

LABORATORIYA SHAROITIDA BAKTERIAL FERMENTLARNI ANIQLASH VA TAHLIL QILISH METODIKASI

PhD Xudoyarova G.N.

Hazratqulov Maqsudbek, Bobojonov Abuseman, Jamolova Zulayho

(davolash ishi yo'nalishi talabalari)

ZARMED UNIVERSITETI SAMARQAND KAMPUSI

Mavzuning dolzarbligi. Bakterial fermentlar — mikroorganizmlarning biologik faol moddalari bo'lib, ular turli biokimyoviy reaksiyalarni tezlashtirish xususiyatiga ega. Ular qishloq xo'jaligi, oziq-ovqat sanoati, farmatsevtika va biotexnologiyada keng qo'llaniladi. Bakterial fermentlarni aniqlash va ularning xususiyatlarini laborator sharoitda o'rganish — mikrobiologiya, biokimyovo va biotexnologiya sohalarida dolzarb ilmiy muammo hisoblanadi. Ekzofermentlar bakteriya hujayrasidan tashqi muhitga chiqarilib, u yerda turli moddalarni parchalaydi. Ba'zi ekzofermentlar bakteriyalarning oziqlanishi bilan bog'liq, chunki ular oziq moddalarini mikrob hujayrasi tomonidan so'rilishi mumkin bo'lgan shaklga aylantiradi. Endofermentlar hujayra ichidagi oziq moddalarining parchalanishi va hujayraning tarkibiy qismlariga aylanishida ishtirok etadi.

Kalit so'zlar: bakterial fermentlar, mikroorganizmlar, ferment faolligi, laborator identifikatsiya, biokimyoviy tahlil, mikrobiologik metodlar, biotexnologiya, sanoat fermentlari, ekologik xavfsizlik, diagnostika.

Tadqiqotning maqsadi: Bakterial fermentlarning turli turlarini o'rganish, ularning biokimyoviy xususiyatlarini aniqlash va laborator sharoitda identifikatsiya qilish usullarini takomillashtirish orqali ularning sanoat, qishloq xo'jaligi va ekologik sohalarda samarali qo'llanilish imkoniyatlarini aniqlashdan iborat.

Tadqiqot uchun materiallar. Tadqiqotda turli laborator sharoitda olingan bakterial isolatlar ishlatilgan. Ferment faoliyatini aniqlash uchun quyidagi metodlar qo'llanildi:

- Substrat asosidagi enzimatik testlar (aminopeptidaza, lipaza, oksidaza, katalaza)
- Biokimyoviy indikatorlar yordamida rangli reaksiyalar
- Mikrobiologik o'sish muhitida fermentlar faoliyatini kuzatish

Fermentlar faolligi ma'lum vaqt oralig'ida o'lchanib, natijalar statistik tahlildan o'tkazildi.

Ba'zi fermentlar doimiy ravishda bakteriya hujayrasi tomonidan sintezlanadi (konstitutsiyaviy fermentlar), boshqa fermentlar esa faqat ma'lum bir substrat bilan aloqa qilganda sintezlanadi (induktsiyali fermentlar). Xususan, konstitutsiyaviy fermentlar glikolitik fermentlar - glyukoza oksidlanish fermentlari (geksokinaza, glyukoza izomeraza, aldolaz va boshqalar). Induktsiyali fermentlar beta-galaktozidaza (laktozaning glyukoza va galaktozaga bo'linishini katalizlaydi) va beta-laktamaza (beta-laktam antibiotiklarini parchalaydi).

Oksidoreduktazalar - Oksidlanish-qaytarilish reaksiyalarini katalizlovchi fermentlar barcha tirik hujayralarda mavjud bo'lib, ularning asosiy vazifasi organizmga energiya manbalarini foydalanishga yaroqli shaklda yetkazib berishdir. Oksidoreduktazalarning eng muhim vakillari sifatida degidrogenazalar, oksidazalar, peroksidazalar, gidroksilazalar, oksigenazalar va katalazalar ajralib turadi.

Bakteriyalarni aniqlashda asosan katalaza va sitoxromoksidazani aniqlash usullari qo'llaniladi.

Transferazalar - alohida radikallar (PO_3 , H_2 , CH_3), molekularning qismlari yoki butun atom guruhlarini bir birikmadan ikkinchisiga o'tkazishni katalizlovchi fermentlar. Transferazalarga atsetiltransferaza, fosfotransferaza, aminotransferaza,

metiltransferaza kiradi. Ushbu fermentlar muntazam laboratoriya amaliyotida aniqlanmaydi.

