

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.27.06.2017.B.38.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

**ГЕНЕТИКА ВА ЎСИМЛИКЛАР ЭКСПЕРИМЕНТАЛ БИОЛОГИЯСИ
ИНСТИТУТИ**

РАСУЛОВ БАХТИЁР АБДУҒАФУРОВИЧ

**ДИАЗОТРОФ РИЗОБАКТЕРИЯЛАР ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЛАРИ
АСОСИДА КУМУШ НАНОЗАРЛАРИ ОЛИШ ВА УЛАРНИНГ
АНТИМИКРОБ ТАЪСИРИ МЕХАНИЗМЛАРИ ТАДҚИҚИ**

**03.00.04– Микробиология ва вирусология
(биология фанлари)**

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2019

Фан доктори (DSc) диссертацияси автореферати мундарижаси

Оглавление автореферата диссертации доктора наук (DSc)

Contents of dissertation abstract of doctor of science (DSc)

Расулов Бахтиёр Абдуғафурович

Диазотроф ризобактериялар экзополисахаридлари асосида кумуш нанозарралари олиш ва уларнинг антимикроб таъсири механизми тадқиқи.....3

Расулов Бахтиёр Абдугафурович

Изучение синтеза наночастиц серебра на основе экзополисахаридов диазотрофных ризобактерий и механизмов их антимикробного действия.....29

Rasulov Bakhtiyor Abdugafurovich

Study of synthesis of silver nanoparticles on the basis of exopolysaccharides of diazotrophic rhizobacteria and mechanisms their antimicrobial effect.....55

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works.....59

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.27.06.2017.В.38.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

**ГЕНЕТИКА ВА ЎСИМЛИКЛАР ЭКСПЕРИМЕНТАЛ БИОЛОГИЯСИ
ИНСТИТУТИ**

РАСУЛОВ БАХТИЁР АБДУҒАФУРОВИЧ

**ДИАЗОТРОФ РИЗОБАКТЕРИЯЛАР ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЛАРИ
АСОСИДА КУМУШ НАНОЗАРРАЛАРИ ОЛИШ ВА УЛАРНИНГ
АНТИМИКРОБ ТАЪСИРИ МЕХАНИЗМЛАРИ ТАДҚИҚИ**

**03.00.04– Микробиология ва вирусология
(биология фанлари)**

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2019

Фан доктори (DSc) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2019.2.DSc/B94 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация Генетика ва ўсимликлар экспериментал биология институтида бажарилган. Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме). Илмий кенгаш веб-саҳифаси (microbio@academy.uz) ҳамда «ZiyoNet» ахборот-таълим портали (www.ziynet.uz) манзилларига жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи: **Давранов Кахрамон**
биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар: **Тошмухамедова Шохиста Собировна**
биология фанлари доктори
Нормаҳаматов Нодирали Сохобаталиевич
кимё фанлари доктори
Буриев Забардаст Тожибоевич
биология фанлари доктори

Етакчи ташкилот: Тошкент давлат аграр университети

Диссертация ҳимояси Микробиология институти ва Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги DSc.27.06.2017.B.38.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2019 йил «__» июль соат 10-00 даги мажлисида бўлади (Манзил: 100128, Тошкент ш. Шайхонтохур тумани, А.Қодирий кўчаси 76 уй, Микробиология институти конференция залида бўлади. Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98; факс: (+99871) 241-92-71, e-mail: microbio@academy.uz

Диссертация билан Микробиология институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (__) рақами билан рўйхатга олинган). (Манзил: 100128, Тошкент ш. Шайхонтохур тумани, А.Қодирий кўчаси 7^б-уй, Микробиология институти маъмурий биноси, 3-қават, мажлислар зали. Тел.: (+99871) 241-92-28.

Диссертация автореферати 2019 йил «_____» июль куни тарқатилди.

(2019 йил «__» _____ рақамли реестр баённомаси)

Арипов Тахир Фатихович
Илмий даража берувчи Илмий кенгаш раиси
б.ф.д., профессор, академик

Жураева Роҳила Назаровна
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, б.ф.н., катта илмий ходим

Гулямова Ташхан Гафуровна
Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш қошидаги
Илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (фан доктори (DSc) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Бугунги кунда дунёдаинсоният юзлашаётган глобал муаммолардан бири турли патоген ва фитопатоген микроорганизмларнинг янги, агрессив расалари пайдо бўлаётгани ҳамда уларнинг ортидан жиддий касалликларнинг юзага келаётганидир¹. Ушбу патоген расаларга қарши анъанавий кураш чоралари самарасиз бўлиб қолмоқда. Шунингдек, биоцид хусусиятга эга бирикмалар – антибиотиклар, антимикроб табиатли қуйи молекулар бирикмалар ва бошқаларга нисбатан резистентлик ҳосил қилган патоген микроорганизмлар инсон саломатлигига хавф солиши кузатилган². Кумуш ва унинг бирикмаларининг нанозарралари кичик концентрацияларда патоген микроорганизмларнинг ўсиши ва ривожланишини самарали тўхтади. Бунда патоген популяция резистентлигини йўқотади. Бунда наноўлчамдаги кумуш нанозарралари хужайра деворидан цитоплазмага осонлик билан ўтади ва оксиллар, ДНК ва РНК биологик хусусиятларини йўқотади. Шу жиҳатдан, биологик макромолекула (биополимер) матрицаси асосида синтезланган, таркибида кумуш ёки кумуш бирикмалари нанозарраларини сақлаган нанобиокомпозитларилмий ва амалий аҳамиятга эга.

Жаҳонда кўпгина мамлакатларда ўтказилаётган илмий тадқиқотларда Ag, AgCl, TiO₂, Al₂O₃ нанозарралари сақлаган нанобиокомпозитларни синтезлаш, физик-кимёвий тавсифлаш тиббиёт ва қишлоқ хўжалиги қўллаш борасида илмий-тадқиқот ишлари олиб борилмоқда. Жумладан, метал нанозарралари ҳосил қилиш хусусиятига эга биополимерлар синтезловчи микроорганизмлар молекулар таксономияси, фаол штаммларнинг филогенетик шажараси, уларда биополимерлар синтези, ушбу жараёнга таъсир этувчи физик-кимёвий омиллар (ҳарорат, аэрация интенсивлиги, ўстириш давомийлиги, рН, турли ионлар, субстрат тури), олинган макромолекулар бирикмалардаги функционал гуруҳлар ва кимёвий боғлар табиати батафсил тадқиқ этилган. Биологик макромолекула (биополимер) матрицаси асосида кумуш ёки кумуш бирикмалари нанозарралари сақлаган нанобиокомпозитлар синтези, кичик концентрацияларда патоген микроорганизмлар хужайраларининг ўсиши ва ривожланишига биоцид таъсирини ўрганиш борасида ишлар олиб борилмоқда. Шу сабабли, популяциялари кескин ортиб кетган резистент патоген микроорганизмларга қарши курашда таркибида кумуш ва кумуш бирикмалари нанозарралари сақлаган нанобиокомпозитлардан фойдаланиш илмий ва амалий аҳамиятга эга.

Ўзбекистон қишлоқ хўжалигида экинларнинг турли патогенлар билан касалланишини олдини олиш, ҳосилдорлигини яхшилаш чора-тадбирларини яхшилаш чора-тадбирларини ишлаб чиқиш ва амалиётга жорий қилишга

¹Lara H. H., Ayala-Nunez N. V., Ixtapan-Turrent L., Rodriguez-Padilla C. Mode of anti viral action of silver nanoparticles against HIV-1// *J. Nanobiotechnol.*-2010.-№ 8.-p. 31–39.

² Kanmani P., Lim S.T., Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens // *Process Biochem.*-2013a.-№48.- p.1099-1106.

алоҳида эътибор қаратилмоқда. Бу борада, ғўзанинг *Fusarium oxysporum* f.sp.vainfectum ва *Verticillium dahliae* фитопатоген микромицетларига қарши кураш борасида муайян натижаларга эришилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «...қишлоқ хўжалигида интенсив усулларни, айниқса, замонавий сув ва ресурстежамкор агротехнологияларни жорий этиш³» вазифалари белгилаб берилган. Мазкур вазифаларни амалга оширишда, жумладан диазотроф ризобактериялар экзополисахаридлари матрицаси асосида кумуш ва кумуш нанозарралари синтез қилиш, физик-кимёвий хусусиятларини таҳлил этиш ва амалиётга қўллаш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 29 октябрдаги ПФ-5394-сонли «Қишлоқ хўжалиги соҳасини ислоҳ қилишнинг кўшимча ташкилий чора тадбирлари тўғрисида»ги Фармонлари, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 14 июндаги ПҚ-3855-сонли “Илмий ва илмий-техникавий фаолият натижаларини тижоратлаштириш самарадорлигини ошириш бўйича кўшимча чора-тадбирлар тўғрисида” қарорида ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг асосий устувор йўналишларига боғлиқлиги. Мазкур тадқиқотреспублика фан ва технологиялар ривожланишининг V. «Қишлоқ хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф-муҳит муҳофазаси» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмийтадқиқотлар шарҳи³. Метал нанозарралари биосинтезида қўлланиладиган макромолекулалар – экзополисахаридлар, уларнинг физик-кимёвий хусусиятлари ва модификацияси, экзополисахарид-асосли биофлокулянтлар синтезловчи микроорганизмлармолекуляр таксономияси ва генетикасига йўналтирилган илмий изланишлар дунёнинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, Hunan University, Shanghai Maritime University, Xiamen University, Guangxi University (ХХР), University of Fort Hare, University of Witwatersrand, University of Fort Hare (ЖАР), University of the Punjab (Покистан), Nevsehir University (Туркия), The Pensilvania State University (АҚШ), Gifu University (Япония), Gadjra Madha University (Индонезия), Korea University; Pukyong National University (Жанубий Корея);

³ Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Ўзбекистон Республикаси Президентининг фармони. 7 февраль, 2017 йил, ПФ-4947-сон.

³Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи: <https://www.journals.elsevier.com/bioresource-technology>; <https://www.journals.elsevier.com/biomaterials>; <https://link.springer.com/journal/12223>; <https://www.journals.elsevier.com/international-journal-of-biological-macromolecules>; <https://www.mdpi.com>; <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology>;

Kansai University (Япония); Brno University of Technology (Чехия), Northeast Forestry University, Yanshan University, Institute of Process Engineering, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, (ХХР); Palacky University (Чехия); Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтида (Ўзбекистон) тадқиқотлар олиб борилмоқда.

Макромолекула матрицасидан ҳам қайтарувчи, ҳам барқарорлаштирувчи сифатида фойдаланиб таркибида нанозарралар сақлаган нанобиокомпозитлар олиш бўйича қатор, жумладан қуйидаги устивор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: айрим замбуруғлардан (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizoctania*, *Pleurotus*, *Trichoderma*) култура суюқликлари ҳамда *Lactobacillus*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Streptomyces* каби айрим бактерия ва актиномицетлар экзополисахаридлари матрицаси асосида Ag ва AgCl нанозарралари сақловчи нанобиокомпозитлар олинган (Kansai University, Япония), ҳамда физик-кимёвий тавсифланган (Korea University, Pukyong National University, Жанубий Корея), таркибида нанозарралар сақлаган ва биополимерлар асосида синтезланган нанобиокомпозитлар синтези, уларнинг физик-кимёвий хусусиятлари аниқланган (ультра-бинафша ва инфрақизил спектроскопияси, рентгенспектрал-зондли микроанализ, ёруғлик электрон ва трансмиссион электрон микроскопия) Kansai University (Япония); Brno University of Technology (Чехия), термик барқарорлик ва антимикроб фаоллиги аниқланган (Northeast Forestry University, Yanshan University, Institute of Process Engineering, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry (ХХР), ЭПС матрицалари асосида бошқа нодир металллар (Au, Pt), бирикмалар (TiO_2 , Al_2O_3 , Ag_2SO_4) нанозарралари сақлаган нанобактериялар олинган (Islamic Azad University (Эрон), East China Normal University (ХХР).

Дунё амалиётида нанозарралар ҳосил қилишда иштирок этадиган биополимерлар ҳосил қилувчи микроорганизмлар бўйича қатор, жумладан қуйидаги устивор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: микроорганизмларнинг молекуляр таксономияси ва филогенетик қариндошлиги таҳлил қилиш; фаол штаммларнинг полисахарид-табиатли биополимерлар ҳосил қилиши ва улардаги боғлар ва функционал гуруҳларнинг кимёвий таркиби аниқлаш; биополимерлар синтезлаш усуллари ва шароитлари оптималлаштириш; *Lactobacillus*, *Gluconobacter* каби бактерия ва қатор микромицет ёрдамида Ag- ва AgCl-нанозарралари олиш усуллари такомиллаштириш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Адабиётларда экзополисахаридлар, экзополисахарид-асосли биофлокулянтлар синтезловчи микроорганизмлар – бактериялар ва актиномицетларни ажратиб олиш, скрининг қилиш ва уларнинг молекуляр таксономияси (Nwodo et al., 2014; Manivasagan et al., 2015; Okaiyeto et al., 2015); биополимерлар синтези ва синтез жараёнлари оптимизацияси, мономер ва урон кислоталарини аниқлаш (Xiong et al., 2010; Gaur et al., 2010; Zajsek et al., 2011; Usha et al., 2011; Castro et al., 2012; Singh and Saini, 2012; Chen et al., 2015); Ag/AgCl нанозарралари

синтезида қўллаш (Kanmani and Lim, 2013; Breitwieser et al., 2013; Abdel-Mohsen et al., 2014; Lee and Won, 2014; Chen et al., 2015); алоҳида синтезланган кумуш нанозарраларини бошқа макромолекулага “сингдириш” хусусиятлари аниқланган (Hassabo et al., 2014).

Бундан ташқари, бир қатор муаллифлар Ag/AgCl нанозарралари сақлаган нанобиокомпозитларни УФ-ва ИҚ-спектроскопияси, рентгенспектрал-зондли микроанализи, ёруғлик-электрон ва трансмиссион-электрон микроскопияси (Kanmani and Lim, 2013; El-Sheikh et al., 2013; Emam and Zahran, 2015; Abdel-Halim et al., 2015; Tummalapalli et al., 2015; Kibeche et al., 2015; Nazar et al., 2018), патоген бактериялар, замбуруғлар ва вирусларга қарши биоцид таъсири борасида тадқиқотлар эълон қилинган (Panacek et al., 2009; Lara et al., 2010; Rastogi et al., 2015).

