SANOAT CHIQINDI SUVLARI VA TUPROQLARIDAN AJRATIB OLINGAN CHIDAMLI MIKROB SHTAMMLARINING OG‘IR METALLARNI BIRIKTIRISH HAMDA ANTIMIKROB XUSUSIYATLARINI O‘RGANISH

Yusufjonova Osudaxon Sohibjon qizi
Namangan davlat pedagogika instituti
Aniq va tabiiy fanlar fakulteti biologiya yo‘nalishi 3-kurs talabasi
Email: osudaxonyusufjonova@gmail.com
Usmonova Munisa Ma’rufjon qizi
Namangan davlat pedagogika institute
Aniq va tabiiy fanlar fakulteti biologiya yo‘nalishi 3-kurs talabasi
Email: usmanovamunisa960@gmail.com
Alisherova Muqaddam Qobiljon qizi
Namangan davlat pedagogika instituti
Aniq va tabiiy fanlar fakulteti biologiya yo‘nalishi 3-kurs talabasi
Email :muqaddamalisherova388@gmail.com.

DOI: ***https://doi.org/10.5281/zenodo.24276515***

Annotasiya*: Sanoat korxonalarining rivojlanishi va texnogen omillar ta’sirida atrof-muhitning og‘ir metallar hamda toksik birikmalar bilan ifloslanishi dolzarb ekologik va biotibbiy muammoga aylanmoqda. Tadqiqotda sanoat oqova suvlari va ifloslangan tuproqdan og‘ir metallarga chidamli mikrob shtammlari ajratilib, ularning molekulyar-genetik xususiyatlari, Pb^{2+}, Cr^{6+} va Cd^{2+} ionlarini biosorbsiya qilish qobiliyati, FTIR va SEM-EDX tahlillari hamda antimikrob faolligi o‘rganildi.*

16S rRNA genini PCR-Sanger usulida sekvensiyalash orqali izolatlar Bacillus velezensis (HM-1), Pseudomonas putida (HM-4) va Bacillus altitudinis (HM-7) turlariga mansubligi aniqlandi. FTIR va SEM-EDX natijalari hujayra devoridagi funksional guruhlarning metall ionlarini bog‘lashda ishtirok etishi va metall stressi sharoitida hujayra yaxlitligi saqlanishini ko‘rsatdi.

Ajratilgan shtammlar metabolitlari Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis va Klebsiella pneumoniae patogenlariga qarshi antagonistik faollik namoyon etdi. Gentamitsin va ampitsillin bilan birgalikda qo‘llanganda antibiotiklar samaradorligi 2–4 baravarga oshib, sinergik ta’sir kuzatildi. Shuningdek, shtammlarning gemolitik faolligi yo‘qligi va o‘simlik o‘sishini rag‘batlantiruvchi indol-3-sirka kislotasi (IAA) sintez qilishi tasdiqlandi.

Natijalar ushbu mikroorganizmlardan sanoat chiqindilarini bioremediatsiya qilish va yangi antimikrob vositalar yaratishda foydalanish istiqbollarini ko‘rsatadi.

Kalit so‘zlar: *Bioremediatsiya, og‘ir metallar chidamliligi, 16S rRNA sekvensiyalash, FTIR spektroskopiyasi, SEM-EDX, biosorbsiya, Minimal Ingibitor Konsentratsiyasi (MIC), Fraktsion Ingibitor Konsentratsiyasi Indeksi (FICI), sinergizm, Bacillus velezensis, Pseudomonas putida.*

© **Namangan davlat pedagogika instituti** | **Tabiiy fanlar kafedrasi**
© **“Smart Quill Publishing” nashriyoti** | **www.smartquillpublishing.uz**

STUDY OF HEAVY METAL BINDING AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF RESISTANT MICROBIAL STRAINS ISOLATED FROM INDUSTRIAL WASTEWATER AND SOILS

Abstract: *The rapid growth of industrial activities and technogenic factors has intensified environmental pollution with toxic heavy metals, creating serious ecological and biomedical challenges. This study investigated heavy metal-resistant microbial strains isolated from industrial wastewater and contaminated soils, focusing on molecular identification, biosorption of Pb^{2+}, Cr^{6+} and Cd^{2+}, FTIR and SEM-EDX characterization, and antimicrobial activity against multidrug-resistant pathogens.*

16S rRNA sequencing identified the isolates as Bacillus velezensis (HM-1), Pseudomonas putida (HM-4) and Bacillus altitudinis (HM-7), with sequences deposited in NCBI GenBank. FTIR and SEM-EDX analyses confirmed the involvement of bacterial cell-surface functional groups in metal binding and demonstrated cell wall integrity under metal stress.