Gidrolazalar - suv ishtirokida oqsillar, yog'lar va uglevodlarning parchalanishi va sintezi reaksiyalarini katalizlovchi fermentlar. Bu fermentlar sinfiga peptidohidrolazalar yoki proteazlar - oqsillarni parchalovchi fermentlar kiradi; glikozid gidrolazalar yoki glikozidlarni parchalovchi glikozidazalar (b-fruktofuranozidaza, a-glyukozidaza, b-galaktozidaza); esterlarning parchalanishini katalizlovchi esterazlar (lipaza, fosfataza). Bakteriyalarni aniqlashda birinchi navbatda uglevodlar va oqsillarni parchalaydigan fermentlar o'rganiladi. Bakteriyalarning uglevodlarni parchalash qobiliyati saxarolitik faollik, parchalash qobiliyati esa proteolitik faollik deb ataladi. Bu belgilar o'rganilayotgan maxsus oziq muhitda ekishdan so'ng substratlarning parchalanishining yakuniy mahsulotlari bilan aniqlanadi. Shakarlarni fermentatsiyalash jarayonida kislota (sut, sirka, chumoli) yoki kislota va gaz (karbonat anhidrid, vodorod) hosil bo'lishi, oqsillarning parchalanishida esa ishqorlar, vodorod sulfidi, indol va ammiak hosil bo'lishi aniqlanadi.

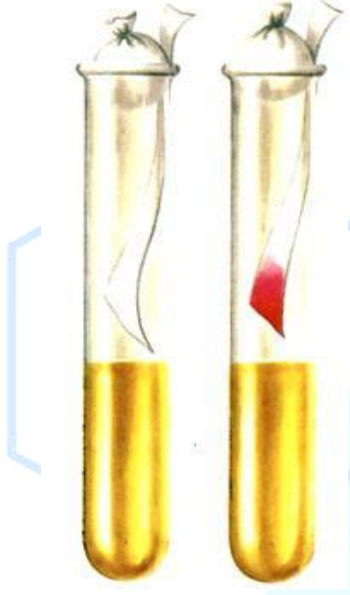
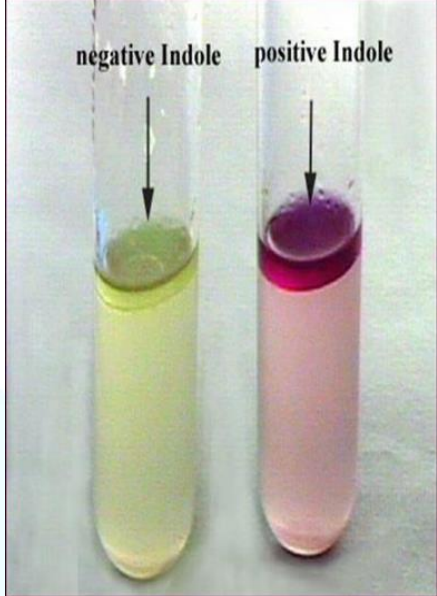
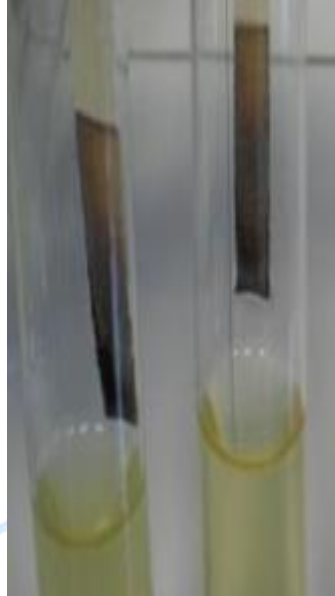
Glikozidazalarni aniqlash uchun suyuq yoki yarim suyuq Giss muhiti ishlatiladi. Suyuq Giss muhiti - uglevodlardan biri (laktoza, glyukoza, maltoza, saxaroza va boshqalar) va Andrede indikator (ishqor bilan rangi o'zgargan fuksin kislotasi) bo'lgan peptonli suvdan iborat. Hosil bo'lgan gazlarni ushlash uchun probirkaga suzuvchi (mikronaycha teskari) joylashtiriladi, u sterilizatsiya paytida muhit bilan to'ldiriladi. Muhitning boshlang'ich rangi somonli sariq rangdir. Uglevod kislotaga parchalanganda, faqat muhitning rangi qizil rangga o'zgaradi va gaz hosil bo'lganda, ikkinchisi to'planadi. Agar uglevod parchalanmasa, muhitning rangi o'zgarmaydi.