Шуни таъкидлаш лозимки, нафақат диазотроф ризобактериялар, балки ўсимликлар билан ассоциатив симбиоз ҳосил қилувчи ризобактерияларнинг ЭПС ҳосил қилиши, кимёвий хусусиятлари – мономер таркиби, боғланган оқсил микдори бўйича алоҳида тадқиқотлар олиб борилмаган. Биополимерлар синтезловчи бактерияларнинг молекуляр таксономияси, филогенетик шажараси аниқланмаган ҳамда *Azotobacter*, *Rhizobium* ва *Bradyrhizobium* туркумига мансуб диазотроф ризобактерияларнинг ЭПСларини нанобиотехнологияда қўллаш борасида маълумотлар учрамайди. Шунга кўра, Ўзбекистонда нанобиотехнологияда ҳам қайтарувчи, ҳам стабилловчи хусусиятга эга макромолекулаларни синтез қилиш, жараёнини оптималлаштириш, нанобиокомпозитлар ҳосил қилиш, физик-кимёвий хусусиятларини тадқиқ этиш ва улардан агрессивлашган ҳамда резистент формаларни ҳосил қилган патогенларга қарши курашда фойдаланиш муҳим илмий-амалий аҳамият касб этади.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтининг илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-А8-Т015 "Ўза патоген замбуруғлари (*Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectedum ва *Verticillium dahliae*) мониторинги, молекуляр-генетик тавсифи ва уларга қарши курашнинг комплекс (микробиологик ва нанобиотехнологик) биотехнологияси асосларини ишлаб чиқиш ҳамда амалиётга жорий этиш" (2015-2017), Ўзбекистон-ХХР қўшма лойиҳаси бўйича М/Ўзб-КНР-03/15 “Диазотроф ризобактериялар биомолекулалари (поли-β-гидроксибутират ва экзополисахаридлар) қўллаш орқали ўза ва буғдойнинг шўрланиш ҳамда қурғоқчиликка чидамлилигини ошириш”(2016-2017) мавзуларидаги фундаментал ва амалий лойиҳалари доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади диазотроф ризобактериялар штаммлари экзополисахаридлари асосида кумуш нанозарраларини синтезлаш ва уларнинг антимиқроб хусусиятларини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари қуйидагилардан иборат:

Экзополисахаридлар синтезловчи фаол диазотроф ризобактерияларни ажратиб олиш ва скрининг қилиш;

скрининг қилинган штаммларнинг морфологик-културал хусусиятларини аниқлаш ваидентификациялаш, оптимал озуқа муҳити ва ўстириш шароитларини танлаш;

штаммларнинг экзополисахаридлар ҳосил қилиш жараёнларининг молекуляр-генетик асослари ҳамда экзополисахаридлар синтезига жавобгар генлар ёки ген-кластерларини аниқлаш ва уларнинг экспрессиясига субстрат ҳамда ташқи омилларнинг таъсирини асослаш;

A.chroococcum XU1, *B.japonicum* 36 ва *R. radiobacter* SZ4S7S14 штаммларида экзополисахаридлар синтези, жараёнга таъсир қилувчи физик-кимёвий омиллар ҳамда биополимерларнинг кимёвий таркибини аниқлаш;

штаммларнинг экзополисахаридларматрицалари асосида Ag ва AgCl нанозарралари синтези, нанокolloид суспензияларУФ-спектроскопияси, олинган нанобиокомпозитлар ИҚ-спектроскопияси, рентгенспектрал-зондли микроанализи, ёруғлик-электрон ва трансмиссион-электрон микроскопияси аниқлаш;

алоҳида синтезланган Ag нанозарраларини *R. radiobacter* SZ4S7S14 экзополисахаридлар-асосли биополимер матричасига “сингдириш” шу усулда олинган нанозарраларнинг кластерларга уюшишини олдини олиш ва нанозарралар морфологиясини УФ-спектроскопияси асосида баҳолаш;

алоҳида синтезланган кумуш нанозарраларини *R. radiobacter* SZ4S7S14 экзополисахаридлар-асосли биополимерига “сингдириш” орқали олинган янги нанобиокомпозитнинг (^{imp}AgNPs) физик-кимёвий хусусиятларини таҳлил этиш;

таркибида Ag ва AgCl сақлаган наноккомпозитларнинг патоген микроорганизмлар – *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectedum ва *Verticillium dahliae* га қарши антимиқроб таъсир механизмларини тадқиқ этиш;

олинган натижалар асосида таркибида экзополисахаридлар сақлаган биопрепарат ҳамда нанобиокомпозит олиш лаборатория регламентини ишлаб чиқиш.

Тадқиқотнинг объекти экзополисахаридлар синтезига скрининг асосида танлаб олинган *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 ва *R. radiobacter* SZ4S7S14 штаммлари, уларнинг биополимерлари ва шу биополимерлар асосида олинган, таркибида кумуш нанозарраси сақлаган нанобиокомпозитлар ҳисобланади.

Тадқиқотнинг предмети–экзополисахаридлар синтез қилувчи диазотроф ризобактерияларни ажратиш, скрининг қилиш, танлаб олинган штаммларнинг экзополисахаридлар синтезлаши, ушбу жараёнга таъсир этувчи физик-кимёвий омилларни тадқиқ этиш, биополимерларнинг кимёвий таркибини аниқлаш; экзополисахаридлар матричаси асосида таркибида кумуш нанозарралари сақлаган нанобиокомпозитлар синтези, уларни тадқиқотнинг физик-кимёвий усуллари асосида тавсифлаш ҳамда уларнинг айрим патоген бактерия ва замбуруғларга антимиқроб таъсир механизмларихисобланади.

Тадқиқотнинг усуллари. Микробиологик, физиологик, бионанобиотехнологик, биокимёвий ва молекуляр-генетик усуллардан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

илк бор ажратиб олинган диазотроф ризобактерияларнинг экзополисахаридлар синтезига скрининги натижасида учта фаол *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 ва *R. radiobacter*SZ4S7S14 штамлари танлаб олинган ва идентификацияланган;

штамmlарнинг турли субстрат ва шароитда экзополисахаридлар ҳосил қилиш хусусиятлари аниқланган ҳамда биополимерлар синтезининг оптимал шароитлари танланган;

илк бор *Rhizobium radiobacter* турида экзополисахаридлар биосинтезида иштирок этувчи, *exoK* ва *exoM* генларини ўз ичига олган йирик ген-кластери аниқланган, ҳамда манноза қўшилган шароитларда *exoK* ва *exoM* генларининг экспрессияланиши кучайиши, туз стрессиде эса камайиши, ҳамда нисбий экспрессияланиш фаоллиги кўра якуний метаболит – ЭПСнинг мономер таркиби кескин ўзгариши исботланган.

A.chroococcum XU1, *B.japonicum* 36 ва *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамлари ҳосил қиладиган экзополисахаридларнинг физик-кимёвий хусусиятлари, мономер таркиби ва субстратга кўра ЭПС структурасида ўзгаришлар бўлиши аниқланган ва биополимерларнинг ИҚ-спектрлари таҳлили гидроксил (-ОН) гуруҳида миқдорий ўзгаришлар бўлиши асосланган;

A.chroococcum XU1, *B.japonicum* 36 ва *R. radiobacter*SZ4S7S14 штамлари экзополисахаридлар асосида ютилиш максимумлари 400-420 нм бўлган AgНЗ, 250-275 нм бўлган AgCl-НЗ синтезланган;

нанобиокомпозитлар таркибидаги наноўлчамдаги Ag рентгенструктур таҳлили унинг 2θ соҳанинг 47.5° , 55.5° ва 64.5° даражаларида ҳосил бўлиши (*B.japonicum* 36 штамми ЭПС асосида олинган нанобиокомпозит) ҳамда *A.chroococcum* XU1 ЭПС асосида синтезланган AgCl-НЗ эса 2θ соҳанинг 27.64° , 32.24° , 46.2° , 54.78° , 57.44° , 67.42° , 74.4° ва 76.6° да диффракцион спектр чўкқилари намоён бўлиши аниқланган.

янги усул асосида алоҳида синтезланган AgНЗ *R. radiobacter* SZ4S7S14 экзополисахаридларига сингдириш асосида янги турдаги нанобиокомпозит олинган ва физик-кимёвий тавсифланган;

барча нанобиокомпозит намуналарнинг патоген бактерия ва замбуруғларга қарши антимиқроб таъсир механизмлари аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

экзополисахаридлар синтезловчи *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 ва *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамлари селекция қилиниб, уларнинг морфолого-културал ва биокимёвий хусусиятлари тавсифланган;

штамmlарни турли субстратлар ва шароитларда ўстириш орқали экзополисахаридлар ҳосил қилиш имкониятлари аниқланган;

штамmlарнинг экзополисахаридлар матрицалари асосида таркибида кумуш наноэрозларни сақлаган нанобиокомпозитлар синтез қилинган, физик-

кимёвий усуллари орқали биополимер матричасида наноўлчамдаги Ag ва AgCl нанозарралари мавжудлиги исботланган. Нанозарралар морфологияси ва барқарорлиги тавсифланган;

алоҳида синтезланган Ag нанозарраларини *R. radiobacter* SZ4S7S14 матричасига сингдириш орқали нанозарраларнинг кластерларга уюшишини олдини олишга имкон берадиган “қўш биологик тизим” усули таклиф этилган ва янги турдаги нанобиокомпозит олинган;

синтез қилинган нанобиокомпозитлар патоген микроорганизмлар, жумладан *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectedum ва *Verticillium dahliae*га қарши кучли антимиқроб таъсири ва уларнинг ҳужайра деворларида ўзига хос шишлар, туйнуклар ҳосил бўлиши аниқланган.

Патоген микроорганизмларга қарши самарали курашиш имкониятини берувчи *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 ва *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамлари биополимерлари матричалари ҳамда Ag-НЗ ва AgCl-НЗларидан иборат нанокolloид тизими ишлаб чиқилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончилиги. Ҳар бир тадқиқот тажрибалари энг камида 3 мартадан ўтказилганлиги, бу эса энг ишончли ва барқарор натижаларни ўртача қийматини ҳисоблаш имконини берганлиги билан асосланган. Экспериментал маълумотларда статистик хато, ўртача, ишончилиқ интерваллари, стандарт оғишларни ҳисоблаш STATISTICA 6.0 компьютер дастури ва стандарт методлар ёрдамида олиб борилган. Натижаларни статистик аҳамиятини аниқлаш учун Стъюдентнинг t-критерийси ҳисоблаб чиқилган.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 ва *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамлари биополимерлари синтезланиб, физик-кимёвий хусусиятлари тавсифланган. Ушбу биоматериаллар асосида Ag-НЗ ва AgCl-НЗлари сақлаган нанокolloидлар ҳосил қилиниши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти таклиф этилган янги авлод нанобиокомпозитлари патоген микроорганизмларга қарши биоцид воситалар ҳисобланади. Бундан ташқари, алоҳида синтезланган нанозарраларнинг бошқа полимер матричасига сингдириш барқарорлиги ва кучли биоцид таъсирга эга нанобиокомпозитлар олинishi билан асосланади. Нанобиокомпозитлар суспензияси – нанокolloидлар ёрдамида ғўза патогенлари *Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectedum ва *Verticillium dahliae* ривожланишини тўхтатиш мумкин. Шунингдек, барқарор, морфологик ўзгаришларга учрамаган ва алоҳида кластерларга уюшмаган кумуш нанозарралари кенг спектрдаги патогенларга қарши қўлланишига хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Диазотроф ризобактериялари экзополисахаридлари асосида “Биоазот” биопрепарат яратиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

индол-3-сирка кислотаси ва гиббереллин ҳосил қилувчи, тузга чидамли *Azotobacter chroococcum* N1 бактерия штамми учун Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлиги томонидан ихтиро патенти (IAP 04887, 2012) олинган. Натижада шўрланган тупроқларда ўсувчи ғўза (*Gossypium hirsutum* L.) ва буғдойнинг (*Triticum aestivum* L.) илдиз атрофи ва илдиз орқали озиклантирувчи препаратлар тайёрлаш имконини берган.

“Биоазот” биопрепарати Тошкент вилояти, Оққўрғон туманида пахта ҳамда маккажўхори ва картошка экин майдонларига жорий этилган (Ўзбекистон Республикаси Қишлоқ хўжалиги вазирлигининг 2018 йил 11 ноябридаги 02/023-221-сон маълумотномаси). Натижада қишлоқ хўжалик экинларининг ҳосилдорлиги, тупроқ унумдорлиги ошиши, шўр тупроқлар таркибидаги тузларнинг боғланиши ва ўсимликларнинг патоген микроорганизмларга нисбатан чидамлилиги ортиши имконини берган;

диазотроф ризобактериялар ва уларнинг экзополисахаридлари асосида “Биоазот” биопрепарати Ўзбекистон Республикаси Давлат кимё комиссияси томонидан Ўзбекистон қишлоқ хўжалигида қўллаш учун рухсат берилган (Ўзбекистон Республикаси Кимёлаштириш ва ўсимликларни химоя қилиш воситалари давлат комиссиясининг 2018 йил 23 апрелдаги 1А 1670 гувоҳномаси). Натижада фермер хўжалиқларининг иқтисодий самарадорлик кўрсаткичлари яхшиланиши, пахта, маккажўхори ва картошка экинларининг ҳосилдорлиги ошишига имкон берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Диссертация ишининг натижалари 7 та халқаро ва 10 та Республика илмий-амалий конференцияларида муҳокамадан ўтган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича 23 та илмий иш чоп этилган, шулардан 13 таси илмий мақола бўлиб, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда, жумладан, 5 таси республика нашрларида, 7 таси хорижий журналларда нашр этилган, 1 та ихтиро патенти олинган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, тўрт боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 167 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

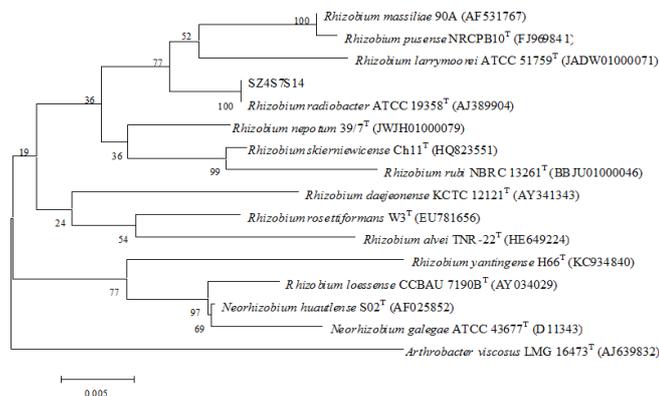
Кириш қисмида тадқиқот мавзусининг долзарблиги, аҳамияти ва зарурати асосланиб, унинг мақсад ва вазифалар, объект ва предметлари тавсифланган, Республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мовофиқлиги кўрсатилган, ҳозирги кунда хорижда олиб борилаётган изланишлар қисқача шарҳланган, тадқиқот ишининг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти кўрсатилган, уларни амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг адабиётлар шарҳи бўлимида микроорганизмлар, жумладан бактериялар ва актиномицетларда экзополисахарид (ЭПС) асосли биополимерлар синтези, уларнинг физик-кимёвий хусусиятлари, айрим продуцентларнинг молекуляр таксономияси, ЭПС матрицалари асосида Ag-ва AgCl-нанозарралари (Ag-НЗ, AgCl-НЗ) биосинтези, олинган нанокөмпозитларнинг хусусиятлари – морфологияси, барқарорлиги, наноўлчамдаги металл НЗни аниқлаш, шунингдек НЗларнинг патоген микроорганизмлар хужайрасига таъсир этиш механизмлари кенг ёритилган. Нанокөмпозитларнинг юқори резистент патогенларга қарши биоцид воситалар сифатида қўлланиши шарҳланган.