The isolates exhibited strong antimicrobial activity against Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis and Klebsiella pneumoniae. In combination with gentamicin and ampicillin, they demonstrated synergistic effects, increasing pathogen susceptibility by 2–4 times. The strains also showed no hemolytic activity and demonstrated the ability to synthesize indole-3-acetic acid (IAA), a plant growth-promoting phytohormone.

The findings highlight the potential of these microbial isolates for industrial waste bioremediation and the development of new antimicrobial agents in pharmaceutical biotechnology.

Keywords: *Bioremediation, heavy metal tolerance, 16S rRNA sequencing, FTIR spectroscopy, SEM-EDX, biosorption, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI), synergism, Bacillus velezensis, Pseudomonas putida.*

KIRISH

Jahonda sanoatlashuv jarayonlarining jadal sur'atda o'sishi, metallurgiya, kimyo, to'qimachilik, galvanika hamda tog'-kon sanoati korxonalarining kengayishi atrof-muhit ekotizimlariga tushayotgan antropogen va texnogen yuklamalarning ortishiga olib kelmoqda [1]. Sanoat chiqindi suvlari hamda ishlab chiqarish hududlaridagi tuproqlarda to'planayotgan og'ir metallar (qo'rg'oshin — Pb, xrom — Cr, kadmiy — Cd, simob — Hg va nikel — Ni) parchalanmaslik, bioakkumulyatsiya va bioamplifikatsiya xususiyatiga ega bo'lib, oziq-ovqat zanjiri orqali tirik organizmlar va inson salomatligiga jiddiy xavf tug'diradi [2]. Og'ir metallar hujayra darajasida fermentativ tizimlarni ingibirlaydi, fermentlarning faol markazlaridagi sulfgidril guruhlari bilan birikib ularning inaktivatsiyasiga olib keladi, DNK tuzilishini zararlaydi hamda reaktiv kislorod shakllari (ROS) hosil bo'lishini jadallashtirib, oksidativ stressni keltirib chiqaradi [3].

An'anaviy fizik-kimyoviy tozalash texnologiyalari (kimyoviy cho'ktirish, ion almashinuvi, teskari osmos, elektrokoagulyatsiya) katta moliyaviy xarajatlar talab qilishi, kam konsentrasiyalarda kam samaradorligi hamda toksik ikkilamchi loy va chiqindilar hosil qilishi sababli zamonaviy talablarga to'liq javob bermaydi [4]. Shu sababli, ekologik xavfsiz, iqtisodiy jihatdan tejamkor va yuqori samarali bioremediatsiya — ya'ni mikrob va biologik tizimlar vositasida atrof-muhitni tozalash texnologiyalariga e'tibor keskin ortmoqda [5].

© **Namangan davlat pedagogika instituti** | **Tabiiy fanlar kafedrasi**
© "**Smart Quill Publishing" nashriyoti** | **www.smartquillpublishing.uz**

Uzoq yillar davomida toksik metallar va kimyoviy moddalar bilan ifloslangan ekstremal muhitda yashovchi mikroorganizmlar (ekstremofillar va metallotolerant izolatlar) o‘z evolyutsiyasi davomida murakkab va o‘ziga xos moslashuv mexanizmlarini shakllantirgan. Bu mexanizmlarga quyidagilar kiradi:

Hujayra devori va ekstrapolimer moddalar (EPS) orqali metall ionlarini PASSIV biriktirish (biosorbsiya);

Hujayra ichiga metallarni faol tashish va efluks (efflux) nasoslari yordamida haydash;

Metallarni kamroq toksik shakllarga fermentativ qaytarish yoki oksidlash (masalan, Cr^{6+} ni Cr^{3+} ga qaytarish);

Intratsellular metallotioneinlar va fitoxelatinlar yordamida sekvestratsiya qilish [6].