Har bir turdagi bakteriyalar uglevodlarni faqat ma'lum bir diapazonda fermentatsiya qiladi, shuning uchun ba'zi probirkalarda muhitning rangi o'zgaradi, boshqalarida esa o'zgarishsiz qoladi, natijada "rang-barang qator" paydo bo'ladi. Boshqacha qilib aytganda, bakteriyalarning har bir turi o'ziga xos "rangli qator" bilan tavsiflanadi. Bu bakteriyalarning bir turini boshqasidan ajratish imkonini beradi.

Bakteriya **proteazalari** sof kulturani maxsus oziq muhitlarga (go'sht-pepton jelatin - GPJ, sutli agar, go'sht-peptonli bulon - GPB) ekish orqali aniqlanadi. Natija jelatinni suyultirish, koloniyalar atrofida sut kazeinining parchalanishi yoki oqsil parchalanishining yakuniy mahsulotlari bilan baholanadi. Har xil turdagi bakteriyalar jelatinni suyultirishning turli shakllariga ega: *Staphylococcus aureus* –(voronka) shaklida, *Vibrio cholerae* - tirnoq shaklida. Kazein proteolizi koloniyalar atrofida tozalangan maydon shakllanishi bilan namoyon bo'ladi.





Protein parchalanishining yakuniy mahsulotlari indol, vodorod sulfidi va ammiak bo'lishi mumkin. Ushbu mahsulotlarni aniqlash uchun indikator qog'ozlar qo'llaniladi, ular probirka ichiga, probirka devori va paxta-doka tiqin orasiga joylashtiriladi.

		
<p>a</p>	<p>b</p>	<p>a</p>
<p>indikator chiziqlari (a) va Kovach (b) reaktivi yordamida indol testi.</p>		<p>vodorod sulfidi testi: a test; b-nazorat.</p>

Vodorod sulfidining ko'rsatkichi (oltingugurt o'z ichiga olgan aminokislotalarning parchalanish mahsuloti – sistin, sistein, metionin) qo'rg'oshin asetatdir.

Enterobakteriyalar oilasi vakillarida vodorod sulfidini aniqlash Kligler yoki Olkenitskiyning differentsial diagnostika muhitida amalga oshiriladi. Ijobiy natija sulfatlarning sulfitlarga kamayishi natijasida qora cho'kma hosil bo'lishi bilan namoyon bo'ladi.

	
<p>A</p>	<p>B</p>
<p>Kligler (a) va Olkenitskiy (b) muhitida enterobakteriyalarning o'sishi.</p>	

Muhitning qora rangi vodorod sulfidining paydo bo'lishini ko'rsatadi.

Ammiakning ko'rsatkichi (fenilalaninning parchalanish mahsuloti) lakmus qog'ozidir. Ammiak mavjud bo'lganda, qizil lakmus testi ko'k rangga ega bo'ladi.

Liazalar - suv ishtirokisiz (dekarboksilaza, deaminazalar) qo'sh bog'lanish joyiga alohida guruhlar (masalan, aminokislotalar, aldegid guruhlari) qo'shilishi bilan substratlardan ma'lum kimyoviy guruhlarning ajralishini katalizlovchi fermentlar). Xususan, dekarboksilazalarni aniqlash oziq muhitda tegishli aminokislota qo'shilgan holda amalga oshiriladi (masalan, lizin dekarboksilaza lizinli muhitda aniqlanadi).

Izomerazalar - bu chuqur intramolekulyar qayta qurish, ya'ni organik birikmalarning ularning izomerlariga (izomerazalar, transferazalar, topoizomerazalar) aylanishini ishlab chiqaradigan fermentlar. Laboratoriya amaliyotida bu fermentlar aniqlanmaydi.

Ligazalar (sintetazalar) oddiy birikmalardan murakkab organik moddalar (o'zaro bog'lanish, ligatsiya) sintezini katalizlovchi fermentlar bo'lib, bir vaqtning o'zida fosfat bog'lanishlari (asparagin sintetaza, kokarboksilaza) uziladi.