Диссертациянинг «Тадқиқотнинг манба ва усуллари» деб номланган иккинчи бобида табиий манбалардан – ўсимлик ризосфераси ва илдиз туганакларидан диазотроф ризобактерия штамmlарини ажратиш, микробиологик тозалаш, уларнинг морфологияси, физиологияси ва биокимёвий хусусиятлари, фаол штамmlарни 16S рРНК ген-секвенси асосида молекуляр идентификациялаш, ЭПС синтези ва ЭПС матрицаси асосида Ag-НЗ ва AgCl-НЗ биосинтези, мониторинги, олинган нанокөмпозитларнинг хусусиятлари – морфологияси, барқарорлиги, наноўлчамдаги металл НЗни аниқлаш, шунингдек НЗларнинг патоген микроорганизмлар хужайрасига таъсирини ўрганиш усуллари ёритилган.

Диссертациянинг «Тадқиқот натижалари ва уларнинг муҳокамаси» деб номланган учинчи бобида диссертациянинг асосий илмий натижалари келтирилган. Жумладан, “ЭПС синтезловчи диазотроф ризобактерияни ажратиш, скрининг қилиш ва фаол штамmlарнинг молекуляр-генетик идентификацияси, морфолого-културал ва физиолого-биокимёвий хусусиятлари” деб номланган 3.1-қисмида ўсимлик ризосфераси тупрок намуналари ва илдиз туганакларидан диазотроф ризобактерияларни ажратиш, ЭПС синтезига скрининги, фаол штамmlарнинг морфолого-културал ва физиолого-биокимёвий хусусиятлари ва 16S рРНК ген-секвенси асосида молекуляр идентификациялаш натижалари баён этилган.

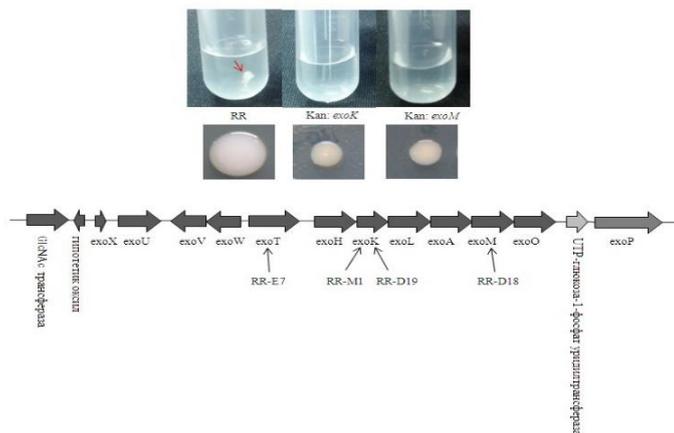
Янги ажратилган ва коллекцияда мавжуд штамmlарнинг ЭПС синтезига скрининги асосида *B. japonicum* 36 ($5,6 \pm 0,25$ г/л ЭПС), *Rhizobium radiobacter*. SZ4S7S14 ($3,6 \pm 0,23$ г/л ЭПС) ва *A. chroococcum* XU1 ($3,2 \pm 0,2$ г/л ЭПС) кейинги тадқиқотлар танлаб олинди. Мазкур штамmlар ўстиришнинг дастлабки кунлариданоқ фаол равишда ЭПС синтез қилганлиги билан қолган штамmlардан фарқланди. Ўстиришнинг 48- ва 72-соатида ушбу штамmlарнинг култура суюқликларида максимал миқдорда ЭПС ҳосил бўлгани кузатилди. Аввалги тадқиқотлар доирасида ўрганилган *B. japonicum* 36 ва *A. chroococcum* XU1 штамmlарининг тур таркиби маълум бўлганлигидан *Rhizobium* sp.SZ4S7S14 16S рРНК ген-секвенси асосида молекуляр идентификация қилинди. Мазкур штамmlнинг *Rhizobium radiobacter* 19358^(T) (AJ389904) штаммига 100% мувофиқ келди. 16S рРНК ген-секвенси асосида қурилган филогенетик таҳлил натижасига кўра штамм *Rhizobium radiobacter* тури сифатида идентификация қилинди (1-расм).



1-расм. *Rhizobium sp.* SZ4S7S14 штаммининг филогенетик шажараси

A. chroococcum XU1, *B. japonicum* 36 ва *R. radiobacter* SZ4S7S14 штаммлари кейинги тажрибалар учун тадқиқот манбаси сифатида танлаб олинди. Ушбу штаммларнинг морфологияси, физиологияси ва айрим биокимёвий хусусиятлари тадқиқ этилди. Жумладан, штаммларнинг азотсиз озуқа муҳитларда ўса олиш қобилияти, атмосфера азоти ҳисобига иккиламчи метаболитлар, жумладан ЭПС-асосли биополимерлар синтезлай олиши эътиборга молик. Бу жиҳатдан айниқса *A. chroococcum* XU1 катта аҳамиятга эга эканлиги тажрибалар давомида аниқланди.

Шунингдек, фаол штаммларнинг ЭПС ҳосил бўлишида иштирок этадиган генлар, уларнинг экспрессияланиши тадқиқ этилди. Эътиборга молик жиҳат шуки, *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 штаммининг транспозон мутагенез йўли билан олинган мутант ва ёввойи шакллари солиштирма таҳлили асосида ЭПС1 туркумига мансуб экзополисахаридлар синтезига жавобгар *exoK* ва *exoM* генлар тўплами мавжуд эканлиги аниқланди. Бу эса аввалдан маълум бўлган ЭПС синтезига жавобгар йирик ген кластерига мувофиқ келишини кўрсатди (2-расм).



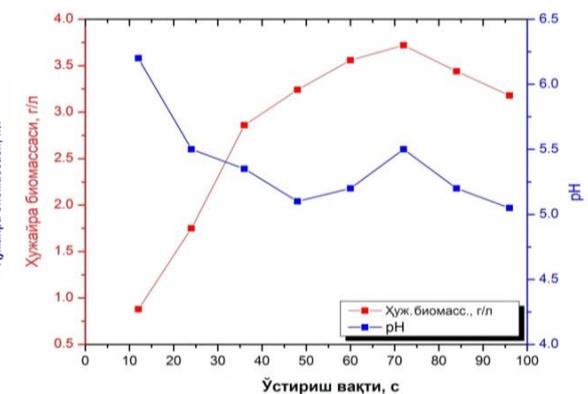
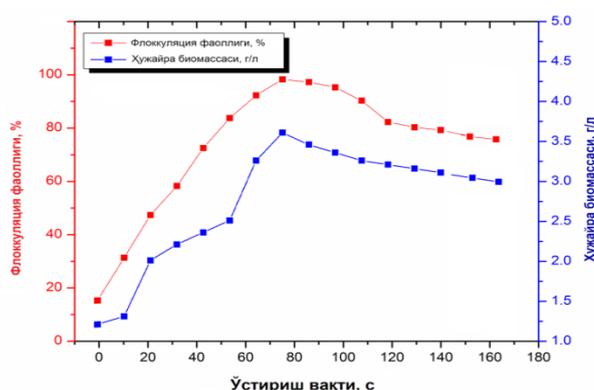
2-расм. *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 штаммида ЭПС синтезига жавобгар йирик ген кластери (*exoK* ва *exoM* генлари) идентификацияси

Ушбу *exoK* ва *exoM* генларининг RT-PCR ва qRT-PCR асосида таҳлили экспрессияланиш фаоллиги ҳақида хулоса бера олишини назарда тутган ҳолда турли углерод манбаларида кузатувлар олиб борилди. *Azotobacter*

chroococcum XU1, *Azotobacter chroococcum* N1 ва *Bradyrhizobium japonicum* 36 штамларида аниқланган ЭПС-синтезига жавобгар генлар тавсифи (натижалар киритилмади) адабиёт манбаларига мувофиқ келишини кўрсатди.

Аниқланган ушбу генлар, жумладан *exoK* ва *exoM* генларининг турли ўстириш муҳитларида ҳар хил экспрессияланиши эса физик кимёвий хусусиятлари фарқланувчи ЭПСлар синтезланишига олиб келди. Бу жиҳат, керакли физик-кимёвий хусусиятли диэлектрик матрица олиш учун муҳим бўлган омиллардан бири ҳисобланади.

“Фаол штаммларда ЭПС синтези ва унга таъсир этувчи омиллар тадқиқи. Биополимерларнинг физик-кимёвий хусусиятлари” номланган 3.2-қисмида танлаб олинган *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 ва *R.radiobacter* SZ4S7S14 штамларида ЭПС ҳосил бўлишига углерод/азот манбалари, рН, катионлар таъсири, шунингдек айрим физик-кимёвий хусусиятлари – ИҚ-спектрлари таҳлили, электрон-зондли микроанализи, ёруғлик-электрон микроскопияси, мономер таркиби тадқиқ этилган. Штаммларнинг ЭПС синтези бир-бирига деярли ўхшаш равишда амалга ошган бўлсада, улар орасида *R.radiobacter* SZ4S7S14 штамми фаоллиги билан ажралиб турди (3а,б-расмлар).



3а-расм. Ўстиришнинг логарифмик фазасида *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамми ЭПС-оксил синтези ҳужайра биомассаси, инкубация вақти ҳамда фаолляция фаоллигига ўртасидаги корреляция

3б-расм. Ўстиришнинг логарифмик фазасида *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамми ҳужайра биомассаси, муҳит рНи ва инкубация вақти ўртасидаги корреляция

Модификацияланган озуқа муҳитида (углерод/азот манбаси сифатида D-маннитоза/дрожжи экстракти қўлланилганда) мазкур штамм 5,41 г/л ЭПС синтезлади. Таъкидлаш ўринлики, барча штаммларда ЭПСсинтези ўстиришнинг логарифмик фазасида ҳужайра биомассаси, инкубация вақти ҳамда фаолляция фаоллигига корреляцияси кузатилди(3а-расм).

R.radiobacter SZ4S7S14 штаммида ЭПСнинг максимал синтези ўстиришнинг 72-соатига тўғри келди ва глюкоза/дрожжи экстрактли муҳитда 3.6 г/л биополимер синтезланди.

Ўстиришнинг 72-соатида фаолляция фаоллиги ҳам ўзининг максимум қиймати – 92% га етди. Шунингдек, штамм ҳужайра биомассасининг энг кўп миқдори ҳам айнан ўстиришнинг 72-соатида аниқланди. Фаолляция

фаоллиги ва биополимер синтези максимумига етганида озука муҳитидан энг кўп миқдорда – 3.5 г/л хужайра биомассаси ажратиб олинганини таъкидлаш лозим. Ўстиришнинг биринчи ва иккинчи кунлари (24 ва 49 с) муҳит рН ининг 7,3 дан 5,2 га қадар кескин тушиши кузатилди. Ўстиришнинг 60-72 с да эса рН5,0-5,1 гача ўзгарди (3б-расм).

Олинган натижалардан хулоса қилиш мумкинки, *R. radiobacter* SZ4S7S14 штаммининг ЭПС синтези ўстириш вақти, хужайра биомассаси ва муҳит рН ига боғлиқ тарзда амалга ошади, яъни штамм биомассаси ошиши билан ЭПС синтези ҳам кучаяди.

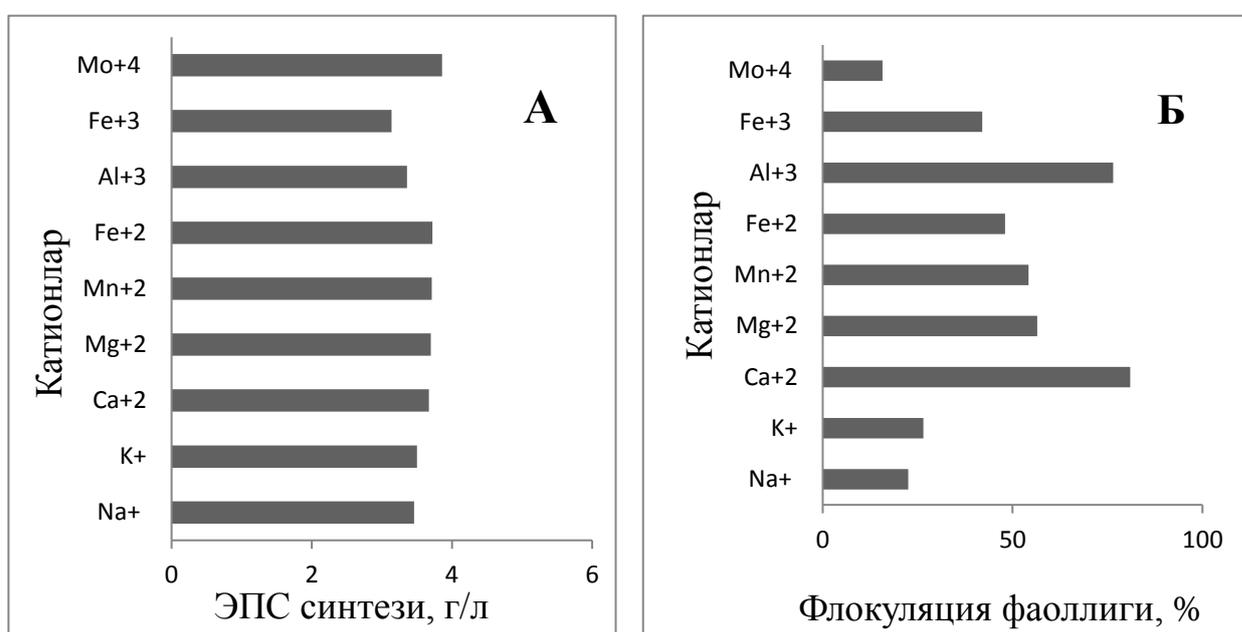
Тадқиқ этилган углерод ва азот манбалари орасида D-маннитоза ва дрожжи экстракти қўлланилган шароитларда *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамми 5,41 г/л миқдорда ЭПС синтезлаган бўлса, D-глюкоза қўлланилганда эса 96 с ўстириш натижасида 3.46 г/л ЭПС-оқсил комплекси ҳосил бўлди (1-жадвал). D-глюкоза қўлланилган шароитларга қараганда D-маннитозали субстратда 1,5 марта кўп ЭПС-оқсил синтезланганини эътиборга молик.

1-жадвал. Углерод ва азот манбаларининг *R. radiobacter* SZ4S7S14 штаммининг ЭПС-оқсил синтези ҳамда флокуляция фаоллигига таъсири

Углерод манбаси	ЭПС синтези, г/л	Флокуляция фаоллиги, %	Азот манбаси	ЭПС синтези, г/л	Флокуляция фаоллиги, %
D-Глюкоза	3,46	89	Дрожжи экстракти	3,46	92
D-Фруктоза	2,02	77	Пептон	3,41	88
Сахароза	3,51	90	Триптон	2,87	86,5
Малтоза	2,767	86	Сусло экстракти	1,65	74
D-Маннитоза	5,41	97	Мол гўшти экстракти	2,89	87,2
D-Манноза	3,981	92	Казаминокислота	2,5	80

Деярли ўхшаш ҳолат *A.chroococcum* XU1 ва *B.japonicum* 36 штаммларида ҳам кузатилди. Айниқса, *B. japonicum* 36 штаммида ҳам ЭПС синтези деярли *R. radiobacter* SZ4S7S14 штаммидек амалга ошди. Аммо кузатилган айрим фарқларни кўрсатиб ўтиш ўринли. *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамми ривожланиши ва ЭПС синтези учун D-маннитоза ва дрожжи экстракти оптимал субстрат бўлса, *B. japonicum* 36 штамми эса сахароза ва дрожжи экстрактдан иборат озука муҳитида кўп миқдорда хужайра биомассасига эга бўлди, ҳамда максимал миқдорда ЭПС синтезлади.