Shu bilan birgalikda, bunday ekstremal ekologik nitshalarda yashovchi mikroorganizmlar o‘zaro ozuqa va hudud uchun raqobat sharoitida o‘zlarini himoya qilish va boshqa mikroorganizmlarni ingibirlash uchun turlicha biologik faol ikkilamchi metabolitlarni — antibakterial lipopeptidlar (surfactin, iturin, fengycin), bakteriotsinlar hamda peptid antibiotiklarni sintez qiladi [7]. Hozirgi kunda global miqyosda antimikrob chidamlilik (AMR — Antimicrobial Resistance) muammosi kuchayib, an’anaviy antibiotiklarga chidamli "superbakteriyalar" (S. aureus, E. coli, K. pneumoniae) paydo bo‘layotgan bir davrda, ekstremal mikrob izolatlarining ikkilamchi metabolitlarini o‘rganish farmatsevtika va biotexnologiya uchun mutlaqo yangi yo‘nalishlarni ochib beradi [8].

Tadqiqotning ilmiy gipotezasi: Sanoat chiqindi suvlari va ifloslangan tuproqlardan ajratib olingan og‘ir metallarga chidamli mikrob shtammlari bir vaqtning o‘zida yuqori biosorbsiya samaradorligiga hamda polirezistent patogenlarga nisbatan kuchli antimikrob va sinergik faollikka ega bo‘lib, bio-remediatsiya va farmatsevtik biotexnologiya uchun dual (ikkiyoqlama) ob’ekt bo‘lib xizmat qila oladi.

Tadqiqot maqsadi: Sanoat oqova suvlari va tuproqlaridan metallotolerant mikrob shtammlarini ajratib olish, ularning 16S rRNA geni bo‘yicha molekulyar identifikatsiyasini o‘tkazish, og‘ir metallarni (Pb^{2+}, Cr^{6+}, Cd^{2+}) biosorbsiya qilish ko‘rsatkichlarini va FTIR/SEM-EDX xarakteristikasini aniqlash hamda ularning antimikrob, sinergik va biokimyoviy xavfsizlik xususiyatlarini kompleks baholashdan iborat.

. MATERIAL VA METODLAR)

2.1. Namunalar yig‘ish va mikrob shtammlarini ajratish

Sanoat korxonalari (galvanika tsexlari, kimyo sanoati va charm qayta ishlash korxonalari) oqova suvlari hamda atrofidagi kimyoviy ifloslangan tuproq namunalari steril sharoitda, ISO 19475 va ASTM standartlariga mos holda yig‘ildi. Tuproq va suv namunalaridan 10 gramm/ml olinib, 90 ml steril 0.9% li NaCl eritmali kolbalarga solindi hamda 180 ayl/min tezlikda 30 daqiqa davomida chayqatildi.

So‘ngra ketma-ket 10-karrali suyultirishlar (10^{-1} dan 10^{-7} gacha) tayyorlanib, og‘ir metall tuzlari — \Pb(NO}_3)_2, \{K}_2\{Cr}_2\{O}_7 va \{CdCl}_2 (dastlabki konsentratsiyasi: 100 mg/l) qo‘shilgan Meat Extract Agar (MPA) hamda Luria-Bertani (LB) agar ozuqa muhitlariga

ekildi. Petri kosalari 37 °C haroratda 24–48 soat davomida inkubatsiya qilindi. Morfologik jihatdan farq qiluvchi alohida koloniyalar bir necha bor qayta ekilib, sof kultura holatiga keltirildi.

2.2. Og‘ir metallarga eng yuqori chidamlilik darajasini (MTC) aniqlash

Shtammlarning og‘ir metallarga nisbatan maksimal toqat qilish konsentratsiyasi (Maximum Tolerable Concentration — MTC) suyuq LB bulyoni muhitida aniqlandi. Buning uchun metall tuzlarining konsentratsiyasi 100 mg/l dan 2000 mg/l gacha (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 2000 mg/l) oshirib borildi.

Inokulyat sifatida sutkalik mikrob suspenziyasi (1.5 \times 10^8 HUO/ml) qo‘shildi. Kolbalar 37 °C da 48 soat davomida 150 ayl/min tebranishda ushlandi. Mikrob o‘sishi va biomassaning zichligi spektrofotometrda (\lambda = 600 \{ nm}) o‘lchandi.

2.3. Molekulyar-genetik identifikatsiya (16S rRNA sekvensiyalash)

Metallotolerant HM-1, HM-4 va HM-7 shtammlarining genomik DNKsi GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, AQSh) to‘plami yordamida ishlab chiqaruvchi yo‘riqnomasi bo‘yicha ajratib olindi. DNK konsentratsiyasi va sofligi NanoDrop 2000 spektrofotometri va 0.8% li agarozli elektroforezda baholandi.