Patogen bakteriyalarda ekzofermentlarning bir qismi agressiv fermentlari deb ataladi. Ushbu ekzofermentlari penetratsiya bo'lishi va tarqalishga yordam beradi. Makroorganizm to'qimalarida bakteriyalarning shuningdek, uning himoyasini zaiflashtiradi.

Agressiya fermentlariga gialuronidaza, kollagenaza, letsitinaza, DNKaze, leykotsidin, gemolizin, plazmokoagulaza, fibrinolizin, neyraminidaza, proteaz va boshqalar kiradi. Laboratoriya sharoitida gemolizin, letsitinaza, DNKaza, plazmokoagulaza va fibrinolizin kabi bakteriyalarning patogenligini ta'minlovchi fermentlari aniqlanadi.

Gemolizin eritrotsitlar gemolizini keltirib chiqaradi. Gemolizinning mavjudligi koloniyalar atrofida gemoliz zonasi hosil bo'lishi bilan qonli agarda aniqlanishi mumkin.

Letsitinaza letsitinlarni fosfokolinlarga va suvda erimaydigan diglitsridlarga parchalaydi. Sariqli agarda bu fermentning ta'siri koloniyalar atrofida opalescent zona (kamalak) shaklida namoyon bo'ladi.

DNKaza DNK polinukleotid zanjirining gidrolitik parchalanishini alohida nukleotidlar va oligonukleotidlar hosil bo'lishi bilan katalizlaydi. DNKazani aniqlash uchun DNKning suvli eritmasi va kaltsiy xlorid eritmasi bo'lgan agardan foydalaniladi. Kulturani o'stirgandan so'ng, stakanlarga xlorid kislota eritmasi qo'llaniladi. Ijobiy reaksiya DNKning xlorid kislota bilan o'zaro ta'siri natijasida hosil bo'lgan loyqa fonda koloniyalar atrofida depolimerizatsiyalangan DNKning shaffof zonasi bilan namoyon bo'ladi.

Plazmokoagulaza qon plazmasining koagulyatsiyasini (tromb hosil bo'lishini) keltirib chiqaradi. **Fibrinolizin** fibrin quyqalarini parchalaydi. Plazmakoagulaza va fibrinolizinning mavjudligi bitta test yordamida aniqlanadi. Sinov kulturani plazmasi bo'lgan probirkaga qo'shiladi. Plazmakoagulaza ishtirokida xona haroratida 3-4 soatdan keyin quyqa hosil bo'ladi. Keyinchalik 36°C haroratda yetishtirish bilan, fibrinolizin sintezi holatida quyqa (сгусток) suyultiriladi. Laboratoriya sharoitida neyraminidaza, gialuronidaza, kollagenaza kabi patogen fermentlar kundalik amaliyotda aniqlanmaydi.

Natijalar: Tadqiqot natijalariga ko'ra, bakterial fermentlarning turli turlari va ularning faollik darajalari aniqlanib, laborator sharoitda identifikatsiya qilish usullari samarali ekanligi tasdiqlandi.

1. **Ferment turlarini aniqlash:** Bakterial shtammlardan olingan fermentlar amilaza, proteaza, lipaza va pektinaza kabi asosiy turlarga bo'linishi aniqlangan. Har

bir ferment turi o'ziga xos substratga ta'sir ko'rsatishi va ma'lum sharoitlarda maksimal faollikni namoyon qilishi kuzatildi.

2. **Laborator identifikatsiya natijalari:** Mikroskopik kuzatuvlar, biokimyoviy testlar va selektiv muhitlarda o'stirish orqali fermentlarning mavjudligi va faolligi ishonchli tarzda aniqlandi. Masalan, amilaza faolligi Lugol eritmasi bilan tahlil qilinib, hosil bo'lgan rang o'zgarishi orqali baholandi.

3. **Biokimyoviy xususiyatlar:** Har bir ferment turining optimal pH, harorat va namlik sharoitlari aniqlangan bo'lib, bu sanoat va laboratoriya sharoitida ularni qo'llash uchun muhim ko'rsatkich hisoblanadi.

4. **Ekologik jihatlari:** Bakterial fermentlar tabiiy mikroorganizmlardan olinganligi sababli, ularning qo'llanilishi ekologik xavfsiz bo'lib, atrof-muhitga minimal zarar yetkazadi.