Юқорида таъкидлаб ўтилганидек, иккиламчи метаболитлар синтезида шунингдек макро- ва микроэлементларнинг ўрни ҳам катта ҳисобланади. Шундан келиб чиққан ҳолда штаммларнинг ЭПС синтезига ва биополимерлар флокуляция фаоллиги (қовушқоқлиги) Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Al^{+3} , Fe^{+3} ва Mo^{+4} каби катионларнинг микроб биополимерлари таъсири тадқиқ этилди. Ушбу тадқиқотда ҳам айнан юқорида келтирилган катионларнинг *R. radiobacter* SZ4S7S14 штаммида ЭПС синтези ва флокуляция фаоллигига таъсири тадқиқ этилди. Синалган катионлар орасида Mo^{+4} , Mg^{+2} , Mn^{+2} ва Fe^{+2} катионларининг глюкоза/дрожжи экстракти қўшилган озуқа муҳитида ЭПС синтезига ижобий таъсир этиши аниқланди. Айниқса Mo^{+4} нинг (Na_2MoO_4 тузи кўринишда) қолган катионлар, жумладан Mg^{+2} , Mn^{+2} ва Fe^{+2} га қараганда ЭПС синтезини кескин ошириши эътиборга молик (4а,б-расмлар).



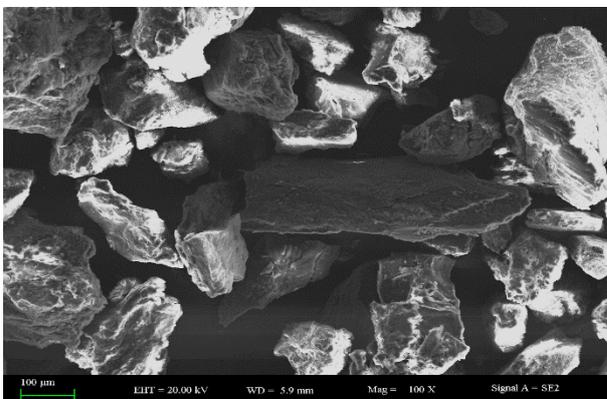
4-расм. Катионларнинг *R. radiobacter* SZ4S7S14 штаммининг ЭПС синтези (А) ва флокуляция фаоллигига (Б) (ЭПС-оқсил комплекси ҳолатида) таъсири

Mo^{+4} қўшилган глюкоза/дрожжи экстрактли озуқа муҳитида *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамми 3,86 г/л ЭПС-оқсил синтезлади. Бу эса Mo^{+4} қўшилмаган шароитларга қараганда 11,5% га кўп бўлди.

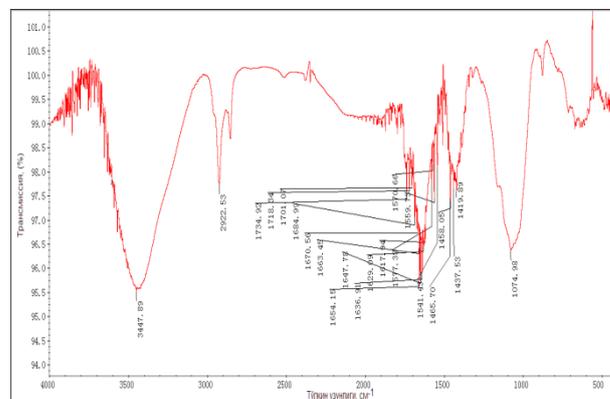
Сахароза ва дрожжи экстрактдан иборат озуқа муҳитида синтезланган ЭПС-оқсил комплекси (биофлокулянт) таркибида 94,5% полисахарид ва 3,05 % оқсил таркибга эга эканлиги аниқланди. *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамми билан олиб борилган тажрибаларда аниқланганидек, Mo^{+4} қўшилган сахароза/дрожжи экстрактли озуқа муҳитида *B. japonicum* 36 штамми максимал миқдорда ЭПС синтезлади. Ca^{+2} ва Al^{+3} катионлари қўлланилганда мазкур штаммининг ЭПСининг флокуляция фаоллиги бошқа катионларга қараганда анча юқори бўлди.

Диссертациянинг “Штаммлар синтезлаган ЭПС намуналари физик-кимёвий хусусиятлари” деб номланган 3.3-қисмида биоматериалларнинг физик ва кимёвий хусусиятлари ёритилган. Хусусан, *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамми синтезлаган ЭПСнинг электрон микроскопияси орқали олинган микросуратларда биополимернинг 100-350 мкм узунликдаги ғиштчалар кўринишида бўлиши аниқланди (5-расм). Унинг рентген-зондли микроанализи эса таркибида 51,47 % O ва 45,79 % C мавжуд эканини кўрсатди.

Кимёвий таркиби номаълум бўлган органик бирикмаларни тадқиқ этишда ИҚ-спектроскопияси муҳим ўрин тутди. Органик бирикмаларнинг ИҚ-спектрлари асосида кимёвий боғлар табиати ва мавжуд бўлган функционал гуруҳлар борасида хулоса яшаш мумкин. Шундан келиб чиққан ҳолда *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамми синтезлаган ЭПСнинг ИҚ-спектри олинди (6-расм).



5-расм. *R. radiobacter* SZ4S7S14 штамми синтезлаган ЭПСнинг электрон микроскопда кўриниши



6-расм. *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 штамми синтезлаган ЭПСнинг ИҚ-спектри

3447 cm^{-1} да гидроксил гуруҳларига (-OH) хос бўлган кенг ва кучли чўкки ҳосил бўлди. 2922 cm^{-1} да углеводлардаги C–H боғига хос бўлган кучсиз носимметрик чўкки ҳосил бўлди. 1730 cm^{-1} даги ютилиш соҳаси C=O га хос. 1630-1670 cm^{-1} даги ассиметрик тебраниш одатда –NHCOCH₃ гуруҳи таркибидаги C=O боғига хос ҳисобланади (Xiong et al., 2010). 1465,7 cm^{-1} даги ютилиш соҳаси C=C, 1074 cm^{-1} даги кенг ютилиш соҳаси эса гликозид боғлардаги C-O-C ва углеводлардаги O–H таъсир тебранишига мувофиқ келади.

Bradyrhizobium japonicum 36 штамми ЭПС 3420 cm^{-1} дан 800 cm^{-1} гача турли ютилиш максимумларини намоён этди. 3420 cm^{-1} даги кенг ва кучли ютилиш максимуми гидроксил гуруҳларининг (-OH) валент тебранишларига мувофиқ келади. 1236-1063 cm^{-1} соҳадаги кенг ютилиш максимуми гликозид боғларидаги C-O-C валент тебраниши ҳисобига юзага келади. 995 cm^{-1} соҳадаги интенсив чўкки эса углеводлар ҳисобига тўғри келади. Бундан ташқари, 820-972 cm^{-1} даги кучсиз чўкки полисахарид матричасидаги моносахаридлар ўртасидаги боғ ҳисобига ҳосил бўлади.

Azotobacter chroococcum XU1 штамми ЭПС макромолекуласи ИҚ-спектри ҳам юқоридаги намуналарга ўхшаш ютилиш максимумларини намоён этди. Жумладан, $3439,36\text{ см}^{-1}$ да О-Н; $2932,25\text{ см}^{-1}$ да типик углеводлардаги С-Н ассимметрик боғи тебранишига, 1730 см^{-1} даги чўкки С=О га хос ютилишига, $1650,76\text{ см}^{-1}$ даги ассимметрик тебраниш одатда – NHCOCH_3 гуруҳи таркибидаги С=О боғига, $1459,66\text{ см}^{-1}$ даги ютилиш соҳаси С=С боғига, 950 см^{-1} даги кенг ютилиш соҳаси эса углеводларга мувофик келади.

Rhizobium radiobacter SZ4S7S14 штамми синтезлаган ЭПС 76,2% умумий углеводлар, 12,7 % оксил, 6,53 % уран кислотаси ва бошқа таркибий қисмлардан иборат эканлиги аниқланди. *Bradyrhizobium japonicum* 36 штамми синтезлаган ЭПСнинг таркиби эса углерод/азот манбасига кўра ўзгариб борди. Штамм учун оптимал азот манбаси дрожжи экстрактининг озук муҳитидаги миқдори 2,8% га етганда 94,68% углевод ҳамда 3,05% оксилдан иборат ЭПС синтезланди. *Azotobacter chroococcum* XU1 штаммида эса ЭПС асосан алгинат ва оксил комплексидан иборат бўлиб, оксилнинг умумий улуши 3% дан ортмади.

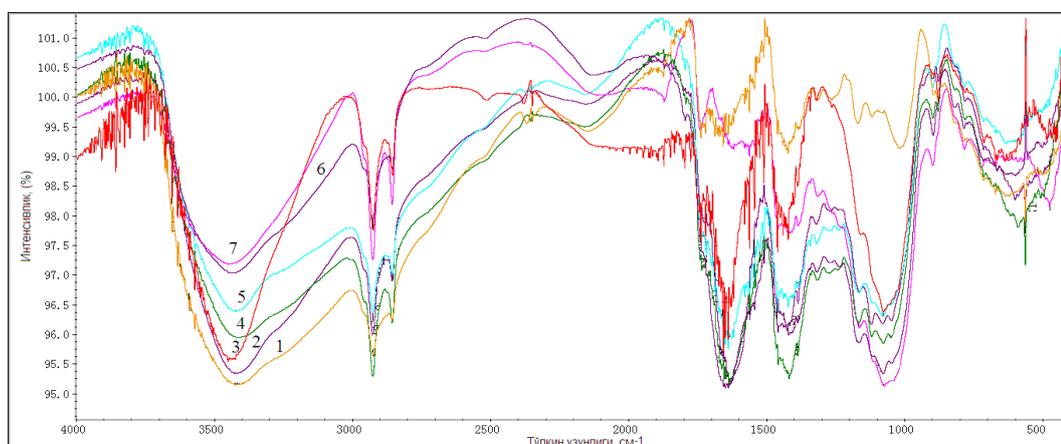
Диссертациянинг “**Штаммлар экзополисахаридлари модификацияси ва ва модификацияланган биополимерларнинг физик-кимёвий хусусиятлари**” деб номланган 3.4-қисмида штаммлар ЭПСлари модификацияси ҳамда уларнинг физик-кимёвий хусусиятлари баён қилинган. Нанобиокомпозитларнинг кўплаб физик-кимёвий хусусиятлари айнан уларнинг асосини ташкил қилувчи диэлектрик матрица – биополимер занжирига боғлиқ бўлганлиги сабабли *R. radiobacter* SZ4S7S14, *A.chroococcum* XU1 ва *B.japonicum* 36 штаммларининг турли шароитларида ўстириш орқали синтезланаётган ЭПСларнинг структуравий модификацияси тадқиқ этилди.

С/Н манбаларининг *R. radiobacter* SZ4S7S14 штаммининг турли тузилишли ЭПСлар синтез қилиши айнан уларнинг ИҚ-спектрлари таҳлили асосида аниқланди. Турли С/Н манбаларида (18 вариант) штамм бир-биридан фарқланувчи 7 ЭПС намунасини синтез қилди. Бу фарқ асосан функционал гуруҳларнинг валент тебранишларида намоён бўлди (7-расм).

Эътирофга молик спектрал ўзгаришлар *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 штаммини глюкоза/солд экстракти (1-намуна), сахароза/солд экстракти (3-намуна), сахароза/пептон (9-намуна), манноза/казаминокислота (11-намуна), манноза/дрожжи экстракти (14-намуна), сахароза/дрожжи экстракти (15-намуна) ва глюкоза/мол гўшти экстракти (18-намуна) сақлаган озук муҳитида ўстиришдан олинган ЭПС намуналарида аниқланди.

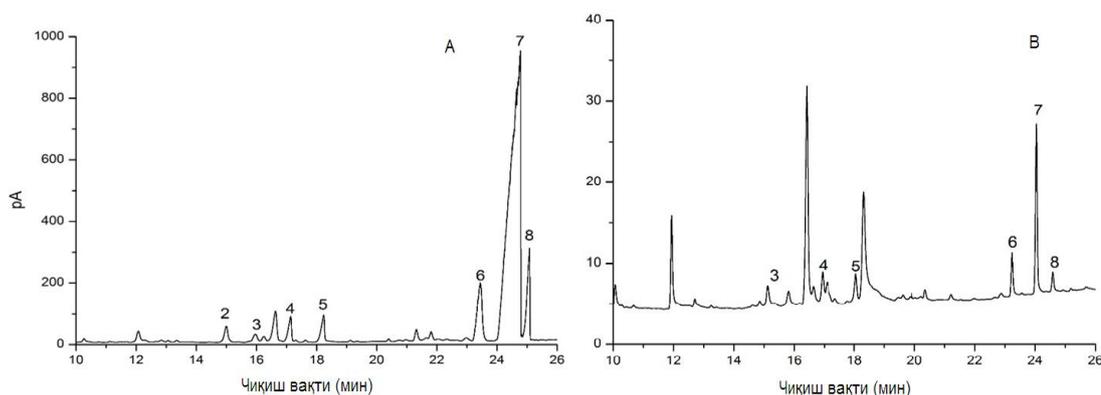
Жумладан, углевод ҳалқасидаги –ОН гуруҳининг тебранишидан ҳосил бўладиган интенсив ютилиш соҳаси юқоридаги намуналар ИҚ-спектрларида $3412,66$, $3421,10$, $3431,17$, $3447,39$ ва $3447,67\text{ см}^{-1}$ да кузатилди. Углеводлардаги ассимметрик С–Н боғига хос тебраниш $2922,2$ дан $2927,0\text{ см}^{-1}$ гача бўлган соҳаларда қайд этилди. – NHCOCH_3 гуруҳидаги С=О боғининг валент тебраниши $1617,94$, $1629,09$, $1636,42$, $1636,91$, $1647,35$, $1647,78$,

1653,71 ва 1654,15 см^{-1} да кузатилди. Гликозид боғлардаги С-О-Сга хос тебраниш 1074дан 1076,16 см^{-1} гача соҳаларда аниқланди. Ушбу ўзгаришлар С/Н манбалари нафақат ЭПС синтези унумдорлиги, балки унинг структурасига ҳам таъсир кўрсатишини исботлайди.