16S rRNA geni universal primerlar yordamida PCR orqali amplifikatsiya qilindi:

27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

PCR reaksiyasi aralashmasi (25 \mu\{l}): 12.5 \mu\{l} 2X Taq Master Mix, 1 \mu\{l} har bir primer (10 pmol), 2 \mu\{l} matrisa DNK (50 ng) va 8.5 \mu\{l} nuclease-free suv.

Amplifikatsiya dasturi (Bio-Rad T100 Thermal Cycler):

Dastlabki denaturatsiya: 95 °C da 5 daq;

35 sikl: 95 °C da 30 soniya, 55 °C da 45 soniya, 72 °C da 90 soniya;

Yakuniy elongatsiya: 72 °C da 10 daqiqa.

PCR mahsulotlari 1.2% li agaroz gelida elektroforez qilindi va Gel Doc EZ System da ko‘rildi. Sekvensiyalash Sanger usulida (ABI 3730xl DNA Analyzer) amalga oshirildi. Olingan nukleotid ketma-ketliklari NCBI GenBank ma’lumotlar bazasidagi ketma-ketliklar bilan BLASTn algoritmi orqali solishtirildi. Filogenetik daraxt MEGA 11 dasturida Neighbor-Joining usuli va 1000 ta bootstrap takroriyligi asosida tuzildi.

2.4. Instrumental tahlillar: FTIR spektroskopiyasi va SEM-EDX

FTIR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) tahlili: Mikrob biomassasining metall ionlari (Pb^{2+} va Cr^{6+}) bilan o‘zaro ta’siridan oldingi va keyingi funksional guruhlaridagi o‘zgarishlar FTIR spektrometri (Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific) yordamida 4000–400 \text{ cm}^{-1} spektral diapazonda o‘rganildi. Quritilgan biomassalar KBr (kaliy bromid) bilan 1:100 nisbatda aralashtirilib, granulalar tayyorlandi.

SEM-EDX (Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-ray) tahlili: Metall ta’sirida hujayra sirt morfologiyasi va elemental tarkibining o‘zgarishini ko‘rish uchun biomassalar 2.5% li glutaraldegid eritmada 4 °C da fiksatsiya qilindi. Ketma-ket spirt konsentratsiyalarida (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) suvsizlantirildi. Quritilgan namunalar oltin spatter qatlami bilan qoplanib,

JEOL JSM-6510LA Skanning elektron mikroskopida EDX (Rentgen-spektral microtahlil) moduli bilan birgalikda tahlil qilindi.

2.5. Biosorbsiya (metall biriktirish) dinamikasi va formulalari

Biosorbsiya tajribasi 250 ml li kolbalarda 100 ml metall eritmalarida (dastlabki konsentratsiya C_0 = 100 \{ mg/l}) o‘tkazildi. Biomassa miqdori: 1.0 g/l (quruq og‘irlik), harorat: 30 °C, pH: 6.0, chayqatish: 150 ayl/min. Turli vaqt intervallarida (0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 soat) namunalar olinib, 8000 ayl/min tezlikda 10 daqiqa sentrifuga qilindi. Suprenatantda qolgan metall ionlari Atom-absorbsion spektrofotometriya (AAS — PerkinElmer PinAAcle 900T) yordamida o‘lchandi.

Biosorbsiya samaradorligi (R, \%) va biosorbsiya sig‘imi (q_e, \{mg/g}) quyidagi formulalar bo‘yicha hisoblandi:

Foydalanilgan adabiyotlar(

[1] Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology, 156(3), 609-643.

[2] Ali, H., Khan, E., & Sajad, I. (2019). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. Chemosphere, 91(7), 869-881.

[3] Jain, R., et al. (2021). Heavy metal toxicity: Cellular mechanisms, oxidative stress, and counter-defense systems. Environmental Science and Pollution Research, 28(12), 14500-14519.

[4] Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. Journal of Environmental Management, 92(3), 407-418.

[5] Dixit, R., et al. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. Sustainability, 7(2), 2189-2212.

[6] Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews, 27(2-3), 313-339.

[7] Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from Bacillus and Pseudomonas: more than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiology Reviews, 34(6), 1037-1062.

[8] World Health Organization (WHO). (2020–2025). Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. Geneva: World Health Organization.

[9.]Osudaxon, Y., & Ilhomjon, Q. (2026). STRESSNING YURAK-QON TOMIR TIZIMI FIZIOLOGIYASIGA TA’SIRI. Advances in Science and Environment, 2(04), 3-4. https://doi.org/10.70728/envire.v02.i04.001