Natijada, bakterial fermentlarni laboratoriya sharoitida aniqlash va ularning faolligini baholash usullari ishonchli va takrorlanadigan ekanligi, shuningdek, ularning turli sohalarda qo'llanish imkoniyatlari yuqori ekanligi ko'rsatildi.

Grafik ko'rinish

Xulosa. Bakterial fermentlarni o'rganish va laborator sharoitda identifikatsiya qilish tadqiqoti natijalari shuni ko'rsatdiki:

1. Bakterial fermentlar turli turlarga bo'linadi (amilaza, proteaza, lipaza, pektinaza) va har birining faolligi o'ziga xos substrat va sharoitga bog'liq.
2. Laborator metodlar — mikroskopiya, biokimyoviy testlar va selektiv o'sish muhirlari — fermentlarni aniqlashda samarali va ishonchli vositalardir.
3. Bakterial fermentlar sanoat, qishloq xo'jaligi va ekologik sohalarda keng qo'llanishi mumkin, shu bilan birga, ular ekologik xavfsiz va atrof-muhitga zarar yetkazmaydi.

4. Tadqiqot natijalari biotexnologik va ilmiy ishlarda bakterial fermentlarni qo'llash imkoniyatlarini kengaytirish, yangi mahsulotlar yaratish va laborator diagnostikani takomillashtirish uchun asos bo'ladi.

Foydalanilgan adabiyotlar:

1. Pelczar M.J., Chan E.C.S., Krieg N.R. *Microbiology: Concepts and Applications*. – New York: McGraw-Hill, 2012. – 980 s.
2. Madigan M.T., Bender K.S., Buckley D.H., Sattley W.M. *Brock Biology of Microorganisms*. – Pearson, 2018. – 1240 s.
3. Atlas R.M. *Principles of Microbiology*. – New York: McGraw-Hill, 2010. – 1100 s.
4. Stanbury P.F., Whitaker A., Hall S.J. *Principles of Fermentation Technology*. – Elsevier, 2016. – 530 s.
5. Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. *Microbiology: An Introduction*. – Pearson, 2019. – 1050 s.
6. Copping L.G., Menn J.J. *Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy*. – Pest Management Science, 2000, vol. 56, no. 8, pp. 651–676.
7. Kumar V., Dubey N.K. *Mycopesticides in pest management: present status and future prospects*. – Current Science, 2012, vol. 102, no. 6, pp. 784–793.
8. Lacey L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D.I. *Insect pathogens as biological control agents*. – Journal of Invertebrate Pathology, 2015, vol. 132, pp. 1–41.
9. Singh H., Singh R. *Bio-control agents and their role in integrated pest management*. – International Journal of Advanced Research, 2016, vol. 4, no. 5, pp. 112–120.
10. Thakore Y. *The biopesticide market for global agricultural use*. – Industrial Biotechnology, 2006, vol. 2, no. 2, pp. 113–121.

11. Gupta R., Sharma A. *Role of microbial pesticides in sustainable crop protection.* – International Journal of Environmental Sciences, 2018, vol. 3, no. 2, pp. 45–55.
12. Bhattacharyya P.N., Jha D.K. *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture.* – World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, vol. 28, pp. 1327–1350.
13. Tripathi A., Shukla A., Sharma V. *Microbial pesticides in sustainable agriculture.* – Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, vol. 101, no. 1, pp. 1–13.
14. Tyagi R., Malik A. *Microbial insecticides for sustainable agriculture: current status.* – Biocontrol Science and Technology, 2013, vol. 23, no. 6, pp. 607–622.
15. Hajek A.E., St. Leger R.J. *Interactions between fungal pathogens and insect hosts.* – Annual Review of Entomology, 1994, vol. 39, pp. 293–322.
16. Uzbekiston Respublikasi Qishloq xo‘jaligi vazirligi. *Bakterial fermentlar va ularning laborator diagnostikasi bo‘yicha tavsiyalar.* – Toshkent, 2021. – 92 s.
17. Singh P., Singh S. *Eco-friendly pest management using microbial agents.* – Journal of Biopesticides, 2016, vol. 9, no. 1, pp. 1–14.
18. Sharma A., Kumar S. *Microbial biopesticides: prospects and challenges.* – Journal of Applied and Natural Science, 2019, vol. 11, no. 1, pp. 245–256.
19. Stanier R.Y., Adelberg E.A., Ingraham J.L. *General Microbiology.* – Macmillan Press, 1986. – 780 s.
20. Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. *Microbiology.* – McGraw-Hill, 2002. – 960 s.