7-расм. Модификацияланган ISP2 озуқа муҳитида *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 штаммини ўстиришдан олинган ЭПС намуналарининг ИҚ-спектрлари (1-глюкоза/солд экстракти; 2-сахароза/солд экстракти; 3-сахароза/пептон; 4-манноза/казаминокислота; 5-манноза/дрожжи экстракти; 6-сахароза/дрожжи экстракти; 7-глюкоза/мол гўшти экстракти)

Моддаларнинг ИҚ-спектрлари асосида кимёвий боғлар ва функционал гуруҳлар табиати ҳақида хулоса чиқариш мумкин бўлса, уларнинг масс-спектрлари мономерларнинг сифат ва миқдор таркиби ҳақида маълумот беради. *R. radiobacter* SZ4S7S14 штаммини турли озуқа муҳитларида ўстиришдан олинган ЭПС намуналарида ҳам кузатилди (8-расм).



8-расм. 0,5 % (А) ва 2,0% ли (В) NaCl озуқа муҳитида (ISP2) ўстирилган *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 штамми синтезлаган ЭПС таркибидаги моносахаридлар ГХ-МС спектроскопияси (2-Рамноза; 3-Рибоза; 4-Арабиноза; 5-Ксилоза; 6-Манноза; 7-Глюкоза; 8-Галактоза)

Жумладан, 0.5% NaCl ли муҳитда штамм Glu:Man:Gal:Xyl:Ara:Rha:Rib=31.21:3.02:2.77:1:0.91:0.64:0.41, 1,0% ли NaCl

Glu:Man:Gal:Xyl:Ara:Rha:Rib=7.65:1:0.69:0.22:0.2:0.16:0.1, 1,5% ли NaCl
Glu:Man:Gal:Ara:Xyl:Rha:Rib=9.39:1.89:1:0.58:0.52:0.46:0.26, 2,0% ли NaCl
Glu:Man:Ara:Xyl:Rha:Rib=7.9:2:2:1.58:1.1:1 таркибли ва моляр нисбатли
ЭПС намуналари синтезланди. ISP2 нормал муҳитида штамм синтезлаган
ЭПСнинг сифат ва миқдор таркиби қуйидагича бўлди:
Glu:Gal:Man:Ara:Xyl:Rha:Rib=11.66:1:0.9:0.37:0.37:0.15:0.14.

Ўтказилган тажрибалардан *R. radiobacter* SZ4S7S14 штаммининг стресс шароитларда тузилиши бир-биридан кескин фарқланадиган ЭПСлар синтезлай олиши исботланди.

C/N манбаларининг *B.japonicum* 36 штаммининг ЭПС ҳосил қилишига таъсири эса *R. radiobacter* SZ4S7S14 штаммига қараганда бошқачароқ кечди. Субстратларнинг таъсири ЭПС ҳамда оксил миқдорининг ўзгаришида кўринди. *B.japonicum* 36 штамми ривожланиши учун оптимал ҳисобланган дрожжи экстрактида (N-манбаси сифатида) ЭПС ва унга қўшилиб синтезланадиган оксил миқдорининг ўзгариши анча сезиларли бўлди. Бунда асосий ўзгариш полисахарид:оксил нисбатида кузатилиб, озуқа муҳитидаги азот манбасининг миқдори 2,5 г/л га етганда таркибида 94,5% ЭПС ва 3,05% оксил сақлаган биополимер – ЭПС-асосли биофлокулянт синтезланди.

A.chroococcum XU1 штаммида эса бу ўзгариш асосан ЭПС занжирида кузатилди. Бу ўзгариш макромолекуланинг ИҚ-спектрларида гидроксил гуруҳларининг 3440-3445,5 см⁻¹ оралиғида валент тебранишлари аниқланди.

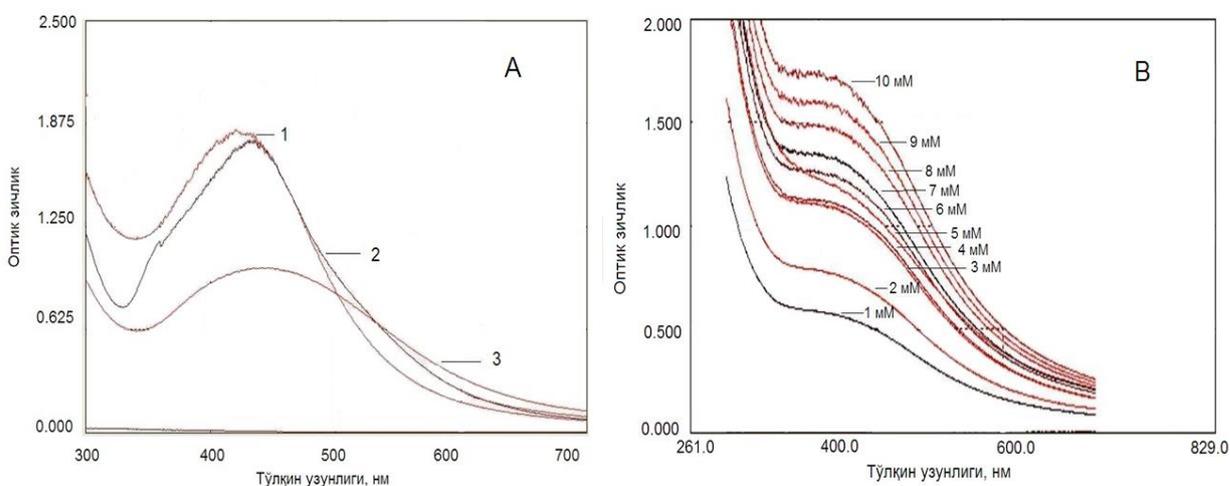
Диссертациянинг “**Диазотроф ризобактерия штаммлари ЭПС матрицалари асосида кумуш нанозарралари синтези, нанобиокомполитларнинг физик-кимёвий тавсифи ҳамда барқарорлигини баҳолаш**” дея номланган 3.5-қисмида *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 ва *R.radiobacter* SZ4S7S14 штаммлари ЭПСлари асосида Ag, AgCl ва Ag/AgCl-НЗ биосинтези, уларнинг морфологияси, алоҳида физик-кимёвий хусусиятлари ва барқарорлигини тадқиқ этишдан олинган натижалар баён қилинган.

ЭПС матрицаси асосида Ag, AgCl ва Ag/AgCl-НЗ синтези мониторинги нанокolloид эритмаларининг УБ-спектроскопияси асосида амалга оширилди. Жумладан, *B.japonicum* 36 ЭПС асосида синтезланган Ag-НЗ 420-450 нм, *R.radiobacter* SZ4S7S14 штамми ЭПС асосида синтезланган Ag-НЗ эса 420 нм тўлқин узунлигида ютилиш максимумларини намоён этди (9А-расм). Ҳар учта штамм ЭПСлари асосида ҳосил қилинган Ag-НЗ 410-450 нм тўлқин узунлигида ютилиш максимумларини ҳосил қилди. Одатда Ag-НЗ морфологияси ва ўзига хос кластерларга уюшиш хусусиятларига кўра 380-550 нм тўлқин узунлигида ютилиш максимумларини кўрсатади. 400-440 нм тўлқин узунлигида ютилиш максимумларини намоён этадиган Ag-НЗ сферик тузилишга эга. Шундан келиб чиқиб айтиш мумкинки, ҳар учта штаммда ҳамда ЭПС матрицасида синтезланган Ag-НЗ сферик кўринишда бўлади.

Ag-НЗ синтезида шунингдек, дастлабки моддалар – ЭПС ва AgNO₃нинг концентрацияси ҳам муҳим аҳамиятга эга. Бундан келиб чиққан ҳолда Ag-НЗ синтезига субстратлар концентрацияси таъсири тадқиқ этилди. Барча

тажриба вариантларида субстратлар, айниқса AgNO_3 концентрациясининг оширилиши Ag-NЗ синтези жадаллашуви ва микдорининг ортишига ижобий таъсир кўрсатди. Буни *V.japonicum* 36 штамми ЭПС асосида кўриш ҳам мумкин. Реакцион муҳитда AgNO_3 концентрацияси ортиши натижасида Ag-NЗ синтези кескин ортди. 10 мМ Ag^+ бўлган шароитда синтез максимал даражада амалга ошгани кузатилди (9В-расм).

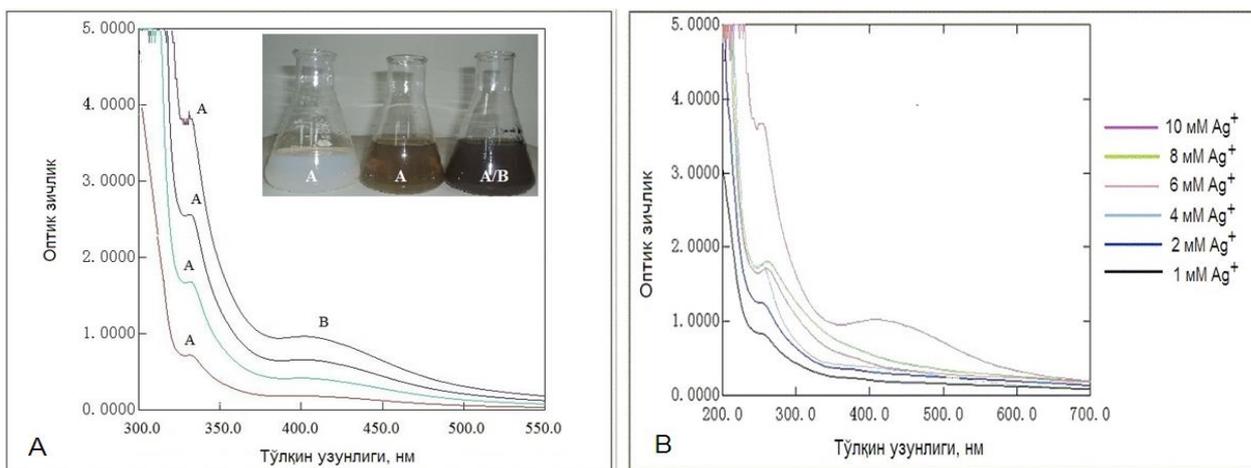
Ag-NЗ лардан фарқ қилиб AgCl-NЗ 200-350 нм тўлқин узунлигида ютилиш максимумларини ҳосил қилади. Айнан шу ҳолат уларнинг Ag-NЗ лардан фарқлаш имконини беради. Штаммлар ЭПСлари матрицаси асосида, муҳитда Cl^- ионлари мавжуд бўлганда ҳам Ag-NЗ , ҳам AgCl-NЗ синтезланди (муҳитда $C_M(\text{Ag}^+) > C_M(\text{Cl}^-)$ бўлган шароитда). Cl^- ионлари концентрацияси Ag^+ ионлари концентрациясидан кўп ёки тенг бўлганда ($C_M(\text{Cl}^-) \geq C_M(\text{Ag}^+)$) ЭПС матрицасида фақат AgCl-NЗ синтезланди.



9-расм. Штаммлар ЭПС матрицалари асосида синтезланган Ag-NЗ коллоидларининг УВ-спектроскопияси (1-*R.radiobacter* SZ4S7S14 ЭПС+ Ag^+ ; 2-*A.chroococcum* XU1+ Ag^+ ; 3-*V.japonicum* 36 ЭПС+ Ag^+) (А); *V.japonicum* 36 штамми ЭПС ва AgNO_3 нинг турли концентрацияларида синтезланган Ag-NЗ ларининг УВ-спектрлари (В)

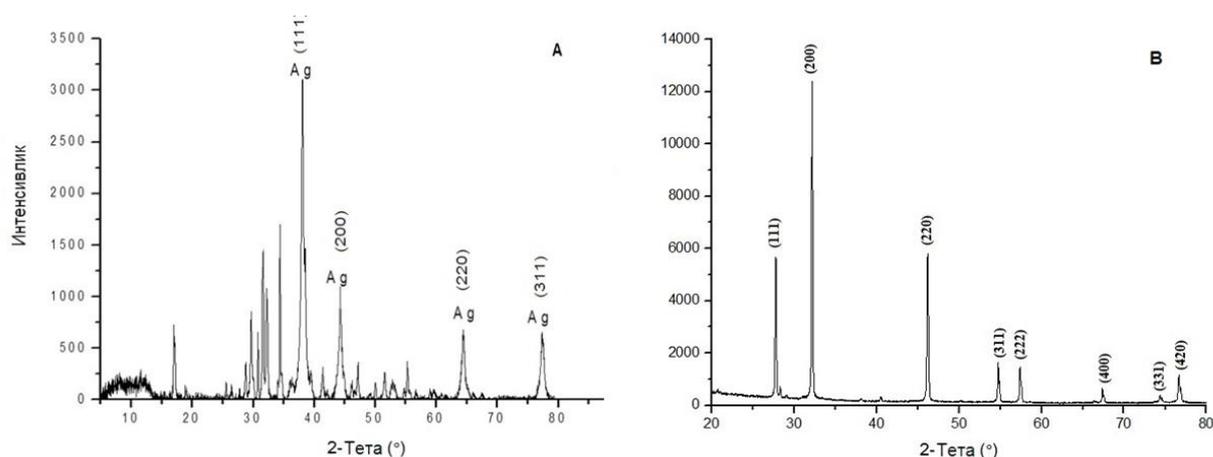
Жумладан, *V.japonicum* 36 штамми ЭПС матрицасида тенг моляр нисбатда олинган Ag^+ ва Cl^- ионлари (AgNO_3 ва NaCl тузлари кўринишида) AgCl-NЗ синтезлангани кузатилди ва 335 нм тўлқин узунлигида ютилиш максимумини кўрсатди (10А-расм). *A.chroococcum* XU1 ЭПС матрицасида эса 250 нм тўлқин узунлигида AgCl-NЗ га хос ютилиш максимуми қайд этилди (10В-расм).

Таркибида Ag-NЗ ва AgCl-NЗ сақлаган нанобиокомпозитлар таркибидаги элемент ҳолидаги Ag ва унинг микдорини аниқлашда рентгенструктуравий (XRD) ва рентген-зондли микроанализ (EDX) усули муҳим ҳисобланади. Шундан келиб чиққан ҳолда дастлаб *A.chroococcum* XU1, *V.japonicum* 36 ва *R.radiobacter* SZ4S7S14 штамми ЭПС матрицаси асосида синтезланган нанобиокомпозитларнинг рентгенструктуравий таҳлили амалга оширилди.



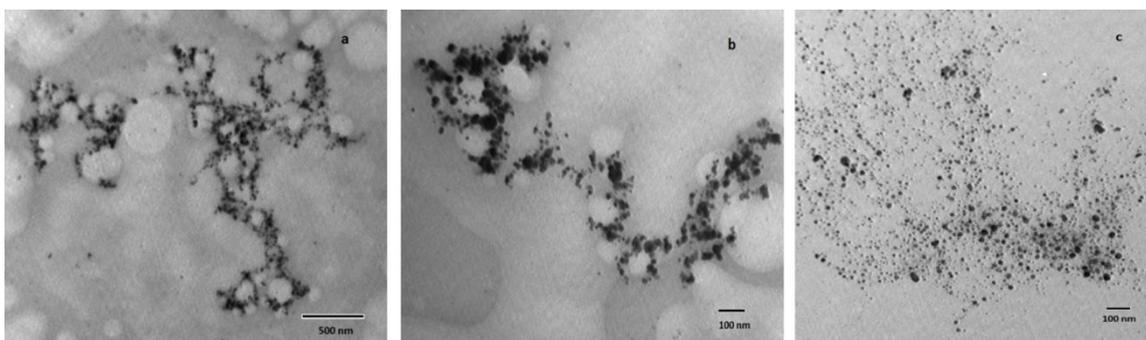
10-расм. Турли штаммларнинг ЭПСлари асосида синтезланган Ag/AgCl-НЗ сақлаган нанокolloидларнинг УВ-спектрлари. а –*B.japonicum* 36 штамми ЭПС асосида синтезланган Ag-НЗ (А) ва AgCl-НЗ (В); б –*A.chroococcum* XU1 штамми ЭПС ва турли Ag⁺ концентрацияларида Ag/AgCl-НЗ синтези

Барча штаммлар ЭПС матрицалари асосида синтезланган КНЗ 2θ соҳада атомар кумушга хос бўлган чўққиларни ҳосил қилди (11А,В-расмлар).



