

**PRIESTIA MEGATERIUM VA PANTOEA AGGLOMERANS SHTAMMLARINING
HUJAYRA SONING KO'PAYISHI****¹Jalolova Bahora Shuhrat Qizi, ²Turayeva Bahora Ismoilovna, ³Go'zal Jumaniyozovna
Qutliyeva, ⁴Davranov Qahramon Davranovich**¹O'zMU Biologiya fakulteti II- bosqich tayanch doktoranti²O'zRFA Mikrobiologiya instituti katta ilmiy xodimi³O'zRFA Mikrobiologiya instituti katta ilmiy xodimi, b.f.n⁴O'zRFA Mikrobiologiya instituti b.f.d., proff.<https://doi.org/10.5281/zenodo.8372881>

Annotatsiya. Ushbu tadqiqotda bakterial suspenziyalarning ma'lum soatlar oralig'ida ozuqa muhitiga moslashishi va ko'payishi asos qilib olingan. *Priestia megaterium* va *Pantoea agglomerans* bakteriya shtammlarining 3 kunda bir xil vaktida 3 soat oralig'ida hujayra hosil qiluvchi birligi aniqlandi. Bakteriya shtammlari kartoshka dekstrozali ozuqa muhitining uglevod manbai o'zgartirilgan dekstroza o'rniga melassadan foydalanilgan. Bakteriya shtammlari uchun kartoshka mellassali optimal ozuqa muhiti yaratilgan va ularning hujayra hosil qiluvchi birligi aniqlangan. 3-kunga kelib *Priestia megaterium* bakteriya shtammi 2.028 mlrd va *Pantoea agglomerans* bakteriya stammining 2.240 mlrd hujayra hoil qiluvchi birligi (HHB) aniqlandi.

Kalit so'zlar: *Priestia megaterium*, *Pantoea agglomerans*, Goryaev panjarali sanoq kamerasi, HHB-hujayra hosil qiluvchi birlik,

Абстракт. В данном исследовании изучен рост бактериальных штаммов *Priestia megaterium* и *Pantoea agglomerans* на модифицированной картофельно декстрозной питательной среде где декстроza была заменена меллассой. Определение роста культур проводилось на 3 сутки, через каждые 3 часа. Отмечено, что рост культуры *Priestia megaterium* на 3 сутки составил 2,028, а рост *Pantoea agglomerans* 2,240 (KOE).

Ключевые слова: *Priestia megaterium*, *Pantoea agglomerans*, Камера Горяева, Колониеобразующая единица –KOE.

Abstract. In this study, the growth of bacterial strains of *Priestia megaterium* and *Pantoea agglomerans* was studied on a modified potato dextrose nutrient medium where dextrose was replaced by mellas. Determination of the growth of cultures was carried out on the 3rd day, every 3 hours. It was noted that the growth of the *Priestia megaterium* culture on the 3rd day was 2.028, and the growth of *Pantoea agglomerans* was 2.240 (CFU).

Keywords: *Priestia megaterium*, *Pantoea agglomerans*, Goryaev's chamber, colony-forming unit - CFU.

Ko'p hujayrali organizmlardan farqli o'laroq, bir hujayrali organizmlar (shu jumladan bakteriyalar) da o'sish, ya'ni hujayra hajmining oshishi va hujayra bo'linishi bilan ko'payish bir-biri bilan chambarchas bog'liq [1]. Odatda bakteriya hujayralari ikkita ekvivalent qiz hujayralarga bo'linadi. Birinchidan, hujayra uzayadi, unda ko'ndalang septum hosil bo'ladi. Yakuniy bosqichda qiz hujayralari ajralib chiqadi. Bakterial hujayra bo'linishining o'ziga xos xususiyati bu bo'linish jarayonida replikasiya qilingan DNKning bevosita ishtirok etishidir [2]. Aksariyat hollarda prokaryotik hujayralar hujayra devoriga ega bo'lganligi sababli, ikkilik bo'linish septumning shakllanishi bilan birga keladi - qiz hujayralar orasidagi bo'linma, keyinchalik o'rtada tabaqalanadi. Prokariot hujayraning bo'linish jarayoni *E. coli* misolida batafsil o'rganilgan [3]. Shu bilan birga, tengsiz bo'linish misollari mavjud. Masalan, *Caulobacter crescentus* grammanfiy bakteriyaning qiz hujayralaridan biri harakatchan, uning kimyotaksis uchun bitta flagellumi bor. Ikkinchi hujayra

