas, Marcelo Lazcano, Francisco J. Ossandon, Melissa Corbett, David S. Holmes, and Elizabeth Watkin. Draft Genome Sequence of the Iron-Oxidizing Acidophile *Leptospirillum ferriphilum* Type Strain DSM 14647/ American society for Microbiology. 2014 Nov-Dec; 2(6): 01153-14. doi: 10.1128/genomeA.01153-14.

8. R S Golovacheva, G I Karavaiko. *Sulfobacillus*, a new genus of thermophilic sporulating bacteria// *Mikrobiologia*. 1978. V. 47 (5): PP. 815–22. PMID 101742.
9. D. M. Collinson, K.M.Usher, P.D.Nichols, H.R.Watling. Habituation of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* to 4-nonylphenol in ferrous ion growth medium// *J. Process Biochemistry*. V. 46. Issue 1. January 2011, PP. 108-115.
10. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential// *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2004. V. 7 (4). PP. 204-211. PMID: 15383718. doi: 10.1159/000079829
11. Rey M.W, Ramaiya P, Nelson B.A, Brody-Karpin S.D, Zaretsky E.J, Tang M, Lopez de Leon A, Xiang H, Gusti V, Clausen I.G, Olsen P.B, Rasmussen M.D, Andersen J.T, Jorgensen P.L, Larsen T.S, Sorokin A, Bolotin A, Lapidus A, Galleron N, Ehrlich S.D, Berka R.M. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species// *Genome Biol.* 2004;5 (10): R77. Epub 2004 Sep 13. PMID: 15461803. doi: 10.1186/gb-2004-5-10-r77.
12. Norio Wakao, Naoshi Nagasawa, Tsuneaki Matsuura, Hisato Matsukura, Takehiko Matsumoto, Akira Hiraishi, Yonekichi Sakurai, And Hideo Shiota. *Acidiphilium multivorum* sp. nov, an acidophilic chemoorganotrophic bacterium from pyritic acid mine drainage// *The Journal of General and Applied Microbiology*. April 1994. V. 40(2). PP. 143-159. doi: 10.2323/jgam.40.143.
13. Gertrud Huber, Carola Spinnler, Agata Gambacorta and Karl Stetter. *Metallosphaera sedula* gen. and sp. Represents a New Genus of Aerobic, Metal-Mobilizing, Thermoacidophilic Archaeobacteria. [https://en.wikipedia.org/wiki/Metallosphaera\\_sedula](https://en.wikipedia.org/wiki/Metallosphaera_sedula).

14. Baumann H, Knapp S, Ladenstein R and Hard T. Solution structure and DNA-binding properties from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*// *Nature: Structural Biology*. 1994 Nov; V. 1(11). PP. 808-19. PMID: 7634092. doi: 10.1038/nsb1194-808.
15. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste Christopher A. Dunlap, Soon-Wo Kwon, Alejandro P. Rooney and Soo-Jin Kim. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2015. V. 65. PP. 3487–3492. doi 10.1099/ijsem.0.000441.
16. Di Zhao. Shangong Wu.Wenwen Feng. Ivan Jakovlić. Ngoc Tuan Tran. Fan Xiong.Adhesion and colonization properties of potentially probiotic *Bacillus paralicheniformis* strain FA6 isolated from grass carp intestine. <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01385-1>. Japanese Society of Fisheries Science 2019.
17. Kai M, Yano T, Fukumori Y, Yamanaka T. Cytochrome oxidase of an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Thiobacillus ferrooxidans*, function at pH 3.5// *Biochem Biophys Res Commun*. 1989. Apr 28. V. 160 (2). PP. 839-43. doi: 10.1016/0006-291x(89)92510-2. PMID: 2541715
18. Google. List of Media for Microorganisms (<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/microorganisms/culturetechnology/list-of-media-for-microorganisms>).
19. Komal Ijaz1, Javed Iqbal Wattoo, Basit Zeshan, Tanveer Majeed, Tanzeela Riaz1, Sehar Khalid, Sahajahan Baig, Mushtaq A. Saleem.Potential impact of microbial consortia in biomining and bioleaching of commercial metals// *Advancements in Life Sciences – International Quarterly Journal of Biological Sciences*. [www.als-journal.com/](http://www.als-journal.com/) ISSN 2310-5380/ November 2017. V. 5. <http://www.als-journal.com/articles/vol5issue1/513.17/473.pdf>.
20. Doyle J.J, Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. // *Phytochemical Bulletin*. 1987. Vol. 19. PP. 11-15.
21. Blanca Escobar, Karina Bustos, Gabriela Morales, Oriana Salazar. Rapid and specific detection of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*by PCR. doi:10.1016/j.hydromet.2008.01.012.
22. M. I. Muravyova, T. A. Pivovarovaa, T. P. Tourovaa, A. G. Bulaeva, N. V. Fomchenkoa and T. F. Kondrat'eva. Identification of the Dominant