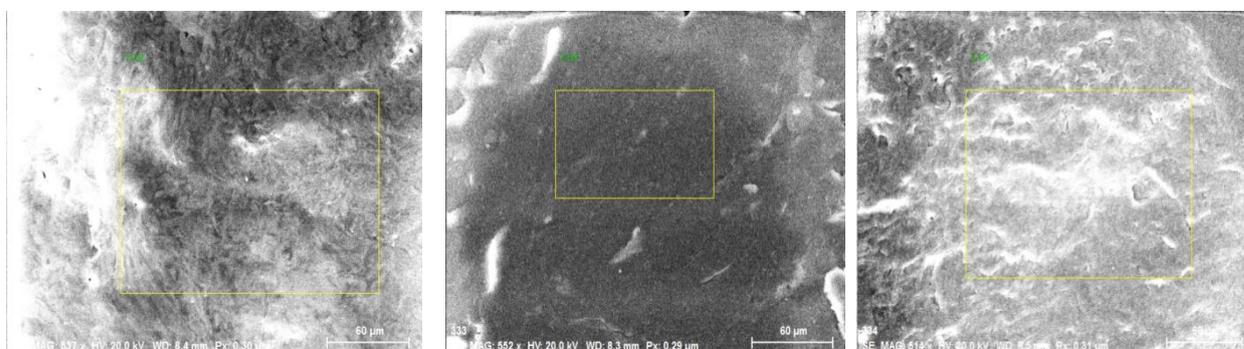
11-расм. *B.japonicum* 36 штамми ЭПС матрицаси асосида синтезланган Ag-НЗ (А) ва AgCl-НЗ (В) рентгенструктуравий спектрлари (XRD)

Жумладан, *A.chroococcum* XU1 штамми ЭПС асосида синтезланган КНЗда Ag 2θ соҳанинг $47,5^\circ$, $55,5^\circ$ ва $64,5^\circ$, *B.japonicum* 36 штамми ЭПС асосидаги КНЗда Ag $46,5^\circ$, $54,5^\circ$ ва $64,5^\circ$, *R.radiobacter* SZ4S7S14 штамми ЭПС асосидаги КНЗда Ag $46,5^\circ$, $54,5^\circ$ ва $65,5^\circ$ даражаларида кумуш кристаллининг (111), (200), (220) ва (311) панелига мувофиқ келувчи специфик чўққиларни ҳосил қилди. Нанобиокомпозитларнинг рентгензондли микроанализи 3 КЭв да элемент (нейтрал атом) ҳолидаги Ag га хос чўққи ҳосил бўлди. Штаммлар ЭПС матрицалар асосида синтезланган Ag-НЗ ларининг ўлчами 6 дан 50 нм гача (12-расм), сирт юзаси нотекис, полидисперс кўринишда (13-расм) бўлиши билан характерланди.



12-расм. *V.japonicum* 36 штамми ЭПС матрицаси асосида синтезланган Ag-N3 ларнинг трансмиссион-эмиссион микроскопида кўриниши

Штаммлар ЭПС матрицалари асосида олинган Ag-N3ларнинг ўлчами ва морфологияси ўхшаш бўлганлигини қайд этиш лозим.



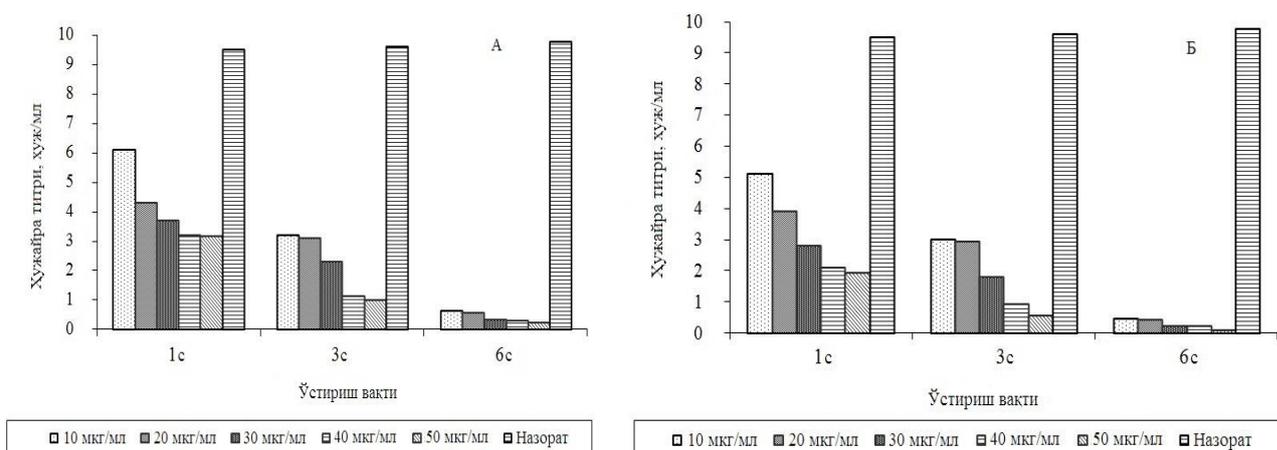
13-расм. *Azotobacter chroococcum* XU1 штамми ЭПС матрицаси асосида олинган Ag/AgCl-N3 комплексининг ёруғлик-электрон микроскопида сирт юзаларининг кўриниши

Диссертациянинг “Синтезланган нанобиокомпозитларнинг антимикроб хусусиятлари тадқиқи” деб номланган 3.6-қисмида тадқиқот доирасида тадқиқ этилган *A.chroococcum* XU1, *V.japonicum* 36 ва *R.radiobacter* SZ4S7S14 штамми ЭПС матрицаси асосида синтезланган, таркибида Ag ва AgCl-N3 сақлаган нанобиокомпозитларнинг антимикроб хусусиятлари тадқиқи баён этилган.

Нанобиокомпозитларнинг муҳим хусусиятларидан бири – уларнинг биоцид фаоллиги ҳисобланади. Синтез қилинган барча нанобиокомпозитларнинг тест-культуралар, жумладан *E.coli* ATCC11229, *S.aureus* ATCC 6538, *C.albicans*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, *Verticillium dahliae* каби патоген бактерия ва замбуруғларга қарши биоцидлик хусусияти текширилди. Барча нанобиокомпозит намуналарининг юқори биоцидлик фаолликка эга эканлиги кузатилди. Хусусан, *V.japonicum* 36 штамми ЭПС матрицаси асосида олинган Ag-N3 куйи концентрацияларда *E.coli* ATCC11229, *S.aureus* ATCC 6538 ва *C.albicans* ўсиши ва ривожланишини тўхтата олиши аниқланди. Қаттиқ озуқа муҳитида 18-23 мм

лизис зоналари ҳосил бўлган бўлса, суюқ озуқа муҳитларида барча тест-культуралар хужайра титрининг кескин камайиши кузатилди.

V.japonicum 36 штамми ЭПС матрицаси асосида олинган Ag-НЗ ларининг антибактериал таъсири қуйи (0.25-2.5 мкг/мл) ҳамда юқори (50 мкг/мл гача) концентрацияларида тадқиқ этилди. Патоген тест-культураларнинг титри турли вақт интервалда баҳоланди. Жумладан, Ag-НЗ ларининг қуйи концентрацияларида – 3 сутка давомида, юқори концентрацияларида эса 12 с хужайра титри ҳисобланди. Тажрибалар давомида Ag-НЗ лари таъсирида хужайра титрининг кескин камайиши кузатилди. 12 с сўнг тирик қолган хужайра титри $1,2 \cdot 10^4$ - $1,5 \cdot 10^5$ хуж/мл ташкил этди (14а, б-расмлар).



14-расм. *V.japonicum* 36 штамми ЭПС матрицаси асосида олинган Ag-НЗ ларининг юқори концентрациясида *E.coli* ATCC11229 (А) ва *S.aureus* ATCC 6538 (Б) хужайра титрининг камайиши

Тест-культуралардан *S.aureus* ATCC 6538 штамми *E.coli* ATCC11229 штаммига қараганда анча чидамсиз экани кўринди. Ушбу штамм барча тажриба вариантларида паст хужайра титри билан характерланди. Ag-НЗ ларининг 2,0 ва 2,5 мкг/мл концентрацияларида *S.aureus* ATCC 6538 штамми хужайра биомассасининг 70-75% 12 с сўнг нобуд бўлди. Ўстиришнинг иккинчи ва учинчи куни озуқа муҳитидаги барча хужайралар ўлик биомасса ҳолида идиш тубига чўкди (15-расм). Ag-НЗ ларининг юқори концентрацияларида эса (>2,5 мкг/мл) ўстиришнинг 2 с дан сўнг хужайра титрининг кескин туша бошлаши қайд этилди.

Худди шундай ҳолат штаммлар ЭПС матрицалари асосида синтезланган AgCl-НЗ ларида, шунингдек, *A.chroococcum* XU1 штамми ЭПС асосида синтезланган Ag/AgCl-НЗнинг *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, *Verticillium dahlia*га қарши антифунгал фаоллигида ҳам кузатилди. Жумладан, Ag/AgCl-НЗ нинг қуйи концентрацияларида патоген штаммларнинг ўсиши тўхтади.



15-расм. *V.japonicum* 36 штамми ЭПС матрицаси асосида олинган Ag-НЗ лари таъсирида патоген тест-культураларнинг нобуд бўлиб, идиш тубига чўкиши

Хулоса қилиш мумкинки, diaзотроф ризобактериялар штаммлари ЭПСлари асосида синтезланган, таркибида Ag ва AgCl-НЗ сақлаган нанобиокомпозитлар кучли биоцид хусусиятига эга. Уларнинг концентрациясининг ортиб бориши антимикроб хусусиятларини кучайишига олиб келади.

ХУЛОСА

“Диазотроф ризобактериялар экзополисахаридлари асосида кумуш нанозарралари олиш ва уларнинг антимиқроб таъсири механизмлари тадқиқи” мавзусидаги докторлик диссертацияси иши доирасида олинган натижалар асосида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Диазотроф ризобактериялар штаммларининг ЭПС синтезига скрининги асосида фаол *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 ва *R.radiobacter* SZ4S7S14 танлаб олинди. Модификацияланган озуқа муҳитларида *B. japonicum* 36-5,6, *R.radiobacter* SZ4S7S14-3,6 ва *A. chroococcum* XU1-3,2 г/л ЭПС ҳосил қилади.
2. *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 штамми углерод ва азот манбаларидан D-маннитоза ва дрожжи экстракти қўлланилганда 5,41 г/л микдорда ЭПС синтезлади ҳамда D-глюкоза қўлланилганда эса 96 с ўстириш натижасида 3,46 г/л ЭПС ҳосил қилади, *A.chroococcum* XU1 ва *B.japonicum* 36 штаммларида ҳам қайд этилди.
3. Штаммларнинг ЭПС ҳосил қилишида бир неча турдаги генлар иштирок этиб, уларнинг экспрессияланиш даражаси ўстирилаётган муҳитдаги субстратларга тўғридан-тўғри боғланди. *R.radiobacter* SZ4S7S14 штаммида *exoK* ва *exoM* генлари ЭПС синтезига жавобгар ҳисобланиб, улар йирик ген кластерини ҳосил қилади. Манноза бу генларнинг максимал экспрессияланишига ёрдам бериб, ЭПС синтезининг ошишига олиб келади. Муҳитга NaCl қўшилиши эса *exoK* ва *exoM* генлари экспрессиясига салбий таъсир кўрсатади ва бир-биридан мономер таркиби бўйича фарқланувчи ЭПС намуналари синтезланади, бу ҳолат *A.chroococcum* XU1 ва *B.japonicum* 36 штаммларида ҳам кузатилади (ген *algA*).
4. Mo^{+4} нинг (Na_2MoO_4 тузи кўринишда) ЭПС синтезини кескин оширади, жумладан, Mo^{+4} қўшилган глюкоза/дрожжи экстрактли озуқа муҳитида *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 штамми 3,86 г/л ЭПС синтезлади. Бу эса Mo^{+4} қўшилмаган шароитларга қараганда 11,5% га ошди. Ca^{+2} ва Al^{+3} катионлари қўлланилганда эса *B.japonicum* 36 штамми ЭПСининг флокуляция фаоллиги бошқа катионларга қараганда анча юқорилигидан далолат беради.
5. *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 штаммининг сахароза ва дрожжи экстрактдан иборат озуқа муҳитида синтезланган ЭПС комплекси (биофлокулянт) таркибида 94,5% полисахарид ва 3,05% оксил таркибга эга эканлиги аниқланди. Биополимернинг 100-350 мкм узунликдаги ғиштчалар кўринишида бўлиб, таркиби 51,47 % O ва 45,79 % C ни ташкил этди.
6. Штаммлар ЭПСлари асосида синтезланган, УБ-спектроскопиясида 420-460 нм тўлқин узунлигида ютилиш максимумларига эга Ag-NЗ, 250-270 нм тўлқин узунлигида ютилиш максимумларига эга AgCl-NЗларининг турли сирт плазмон резонансидан фойдаланган ҳолда турли нанобиокомпозитлар олишга имкон берди.

7. Реакцион муҳитда Ag^+ ва Cl^- концентрацияларини бошқариш орқали Ag -, AgCl - ҳамда Ag/AgCl -НЗларини ҳосил қилиш имконини беради. Муҳитда $C_M(\text{Ag}^+) > C_M(\text{Cl}^-)$ бўлган шароитда Ag/AgCl -НЗ, $C_M(\text{Cl}^-) \geq C_M(\text{Ag}^+)$ бўлганда эса фақат AgCl -НЗ синтезланганини қайд этилди.
8. Алоҳида синтезланган Ag -НЗларини *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 штамми синтезлаган ЭПСга сингдириш орқали нанозарраларнинг морфологиясини ўзгартириш, барқарорлигини ошириш мумкин, 440 нм тўлқин узунлигида ютилиш максимумига эга Ag -НЗларни (алоҳида синтезланган) *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 ЭПСга сингдириш натижасида олинган нанокolloид 410-420 нм да ютилиш максимумига олиб келади.
9. Алоҳида синтезланган нанозарраларни диэлектрик матрицага сингдириш усули янги нанобиокомпозитлар олиш имконини беради. Ушбу усулда биополимер матрицасининг функционал гуруҳлари ва кимёвий боғлари амалда ўзгаришсиз қолади.
10. Штаммлар ЭПСлари асосида олинган Ag -, AgCl ва Ag/AgCl -НЗлари асосида патоген микроорганизмлар популяцияларини бошқариш имконияти яратилди. Жараён самарадорлиги қўлланилаётган нанозарралар концентрациясига боғлиқлиги қайд этилган.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.27.06.2017.В.38.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ МИКРОБИОЛОГИИ И
НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА**

**ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

РАСУЛОВ БАХТИЁР АБДУГАФУРОВИЧ

**ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕЗА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ОСНОВЕ
ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ ДИАЗОТРОФНЫХ РИЗОБАКТЕРИЙ
МЕХАНИЗМОВ ИХ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ**

**03.00.04 – Микробиология и вирусология
(биологические науки)**

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА
(DSc) БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК**

ТАШКЕНТ – 2019

Тема диссертации доктора наук (DSc) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан под номером B2019.2.DSc/B94

Диссертация выполнена в Институте генетики и экспериментальной биологии растений
Автореферат диссертации на трёх языках (узбекский, русский, английский (резюме))
размещён на веб-странице Научного совета (microbio@academy.uz) и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziynet.uz).