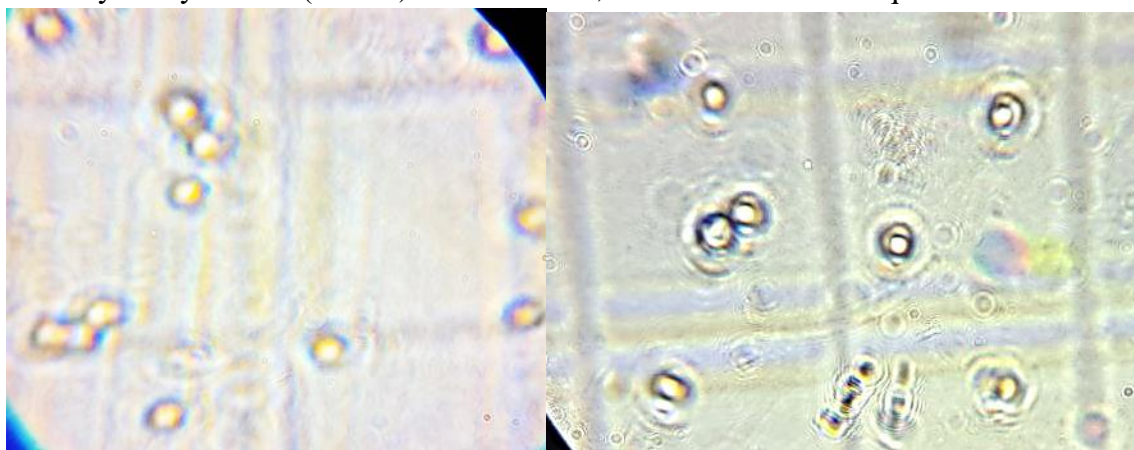
substratga biriktirilgan holda qoladi. Harakatlanuvchi hujayralar qisqa erkin suzish davridan keyin poya hujayralariga differensiyalanadi. Xromosoma replikatsiyasi va hujayra bo'linishi faqat biriktirilgan hujayra bosqichida sodir bo'ladi [4]. Optimal sharoitda bakteriyalar juda tez o'sadi va bo'linadi, dengiz *Pseudomonas* misoli tasvirlangan, ularning soni har 9,8 daqiqada ikki baravar ko'payadi [5]. Ko'pgina bakteriyalar noqulay sharoitlarda omon qolish uchun mo'ljallangan maxsus harakatsiz shakllarni shakllantirishga qodir. Ko'pgina gram-musbat bakteriyalar, ya'ni *Bacillus*, *Sporolaktobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina* va *Thermoactinomyces* avlodlari endosporalar hosil qiladi. Bu bakteriyalarning barchasi juda qalin hujayra devoriga ega, bu sporulyatsiya uchun zarur bo'lib tuyuladi [6]. Dukkakli o'simliklar (masalan, *Rhizobium* jinsi turlari) ildizlarida azot biriktiruvchi tugunlar hosil qiluvchi bakteriyalar bakteroidlar deb ataladigan differensial hujayralarni rivojlanishi mumkin. Bakteroidlar hajmi jihatidan vegetativ hujayralardan bir necha marta kattaroqdir, ular ko'pincha o'ziga xos X yoki Y shakliga ega. Yetuk bakteroidlarda hujayra oqsilining 10-12% nitrogenazadir [7]. Ko'p hujayrali organizmlardan farqli o'laroq, bir hujayrali organizmlarda (shu jumladan bakteriyalar) o'sish, ya'ni hujayra hajmining oshishi va hujayra bo'linishi bilan ko'payish bir-biri bilan chambarchas bog'liqdir [8]. Odatda bakteriya hujayralari ikkita ekvivalent qiz hujayralarga bo'linadi. Birinchidan, hujayra uzayadi, unda ko'ndalang septum hosil bo'ladi. Yakuniy bosqichda qiz hujayralari ajralib chiqadi. Bakterial hujayra bo'linishining o'ziga xos xususiyati bu bo'linish jarayonida replikatsiya qilingan DNKning bevosita ishtirok etishidir [9]. Ushbu umumiy farmakopeya monografiyasi ma'lum miqdordagi mikroorganizmlar hujayralarini o'z ichiga olgan mikroorganizmlarning suspenziyalaridan foydalanishni talab qiladigan mikrobiologik tadqiqotlar uchun qo'llaniladi [10]. Mikroorganizmlarning konsentratsiyasi suspenziya hajmining birligiga to'g'ri keladigan mikroorganizmlarning hujayralari soni sifatida ifodalanadi [11]. Mikroorganizmlarning konsentratsiyasini aniqlashda, suspenziyaning birlik hajmdagi tirik hujayralar soni (1 ml da hujayra hosil qiluvchi birlikgi - HHB/ml) bilan tirik hujayralar soni belgilanadi. Laboratoriya sharoitida mikroorganizm hujayralari sonini hisoblash tartibi oddiy usulda Petri likopchalaridagi ozuqa muhitida hosil bo'lgan koloniyalarni hisoblash orqali, yoki avtomatik qurilmalar yordamida amalga oshirilishi mumkin [12]. To'g'ridan-to'g'ri vizual hisoblash usullari mavjud, mikroorganizmlarni ozuqa muhitida emlashdan keyin koloniyalar sonini aniqlash, shuningdek mikroorganizmlarini ma'lum bo'yoqlar bilan bo'yashdan keyin mikroskop ostida hisoblash [13]. To'g'ridan-to'g'ri hisoblash usullari ozuqa muhitida mikroorganizmlarning HHB sonini eng to'liq hisobga olish imkonini beradi. Ularning samaradorligi yuqori bo'lishi ozuqa (optimal) muhiti va sharoitlarga bog'liq. Bundan tashqari, to'g'ridan-to'g'ri hisoblash usullari orqali o'rganilayotgan hujayralarning hajmi va morfologik ko'rsatkichlarini aniqlash imkoniyatini beradi. Sanoq kamerasida sanash 1 ml suspenziyadagi hujayralarning umumiy sonini aniqlashning eng keng tarqalgan usuli b'lib mikroskop yordamida hisoblanadi. Sanoq kameralarining bir nechta turlari mavjud bo'lib, ularning asosiy tuzilishi bir xil: Tom-Zeys, Burker, Goryaev, Neubauer panjarali sanoq kamerasi [14]. Goryaevning hisoblash kamerasi - bu ko'ndalang kesiklar qo'llaniladigan maxsus shisha slayd bo'lib, uchta ko'ndalang tartibga solingan tekis maydonlarni hosil qiladi. O'rta platforma uzunasiga tirqish bilan yana ikkita platformaga bo'lingan, ularning har birida ma'lum bir maydonning kvadratlari o'yilgan panjara mavjud. Goryaev kamerasidagi o'rta platformaning har ikki tomonida o'rtadan 0,1 mm balandroq yana ikkita maydon bor. Mikroorganizmlar suspenziyaning loyqaligini ma'lum bir to'lqin uzunligidagi optik zichlikni o'lchash orqali aniqlash mumkin. Namunadan o'tadigan yorug'lik nurining intensivligi tarqalish (nefelometriya) yoki