- Bacterium of TwoStage Biooxidation of Gold–Arsenic Concentrate// Microbiology, 2010, Vol. 79, No. 3, PP. 342–348. doi: 10.1134/S0026261710030100
23. Haneef Ur Rehman, Nadir Naveed Siddique, Afsheen Aman, Muhammad Asif Nawaz, Abdul Hameed Baloch, Shah Ali Ul Qader. Morphological and molecular based identification of pectinase producing *Bacillus licheniformis* from rotten vegetable// J Genet Eng Biotechnol. 2015 Dec. V. 13 (2). PP. 139–144. Published online 2015 Aug 8. doi: 10.1016/j.jgeb.2015.07.004.
  24. Sophie R. Ullrich, Anja Poehlein, Sonja Voget, Michael Hoppert, Rolf Daniel, Andreas Leimbach, Judith S. Tischler, Michael Schlömann and Martin Mühling. Permanent draft genome sequence of *Acidiphilium* sp. JA12-A1. Stand Genomic Sci. 2015 Aug. doi: 10.1186/s40793-015-0040-y. e Collection.
  25. Hong Peng, Yu Yang, Xuan Li, Guanzhou Qiu, Xueduan Liu, Jufang Huang and Yuehua Hu. Structure Analysis of 16S rDNA Sequences from Strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans*// J. of Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 39. No. 2, March 2006, PP. 178-182.
  26. Roberto A. Bobadilla Fazzini & Gloria Levican & Pilar Parad. *Acidithiobacillus thiooxidans* secretome containing a newly described lipoprotein Licanantase enhances chalcopryrite bioleaching rate/ J. Appl Microbiol Biotechnol 2011. V. 89. PP. 771–780 doi 10.1007/s00253-010-3063-8
  27. Patrick R. Murray. What Is New in Clinical Microbiology-Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry // J Mol Diagn. 2012 Sep; 14(5): PP. 419–423. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.03.007.
  28. Clifton K Fagerquist, Brandon R Garbus, William G Miller. Katherine Williams. Rapid Identification of Protein Biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight-Time-of-Flight Mass Spectrometry and Top-Down Proteomics// Anal Chem. 2010 Apr 1. V. 82 (7). PP. 2717-25. doi: 10.1021/ac902455d.

29. Martin Welker. Proteomics for routine identification of microorganisms// [www.proteomics-journal.com](http://www.proteomics-journal.com). August 2011. V. 11. Issue15. Special Issue: Microbial Proteomics. PP. 3143-53. doi: 10.1002/pmic.201100049.
30. Nancy Valentine, Sharon Wunschel, David Wunschel, Catherine Petersen, Karen Wahl. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry// *Appl Environ Microbiol*. PMID: 15640170. PMCID: PMC544247. doi: 10.1128/AEM.71.1.58-64.2005.
31. Etienne Carbonnelle, Cécile Mesquita, Emmanuelle Bille, Nesrine Day, Brunhilde Dauphin, Jean-Luc Beretti, Agnès Ferroni, Laurent Gutmann, Xavier Nassif. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory// *Clinical Biochemistry*. 2011 Jan. V. 44 (1) PP. 104-9. PMID: 20620134. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017.
32. Lindsay G. Stevenson, Steven K. Drake, Yvonne R. Shea, Adrian M. Zelazny, and Patrick R. Murray. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Clinically Important Yeast Species// *J. Clin Microbiol*. 2010. V. 48 (10). PP. 3482-6. doi: 10.1128/JCM.00687-09.
33. Elitza S Theel, Bryan H Schmitt, Leslie Hall, Scott A Cunningham, Robert C Walchak, Robin Patel, Nancy L Wengenack. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry// *J Clin Microbiol*. 2012 Sep. V. 50 (9) PP. 3093-5. PMID: 22760034. PMCID: PMC3421773. doi: 10.1128/JCM.01045-12.
34. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине/ *Х. Медицинская Иммунология* 2007, Т. 9, № 4-5, С. 373-378.