Научный консультант: **Давранов Кахрамон**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Тошмухамедова Шохиста Собировна**
доктор биологических наук
Нормахаматов Нодирали Сохобаталиевич
докторхимических наук
Буриев Забардаст Тожибоевич
доктор биологических наук

Ведущая организация: **Ташкентский государственный аграрный университет**

Защита диссертации состоится «___» июля 2019 года в 10:00 часов на заседании Научного совета DSc.27.06.2017.B.38.01 при Институте микробиологии и Национальном университете Узбекистана (Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А.Кадырий 7б, конференц-зал института микробиологии. Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, e-mail: e-mail: microbio@academy.uz.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института микробиологии (зарегистровано под № ___). Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А. Кадырий 7б, Административное здание Института микробиологии,

Автореферат диссертации разослан: «___» июль 2019 г.
(реестр протокола рассылки № «___» от «___» июль 2019).

Арипов Тахир Фатихович
Председатель Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., профессор, академик

Жураева Рохилия Назаровна
Ученый секретарь Научного совета по присуждению
ученых степеней, к.б.н. старший научный сотрудник

Гулямова Ташхан Гофуровна
Председатель Научного семинара при Научном
совете по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация докторской(DSc) диссертации)

Актуальность и востребованность темы диссертации. Одна из глобальных проблем, с которой сталкивается человечество в современном мире, это появление новых, агрессивных рас патогенных и фитопатогенных микроорганизмов, которые вызывают серьезные заболевания⁴. Традиционные методы борьбы против этих патогенных рас становятся бесполезны. Патогенные микроорганизмы, приобретая резистентность к биоцидным веществам— антибиотикам, низкомолекулярным соединениям с антимикробными свойствами и другим соединениям, становятся угрозой для здоровья человека⁵. В этих условиях актуальным считается создание новых видов биоцидных агентов. Одними из таких средств являются нанобиокомпозиты, синтезированные на основе матрицы биологической макромолекулы (биополимера) и содержащие наночастицы серебра или соединения серебра. Наночастицы серебра и соединения серебра в малых концентрациях значительно ингибируют рост и развитие патогенных микроорганизмов. При этом, патогенная популяция теряет резистентность. Это связано с тем, что атомы серебра в наноразмерах с легкостью проникают через клеточную стенку в цитоплазму, при этом изменяя биологические свойства белков, ДНК или РНК в ядре.

В исследованиях многих стран мира, особое внимание уделяется синтезу нанобиокомпозитов с наночастицами Ag, AgCl, TiO₂, Al₂O₃, изучению их физико-химических свойств и применению в практике. В частности, были изучены молекулярная таксономия и филогенетическое родство штаммов микроорганизмов, продуцирующих биополимеры, которые способствуют образованию наночастиц, синтез биополимеров, влияние физико-химических факторов (температура, интенсивность аэрации, продолжительность культивирования, pH, роль ионов и субстратов), химическая природа связей и функциональных групп полученных макромолекул. Ведутся исследования по синтезу нанобиокомпозитов, содержащих наночастицы серебра, их биоцидное воздействие в малых концентрациях на рост и развитие клеток патогенных микроорганизмов. В связи с этим, использование нанобиокомпозитов, содержащих наночастицы серебра и их соединения для организации борьбы против популяций резистентных форм патогенных микроорганизмов имеют научное и практическое значение.

В Узбекистане особое внимание уделяется вопросам предотвращения заболеваемости сельхоз культур патогенами и улучшение их урожайности. Значительные успехи были достигнуты в борьбе против фитопатогенных микромицетов хлопчатника *Fusarium oxysporum* f.sp.vainfectum и *Verticillium dahliae*. В Стратегии дальнейшего развития Республики Узбекистан

⁴Lara H. H., Ayala-Nunez N. V., Ixtapan-Turrent L., Rodriguez-Padilla C. Mode of anti viral action of silver nanoparticles against HIV-1// *J. Nanobiotechnol.*-2010.-№ 8.-p. 31–39.

⁵Kanmani P., Lim S.T., Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens // *Process Biochem.*-2013a.-№48.- p.1099-1106.

намечены важнейшие задачи «...по внедрению интенсивных методов ведения сельского хозяйства, особенно современных агротехнологий в области водных и земельных ресурсов». В реализации этих задач важную роль играет синтез наночастиц серебра и их соединений на основе матриц экзополисахаридов diaзотрофных ризобактерий, их физико-химическая характеристика и применение на практике.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Указом Президента Республики Узбекистан УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», Постановлением Президента Республики Узбекистан №П-5394 от 29 октября 2018 года «О дополнительных организационных мерах по реформированию сельскохозяйственной отрасли», Постановлением Президента Республики Узбекистан № ПП-3855 от 14 июля 2018 года «О дополнительных мерах по повышению эффективности коммерциализации результатов научной и научно-технической деятельности», а также в других нормативно-правовых документах, соответствующих данной деятельности.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики: V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология и охрана окружающей среды».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации⁶. Научные исследования, направленные на изучение молекулярной таксономии и генетики микроорганизмов, синтезирующих ЭПС и ЭПС-основных биофлокулянтов, которые используются в синтезе наночастиц металлов, физико-химических свойств этих биополимеров и их модификация, изучение влияния субстратов на образование функциональных групп, широко описаны ведущими научными центрами и высшими образовательными учреждениями мира, в том числе, Hunan University, Shanghai Maritime University, Xiamen University, Guangxi University (КНР), University of Fort Hare, University of Witwatersrand, University of Fort Hare (ЮАР), University of the Punjab (Пакистан), Nevsehir University (Турция), The Pennsylvania State University (США), Gifu University (Япония), Gadjah Madha University (Индонезия), Korea University, Pukyong National University (Юж.Корея), Kansai University (Япония), Brno University of Technology (Чехия), Northeast Forestry University (КНР), Yanshan University (КНР), Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences (КНР), Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences (КНР), Palacky University

⁶ Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи: <https://www.journals.elsevier.com/bioresource-technology>; <https://www.journals.elsevier.com/biomaterials>; <https://link.springer.com/journal/12223>; <https://www.journals.elsevier.com/international-journal-of-biological-macromolecules>; <https://www.mdpi.com>; <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology>;

(Чехия), Институте генетики и экспериментальной биологии растений (Узбекистан) и др. проводят многочисленные исследования.

В результате проведенных исследований в области изучения способов получения нанобиокомпозитов, содержащих наночастицы металлов, используя матрицу макромолекул как восстановителя, так и стабилизатора и ряд важных научных результатов, в том числе: получены и охарактеризованы нанобиокомпозиты, содержащие наночастицы Ag и AgCl, используя культуральную жидкость некоторых грибов (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizoctania*, *Pleurotus*, *Trichoderma*), а также на основе матриц ЭПС бактерий и актиномицетов, таких как *Lactobacillus*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Streptomyces* (Kansai University, Япония); Korea University, Pukyong National University, Юж.Корея), исследования по синтезу нанобиокомпозитов, содержащих наночастицы металлов, на основе матриц биополимеров, изучение их физико-химических свойств (УФ-, ИК-, рентгенспектрал-зондовый микроанализ, просвечивающая электронная и трансмиссионная электронная микроскопия (Kansai University (Япония); Brno University of Technology (Чехия), термической устойчивости и антимикробной активности Northeast Forestry University, Yanshan University, Institute of Process Engineering, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, (ХХР); более того, были синтезированы нанобиоматериалы на основе матриц ЭПС, содержащие наночастицы редких металлов (Au, Pt) и некоторых соединений (TiO_2 , Al_2O_3 , Ag_2SO_4) (Islamic Azad University (Эрон), East China Normal University (ХХР)).

В мире, наряду с исследованиями, приводятся приоритетные направления по способам получения нанобиокомпозитов, содержащих наночастицы металлов в частности: молекулярная таксономия, филогенетическое родство микроорганизмов, определение химической связи и функциональных групп в макромолекулах; оптимизированы методы и способы получения биополимеров; усовершенствованы методы синтеза наночастиц Ag и AgCl бактериями рода *Lactobacillus*, *Gluconobacter*, а также некоторыми представителями микромицетов.

Степень изученности проблемы. В литературе широко освещены работы по изучению, скринингу и молекулярной таксономии ЭПС и ЭПС-основных биофлокулянтов, синтезируемых бактериями и актиномицетами (Nwodo et al., 2014; Manivasagan et al., 2015; Okaiyeto et al., 2015); синтезу биополимеров и оптимизации процессов синтеза, определению мономеров и урановых кислот биополимеров (Xiong et al., 2010; Gaur et al., 2010; Zajsek et al., 2011; Usha et al., 2011; Castro et al., 2012; Singh and Saini, 2012; Chen et al., 2015); их применению в синтезе наночастиц Ag/AgCl (Kanmani and Lim, 2013; Breitwieser et al., 2013; Abdel-Mohsen et al., 2014; Lee and Won, 2014; et al., 2014; Chen et al., 2015); “впитыванию” отдельно синтезированных наночастиц серебра в другую макромолекулу (Hassabo et al., 2014).

Кроме того, ряд авторов изучали нанобиокомпозиты, содержащих наночастицы Ag/AgCl с помощью УФ- и ИК-спектроскопию,

рентгеноспектральный-зондовой микроанализ, просвечивающую электронную микроскопию (Kanmani and Lim, 2013; El-Sheikh et al., 2013; Emam and Zahran, 2015; Abdel-Halim et al., 2015; Tummalapalli et al., 2015; Kibeche et al., 2015; Nazar et al., 2018); биоцидное влияние этих нанобиокомпозитов на патогенные бактерии, грибы и вирусы (Panacek et al., 2009; Lara et al., 2010; Rastogi et al., 2015).

Следует отметить, что до настоящего времени, в Республике не проводились исследования по биосинтезу нанобиокомпозитов, содержащих наночастицы серебра, на основе ЭПС и ЭПС-основных биополимеров микробного происхождения, изучению физико-химических свойств и применению в борьбе с патогенными микроорганизмами. Кроме того, не проводились конкретные исследования по продуцированию ЭПС ризобактериями, вступающими в ассоциативный симбиоз с растениями и по изучению их некоторых химических свойств – определению мономерного состава и связанных белков. Не изучены молекулярная таксономия и филогенетическое родство бактерий, синтезирующих биополимеры. В научной литературе практически отсутствуют сведения об использовании ЭПС diaзотрофных ризобактерий, таких как *Azotobacter*, *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*. По химическому строению и свойствам биополимеры diaзотрофных ризобактерий уникальны, более того, не имеют аналогов. Оптимизация синтеза макромолекул, обладающих восстановительными и стабилизирующими свойствами в нанобиотехнологии, получение нанобиокомпозитов, изучение их физико-химических свойств и применение их против агрессивных форм патогенов, имеет научно-практическое значение.

Связь темы диссертационного исследования с тематическим планом научно-исследовательских работ. Диссертационное исследование выполнено в рамках научно-исследовательских работ по прикладным и международным проектам Института генетики и экспериментальной биологии растений: ФА-А8-Т015 "Мониторинг, молекулярно-генетическая характеристика патогенных грибов (*Fusarium oxysporum* f.sp.*vasinfectum* и *Verticillium dahliae*) хлопчатника, разработка основ комплексной (микробиологических и нанобиотехнологических) биотехнологий против них и применение в практике" (2015-2017), М/Узб-КНР-03/15 "Повышение устойчивости хлопчатника и пшеницы к засолению и засухе с применением биомолекул (поли-β-гидроксibuтирата и экзополисахаридов) diaзотрофных ризобактерий"(2016-2017 гг.).

Целью исследования является изучения синтеза наночастиц серебра на основе экзополисахаридов ризобактерий и их антимикробных свойств.

Задачи исследования:

выделение и скрининг активных diaзотрофных ризобактерий - продуцентов ЭПС;

изучение морфолого-культуральных свойств отобранных штаммов и их идентификация, подбор оптимальных питательных сред и условий для культивирования;

исследование молекулярно-генетических основ процессов синтеза ЭПС; определение генов или ген-кластеров ответственных за синтез ЭПС и выявление воздействия внешних факторов на их экспрессию;

продуцирование ЭПС штаммами *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 и *R. radiobacter* SZ4S7S14, определение физико-химических факторов, влияющих на синтез ЭПС и определение химического состава биополимеров;

структурная модификация ЭПС штаммов и определение их физико-химических свойств;

синтез наночастиц Ag и AgCl на матрице ЭПС штаммов, УФ-спектроскопия нанокolloидных суспензий, ИК-спектроскопия, рентгенспектрал-зондовый микроанализ, просвечивающая электронная микроскопия полученных нанобиокомпозитов;

оценить антимикробного действия нанобиокомпозитов, содержащих наночастицы Ag и AgCl против патогенных микроорганизмов, таких как *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectum и *Verticillium dahliae*;

получение биопрепарата на основе ЭПС штаммов для сельского хозяйства Республики.

Объектом исследования явились отобранные штаммы *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 и *R. radiobacter* SZ4S7S14 - активные продуценты ЭПС, их биополимеры и синтезированные на них основе нанобиокомпозиты, содержащие наночастицы серебра.

Предметом исследования являлось выделение ЭПС синтезирующих diaзотрофных ризобактерий, их скрининг, изучение продуцирования ЭПС отобранных штаммов, влияние физико-химических факторов на процесс синтеза, определение химического состава биополимеров; получение нанобиокомпозитов, содержащих наночастицы серебра на основе матрицы ЭПС, характеристика полученных нанобиокомпозитов с использованием физико-химических методов и исследование механизмов их антимикробного действия в отношении патогенных бактерий и грибов.