yorug'likning yutilishi (turbidimetriya) bilan kamayadi. Nurning tarqalishi va yorug'likning yutilishi nafaqat suspenziyadagi hujayralar soniga, balki ularning hajmi va shakliga ham bog'liq. Ko'proq konsentrlangan suspenziyalar uchun odatda turbidimetrik usul qo'llaniladi. Juda suyultirilgan suspenziyalar uchun nefelometriya usuli katta sezuvchanligi tufayli qo'llaniladi. Nefelometrning ishlashi tekshirilayotgan muhit tomonidan tarqalgan yorug'lik intensivligini standartning tarqalish intensivligi bilan solishtirishga asoslangan. Sinov paytida namuna yorqin tarzda yoritiladi, so'ngra uzatilgan nurlanish yoki ma'lum bir burchak ostida tarqalgan nurlanishning intensivligi o'lchanadi. Muhitdagi hujayralar sonini aniqlash uchun yorug'likning tarqalishi miqdori va suspenziya hajmi birligiga to'g'ri keladigan hujayralar soni o'rtasidagi munosabatni aks ettiruvchi kalibrash grafigi qo'llaniladi.

Materiallar va tadqiqot usullari: KM suspenziyali ozuqa muhiti, kolba, chayqatqich, Goryaeva hisoblash oynasi, qoplagich oyna, distillangan suv, gensinviolet, mikroskop, *Priestia megaterium* va *Pantoea agglomerans* bakteriya shtammlari. Tadqiqot uchun tanlab olingan bakteriya shtammlari uchun turli xildagi 6ta ozuqa muhitini tanlab olindi va shu ozuqa muhitlari ichidan dominant ozuqa muhit kartoshka dekstrozali suspenziya tanlab olindi. Tanlab olingan ozuqa muhitiga uglerod manbai sifatida vinochilik zavodlarida qolgan chiqindi mahsuloti melasso dan foydalanildi.

Tadqiqot natijalari.