## МУНДАРИЖА

|        |  |    |
|--------|--|----|
| I.     | Нодир ва қимматбаҳо металлларни эритишда иштирок этувчи микроорганизмлар тавсифи.....  | 3  |
| II.    | Қимматбаҳо металлларни эритишда иштирок этувчи микро- организмларни ўстириш учун оптимал озуқа муҳитлари.....                    | 14 |
| II. 1. | Нодир ва қимматбаҳо металлларни биологик эритиб олиш жараёнига таъсир этувчи омиллар.....  | 18 |
| III.   | Нодир ва қимматбаҳо металлларни эритишда иштирок этувчи микроорганизмларни суялтириш усули билан микробиологик таҳлил қилиш..... | 19 |
| IV.    | Бактериялардан ДНК ажратиб олиш усуллари.....  | 20 |
| IV. 1. | ДНК ажратиб олиш учун керак бўладиган умумий реактивлар рўйхати.....   | 20 |
| IV. 2. | СТАБ усули орқали бактериялардан ДНК ажратиш.....  | 21 |
| IV. 3. | Бактерия хужайраларини модификацияланган фенолли ок- силсизлантириш усули ёрдамида умумий ДНК ажратиш усули.....                 | 24 |
| V.     | Полимераза занжир реакцияси (ПЗР) усули ёрдамида бактерияларни идентификация қилиш.....  | 26 |
| VI.    | Гель-электрофорез усулини амалга ошириш.....   | 34 |
| VII.   | Maldi-tof ms аппаратида микроорганизмларни идентификация қилиш.....  | 36 |
| VIII.  | Оқимли цитометрияси ускунаси ёрдамида бактерияларнинг сонини аниқлаш ва бошқа хусусиятларини тадқиқ қилиш.....                   | 41 |
|        | Фойдаланилган адабиётлар.....  | 46 |

Мазкур амалий-қўлланма ЎзРФА Микробиология институти илмий кенгашининг 2020 йил 10 ноябрдаги 22-сонли мажлисида муҳокама қилиниб, чоп қилишга рухсат этилган.

*Қ.Д. Давранов, Қ. Санақулов, И.М. Халилов, Ф.Б. Қобилов*

ҚИММАТБАҲО ВА НОДИР МЕТАЛЛАРНИ ЭРИТМАГА  
ЎТИШИДА (ДЕСОРБЦИЯ) ИШТИРОК ЭТУВЧИ  
МИКРООРГАНИЗМЛАРНИ АНИҚЛАШДА  
ИШЛАТИЛАДИГАН ЗАМОНАВИЙ УСЛУБИЙ  
ТЕХНОЛОГИЯЛАР БЎЙИЧА

АМАЛИЙ-ҚЎЛЛАНМА

Мухаррир: У.З. Шарафутдинов, Н.Э. Камолова

Техник мухаррир: Ш.Қ. Туйева, А.А. Хамидов

Саҳифаловчи: О.Б. Жилиева

Бичими 60x84. Кегли 10 шпонли. “Times New Roman” гарн.

Офсет босма усулида босилди. Офсет қоғози.

Буюртма рақами 1490

Босма табағи 3,25. Адади 600.

НКМК босмахонасида чоп этилди.

Манзил: Навоий шаҳри, Жанубий кўчаси, 25-уй.