Kartoshka melassa agarli ozuqa muhitiga probirkalarga 2 kun inkubatsiya qilingan *Priestia megateriu* va *Pantoea agglomerans* bakteriya shtammlari inoculumi (10^{8-9} HHB) dan ekuv material sifatida foydalanildi. Bakteriya shtammlari 250 ml Erlenmeyer kolbalariga ekildi va 37 °C haroratli 100 aylana/daqiqqa tezlikda chayqatgichda qo'yildi. 24 soatdan so'ng 3 qaytariqda bacterial suyuqlik 1:10 nisbatda steril distillangan suvda Gensian violet (*Gentianvioletum*) yordamida bo'yab suyultirildi (1-rasm). 1 kunda 10^{00} ; 11^{00} va 12^{00} soat oraliqlari tanlab olindi.



1-rasm. Goryaev hisoblash kamerasida bakteriya hujayralarining ko'rinishi

Goryaev hisoblash kamerasi yordamida 1 ml *Priestia megateriu* va *Pantoea agglomerans* bakteriya shtammlari suyuqligidagi mikroorganizmlarning hujayra hosil qiluvchi birligi quydagi formula asosida aniqlandi.

$$x = \frac{A * 1000}{HS} * N$$

A- bakteriyalar soni

1000- o'zgarmas son

N- suyulish soni

H- goryaev kamera chuqurligi

S- oynaning katta yuzasi

I-jadval**Goryaev kamerasida *Priestia megaterium* shtammining hujayra hosil qiluvchi birligini aniqlash**

Bakteriya shtammi	Sutkalar	Takrorlar soni (Soat)	Goryaev umumiy hisoblash kamerasidagi hujayralar soni					O'rtacha HHB	O'rta palata sanoq kamerasidagi hujayralarning umumiy soni
			1	2	3	4	5		
<i>Priestia megaterium</i>	1-sutka	10: ⁰⁰	1	3	6	8	4	64	2,560 mln
		11: ⁰⁰	19	31	24	10	27	355	14,200 mln
		12: ⁰⁰	40	33	31	24	15	422	16,800 mln
	2-sutka	10: ⁰⁰	33	32	44	39	48	196	784 mln
		11: ⁰⁰	46	38	34	43	50	211	844 mln
		12: ⁰⁰	55	63	48	60	67	293	1,172 mlrd
	3-sutka	10: ⁰⁰	83	79	88	90	92	432	1,728 mlrd
		11: ⁰⁰	96	93	99	100	104	492	1,968 mlrd
		12: ⁰⁰	110	113	118	120	99	560	2,240 mlrd

Birinchi kunda *Priestia megaterium* birinchi qaytariqda o'rtacha hujayralar soni 64 ta, kichik kvadratdagi hujayralarning umumiy soni 2,560 mln ni tashkil qildi. 1:10 nisbatda suyultirilgan Gensian violet (*Gentianvioletum*) bo'yog'ida bo'yaldi va mikroskop yordamida Uchinchi takrorlanishida bakteriyalarning umumiy hujayra hosil qiluvchi birligi 16,800 mlanni tashkil etdi (I-jadval). Ushbu jadvaldagi natijalarga asoslanib, suyultirilgan suspenziyadagi har bir plastinkada kamida 10 ta koloniya hosil qilgan, yashovchanligi saqlangan, faol tirik hujayralar hisoblandi va suyultirish 1:10 nisbatda o'rtacha uch takroriy nisbatda ko'rildi. Ushbu tadqiqotda har bir hisoblash kamerasidagi kamida 10 ta koloniya hosil qilgan yuqori darajada suyultirilgan inokulumda hayotga layoqatli hujayralarni hisoblash 5 kunda bir hil vaqt (3 soat) oralig'ida bakteriya hujayralari bo'linib ko'payishi va hosil bo'lishi kuzatildi.

II-jadval**Goryaev kamerasida *Pantoea agglomerans* shtammini hujayra hosil qiluvchi birligini aniqlash**

Bakteriya shtammi	Sutkalar	Takrorlar soni (Soat)	Goryaev kamerasida katta kvadratdagi mikroorganizmlar soni					O'rtacha HHB	O'rta palata sanoq kamerasidagi hujayralarning umumiy soni
			1	2	3	4	5		
<i>Pantoea agglomerans</i>	1-sutka	10: ⁰⁰	5	2	4	6	4	64	2,560 mln
		11: ⁰⁰	15	8	18	10	12	201	8,040 mln
		12: ⁰⁰	20	15	11	14	10	224	8,960 mln
	2-sutka	10: ⁰⁰	28	44	16	25	23	106	424 mln
		11: ⁰⁰	32	41	29	36	33	171	684 mln
		12: ⁰⁰	39	35	47	43	41	205	820 mln
	3-sutka	10: ⁰⁰	79	80	74	78	82	393	1,572 mlrd
		11: ⁰⁰	85	93	90	88	96	452	1,808 mlrd
		12: ⁰⁰	100	108	97	98	104	507	2,028 mlrd

Olingan natijalarga ko'ra *Pantoea agglomerans* shtammida hujayra sonining ko'payishi 1 sutkaning 1chi takrorlanishida *Priestia megaterium* bilan bir xil ko'rsatkichni namoyon etdi, ikkinchi takrorlanishda birinchi takrorlanishga nisbatan 8,040mln taga ko'payganligi kuzatildi (II-jadval). Uchunchi takrorlanishdan hujayralarning ortishi kuzatildi, to'rtinchi sutkada hujayra birligini ortishi bilan bir qatorda ozuqa muhitida bakteriya shtammining zichlashishi ortdi.

Xulosa. Tatqiqotdan asosiy maqsad *Priestia megaterium* va *Pantoea agglomerans* shtammlarining suyuq ozuqa muhitda hujayra hosil qilish birligini ortishi kuzatildi. Bu ikki shtamm bir xil ozuqa muhitda o'sishi va rivojlanishi namoyon bo'ldi. Bakterial suspenziya bilan o'simlikka ishlov berishda nechinchi sutkalar oralig'ida qo'llanilishi kuzatildi. Bakteriya shtamlari uch takrorlanishda bo'yoq bilan bo'yab ko'rilganda garaev kamerasida har bir plita va kvadratlar orasidagi bakteriyalarni sanash va kuzatish mumkinligi isbotini topdi. Bu ikki shtamm kartoshka melasso (KM) optimal ozuqa muhiti tanlab olindi hujayra sonining ortishi ozuqa muhitiga bog'liqligi kuzatildi.

REFERENCES

1. Koch A. L. [Control of the bacterial cell cycle by cytoplasmic growth](#). Critical Reviews In Microbiology. -2002.-V.28.. 1.-P. 61-77
2. Benjamin Lewin. Chapter 13: The replicon // [Genes VIII](#). -Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, -2004. -[ISBN 0131439812](#).
3. De Boer P. A. [Advances in understanding E. coli cell fission](#). Current Opinion In Microbiology. - 2010. -V. 13. №6. -P.730-737.
4. Ausmees N., Kuhn J. R., Jacobs-Wagner C. [The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape](#) // - 2003. -V.115. -№ 6. -P. 705-713.
5. Eagon RG. [Pseudomonas natriegens, a marine bacterium with a generation time of less than 10 minutes](#). Journal Of Bacteriology. -1962.-V.83. -P.736-737.
6. Balkwill D. L., Stevens Jr. S. E. [Effects of penicillin G on mesosome-like structures in Agmenellum quadruplicatum](#). Antimicrobial Agents And Chemotherapy. -1980.- V.17. -№ 3. -P. 506-509.
7. Пиневи́ч А.В. Микробиология. Биология прокариотов. Издательство С.-Петербургского университета, -2009. -Т.3. -С. 240-257.
8. Porter K.G., Feig Y.S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*-1980,-P:943-948.
9. Kirchman, D., Sigda, J., Kapuscinski, R.; Mitchell, R. Statistical analysis of the direct count method for enumerating bacteria. -*Appl. Environ. Microb.* -1982. 44, P: 376-382.
10. Montagna, P.A. Sampling design and enumeration statistics for bacteria extracted from marine sediments. *Appl. Environ. Microb.*-1982. -P.1366-1372.
11. Kepner R.L., Pratt J.R. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: Past and present. *Microbiol. Rev.* -1994. - P.603-615.
12. Seo E.Y., Ahn T.S., Zo Y.G. Agreement, precision, and accuracy of epifluorescence microscopy methods for enumeration of total bacterial numbers // *Appl. Environ. Microb.* - 2010.-P.1981-1991
13. Dobretsov S., Thomason J.C. The development of marine biofilms on two commercial non-biocidal coatings: A comparison between silicone and fluoropolymer technologies // *Biofouling* -2011. - P: 869-880.

14. Dobretsov, S.; Abed, R.M.M. Microscopy of biofilms. In *Biofouling Methods*, 1st ed // John Wiley & Sons Ltd: Oxford. UK. -2014. - P. 3–9.