Методы исследования. Микробиологические, физиологические, био- и нанобиотехнологические, биохимические, молекулярно-биологические и статистические методы.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые проведен скрининг diaзотрофных ризобактерий по синтезу ЭПС позволил отобрать три активных штамма, которые были идентифицированы как *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 и *R. radiobacter* SZ4S7S14;

выявлена способность штаммов продуцировать ЭПС на различных субстратах; подобраны оптимальные условия культивирования штаммов для максимального синтеза биополимеров;

впервые выявлен крупный ген-кластер, включающие гены *exoK* и *exo M*, которые участвуют в биосинтезе ЭПС. В присутствии маннозы экспрессия этих генов увеличивалась, тогда как при солевом стрессе, снижалась. Была

доказана модификация молекулярного состава конечного метаболита – ЭПС в результате изменения экспрессии генов *exoK* и *exoM*. Таким образом, штамм *R. radiobacter* SZ4S7S14 синтезировал четыре ЭПС в разных стрессовых условиях и был охарактеризован их химический состав;

определены физико-химические свойства и мономерный состав ЭПС штаммов *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 и *R. radiobacter* SZ4S7S14. Также, были выявлены изменения в структуре ЭПС в зависимости от природы субстрата. ИК-спектры биополимеров показали количественные изменения гидроксильных групп (-ОН);

на основе ЭПС штаммов *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 и *R. radiobacter* SZ4S7S14 были синтезированы НЧ-Ag с максимумом поглощения 400-420 нм, и НЧ-AgCl с максимумом поглощения 250-275 нм;

рентгеноструктурный анализ нанобиокомпозитов выявил элементное Ag на 2θ регионе в 47.5° , 55.5° и 64.5° (у нанобиокомпозита полученного на основе ЭПС штамма *B.japonicum* 36). У нанобиокомпозита на основе ЭПС *A.chroococcum* XU1 ЭПС, содержащего AgCl-НЗ на 2θ регионе дифракционные спектры в 27.64° , 32.24° , 46.2° , 54.78° , 57.44° , 67.42° , 74.4° и 76.6° ;

методом “впитывание” отдельно синтезированных НЧ-Ag в ЭПС штамма *R. radiobacter* SZ4S7S14 получен новый нанобиокомпозит и охарактеризованы его физико-химические свойства;

выявлены антимикробные свойства всех полученных нанобиокомпозитов в отношении патогенных бактерий и грибов.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

отобраны штаммы *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 и *R. radiobacter* SZ4S7S14 – активные продуценты ЭПС, охарактеризованы их морфолого-культуральные и биохимические свойства;

определена способность штаммов синтезировать ЭПС на различных субстратах и при различных условиях культивирования;

синтезированы нанобиокомпозиты, содержащие НЧ-Ag на основе матриц ЭПС штаммов, подтверждено наличие НЧ-Ag и НЧ-AgCl на матрицах биополимеров физико-химическими методами. Охарактеризованы морфология и устойчивость наночастиц;

разработан метод “впитывания” отдельно синтезированных НЧ-Ag в матрицу ЭПС *R. radiobacter* SZ4S7S14, позволяющий предотвратить организацию наночастиц в кластеры, получен нанокompозит нового типа;

выявлена значительная антимикробная активность синтезированных нанобиокомпозитов в отношении патогенных микроорганизмов, таких как *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectum и *Verticillium dahliae*, были выявлены своеобразные опухоли на клеточных стенах этих микроорганизмов;

разработана нанокolloидная система, состоящая из биополимерной матрицы штаммов *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 и *R. radiobacter* SZ4S7S14 и НЧ-Ag и НЧ-AgCl для эффективной борьбы с патогенными микроорганизмами.

Достоверность результатов исследования обосновывается тем, что каждый эксперимент исследования проведён не менее чем в 3 повторностях, что позволило найти средний наиболее достоверный и стабильный результат. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили при помощи критерия Стьюдента с вычислением граничных значений доверительного интервала, средних значений путём использования компьютерной программы STATISTICA 6.0.

Научная и практическая значимость результатов исследования заключается в том, что были синтезированы и охарактеризованы физико-химические свойства НЧ-Ag и НЧ-AgCl на основе биополимерной матрицы штаммов *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 и *R. radiobacter* SZ4S7S14. Были получены нанокolloиды НЧ-Ag и НЧ-AgCl на основе биоматериалов.

Практическая значимость работы заключается в том, что предложенные нанобиокомпозиты нового поколения, являются биоцидными агентами против патогенных микроорганизмов. Метод “впитывания” отдельно синтезированных наночастиц в полимерную матрицу позволяют синтезировать устойчивые биоцидные нанобиокомпозиты. Суспензии нанобиокомпозитов – нанокolloиды успешно ингибируют развитие *Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectum и *Verticillium dahliae* – патогенов хлопчатника. Кроме того, эффективность устойчивых форм нанокolloидов, полученных в данной исследовательской работе, объясняется возможностью использовать их против широкого спектра патогенных микроорганизмов.

Внедрение результатов исследования. В результате научных исследований по созданию биопрепарата “Биоазот” на основе экзополисахаридов diaзотрофных ризобактерий:

Получен патент на изобретение со стороны агентства Интеллектуальной собственности Республики Узбекистан (№ IAP 04887) на diaзотрофный штамм *Azotobacterchroococcum* N1, продуцент индолил-3-уксусной кислоты и гиббереллинов. В результате создан препарат для корневой и внекорневой подкормки хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.), произрастающих на засоленных почвах;

Биопрепарат “Биоазот” был внедрен в фермерском хозяйстве Аккурганского района Ташкентской области для подкормки кукурузы и картофеля (Справка Министерства сельского хозяйства РУз №02/023-221 от 11.11.2018 года). В результате почвенное плодородие и урожайность культур увеличивались, снижалось негативное воздействие солей засоленных почв и ингибировалась активность патогенных микроорганизмов;

Биопрепарат “Биоазот” на основе diaзотрофных ризобактерий и их экзополисахаридов зарегистрирован в списке различных препаратов Госхимкомиссией Республики Узбекистан (Сертификат госхимкомиссии № 1А 1670 от 23.04.2018). Применение биопрепарата способствовало улучшению экономических показателей фермерских хозяйств и повышению урожайности хлопчатника, кукурузы и картофеля.

Апробация результатов исследования. Материалы диссертации были представлены и обсуждены на 10-ти республиканских и 7-ми международных конгрессах и конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 23 научные работы, из них – 1 патент, 13 научных статей, 7 в зарубежных и 5 в республиканских журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованной литературы, приложений. Объем диссертации составляет 167 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность и востребованность проведенных исследований, сформулированы цель и задачи, охарактеризованы объекты, предмет и методы, определена научная новизна и практическая значимость проводимых исследований, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки в Республике, раскрывается научная, практическая значимость и внедрение в практику полученных результатов, а также приводятся сведения по опубликованным статьям.

В первой главе диссертации – обзоре литературы приведен анализ современного состояния по изучению синтеза экзополисахаридных (ЭПС) биополимеров микроорганизмами, в том числе бактериями и актиномицетами, их физико-химических свойств, молекулярной таксономии некоторых продуцентов, биосинтеза НЧ-Ag и НЧ-AgCl на матрицах ЭПС, свойств полученных нанобиокмполитов – морфология, стабильность, определение наночастиц металлов, а также механизмов влияния наночастиц серебра на клетки патогенных микроорганизмов. Анализировано применение нанобиокмполитов как биоцидных агентов против высоко резистентных патогенов.

Во второй главе диссертации - «**Материалы и методы исследования**» описаны методы выделения штаммов diaзотрофных ризобактерий из природных источников – ризосферных почвенных образцов и клубеньков растений, микробиологической очистки изолятов, и изучение их морфологии, физиологии и биохимических свойств, молекулярно-генетическая идентификация активных штаммов на основе секвенса генов 16S рРНК, синтеза ЭПС и биосинтеза, мониторинга НЧ-Ag и НЧ-AgCl на основе ЭПС матрицы, определение свойств нанобиокмполитов – морфология, стабильность, выявление наночастиц и влияние наночастиц на клеток патогенных микроорганизмов.

В третьей главе диссертации, «**Полученные результаты и их обсуждения**» приведены основные результаты исследования. В частности, в разделе 3.1, «**Выделение, скрининг diaзотрофных ризобактерий,**

синтезирующих ЭПС и молекулярная-генетическая идентификация активных штаммов, морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства» описаны результаты выделения diaзотрофных ризобактерий из ризосферных почвенных образцов и клубеньков, скрининга на синтез ЭПС, их морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства и молекулярная-генетическая идентификация на основе секвенса генов 16S рРНК.

На основе скрининга вновь выделенных и имеющихся в нашей коллекции штаммов по синтезу ЭПС для дальнейших исследований были отобраны три штамма *B. japonicum* 36 (5,6±0,25 г/л ЭПС), *Rhizobium sp.* SZ4S7S14 (3,6±0,23 г/л ЭПС) и *A. chroococcum* XU1 (3,2±0,2 г/л ЭПС). Данные штаммы отличались высоким синтезом ЭПС на начальных этапах культивирования. Максимальное количество ЭПС в культуральной жидкости было отмечено на 48- и 72 ч культивирования. Штаммы *B. japonicum* 36 и *A. chroococcum* XU1 (коллекционные) были изучены ранее, их видовая принадлежность была известна. Молекулярная идентификация нового штамма *Rhizobium sp.* SZ4S7S14 на основе секвенса генов 16S рРНК показала, что штамм на 100% соответствует ранее документированному штамму *Rhizobium radiobacter* 19358^(T) (AJ389904). На основе филогенетического анализа новый штамм был идентифицирован как *Rhizobium radiobacter* (Рис.1).

Были изучены морфологические, физиологические и биохимические свойства штаммов *A. chroococcum* XU1, *B. japonicum* 36 и *R. radiobacter* SZ4S7S14. Изучена способность штаммов расти в безазотистых средах, синтезировать вторичные метаболиты за счет атмосферного азота. В этой связи, штамм *A. chroococcum* XU1 проявил более высокую активность, чем другие штаммы.

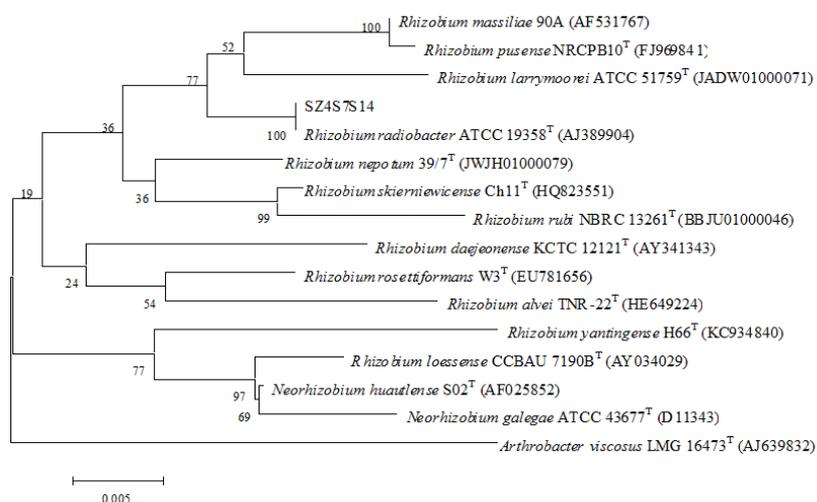


Рис. 1. Филогенетическое дерево *Rhizobium sp.* SZ4S7S14

Были изучены наличие и экспрессия генов, ответственных за синтез ЭПС. Примечателен тот факт, что сравнительный анализ мутантных и диких

форм штамма *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14, полученных путем транспозонного мутагенеза выявил наличие набора генов *exoK* и *exoM*, участвующих в синтезе ЭПС из класса ЭПС1. Это соответствовало известному крупному ген-кластеру, который участвует в синтезе ЭПС (Рис.2).

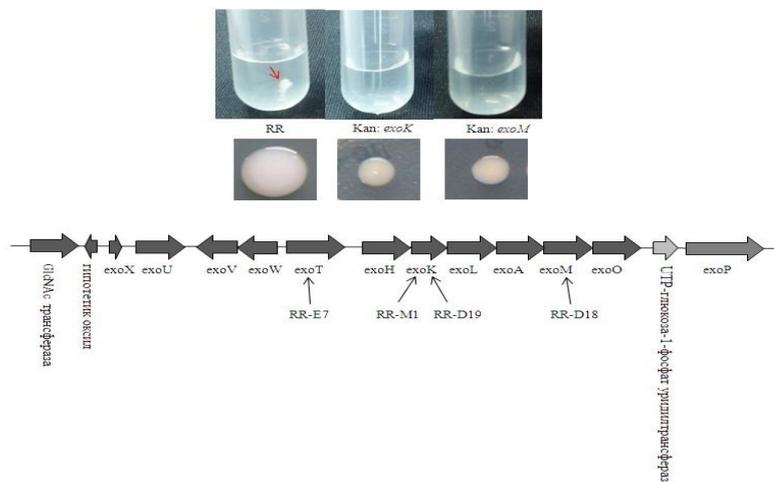


Рис.2. Идентификация крупного ген-кластера (генов *exoK* и *exoM*) в штамме *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14

Учитывая, что RT-PCR и qRT-PCR анализ *exoK* и *exoM* генов позволит определить активность экспрессии, были изучены экспрессии этих же генов на разных углеродных источниках. Более того, определены еще гены, ответственные за синтез ЭПС в штаммах *Azotobacter chroococcum* XU1, *Azotobacter chroococcum* N1 и *Bradyrhizobium japonicum* 36 и они соответствовали ранее выявленным генам.

Выявленные гены, в том числе *exoK* и *exoM* проявили разную степень экспрессии на разных средах, что привело к структурной модификации ЭПС. Подобная модификация играет важную роль в получении диэлектрической матрицы с нужными физико-химическими свойствами.

В разделе 3.2, **“Изучение синтеза ЭПС активными штаммами и влияющих факторов. Физико-химические свойства биополимеров”** изучалось влияние углеродных/азотных субстратов, pH среды, катионов на синтез ЭПС штаммами *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 и *R. radiobacter* SZ4S7S14, а также некоторые физико-химические свойства – анализ ИК-спектров, электрон-зондовый микроанализ, просвечивающая электронная микроскопия, мономерный состав биополимеров. Продуцирование ЭПС штаммами было схожим, но среди них штамм *R. radiobacter* SZ4S7S14 отличался высокой активностью. На модифицированной среде, состоящей из D-маннитоэ/дрожжего экстракта в качестве углеродного/азотного источника было синтезировано 5,41 г/л ЭПС. Следует отметить, что у всех штаммов была обнаружена корреляция между синтезом ЭПС и клеточной биомассой, временем культивирования и флокулирующей активностью в

логарифмической фазе инкубации (Рис. 3а). Максимальное накопление ЭПС в культуральной жидкости штамма *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 наблюдалось на среде с глюкозой/дрожжевым экстрактом на 72 ч инкубирования и составило 3,6 г/л. После 72 ч культивирования флокулирующая активность также достигала максимального значения – 92%. Более того, максимальное накопление биомассы штамма тоже было зафиксировано на 72 ч культивирования. Необходимо отметить, что при максимальных значениях флокулирующей активности и синтеза ЭПС из культуральной жидкости штамма было выделено 3,5 г/л клеточной биомассы. Было отмечено резкое снижение pH среды от 7,3 до 5,5 на первый и во второй день культивирования (24 и 48 ч). В период от 60 до 72 ч роста культуры pH снижался до 5,0-5,1 (Рис.3б).

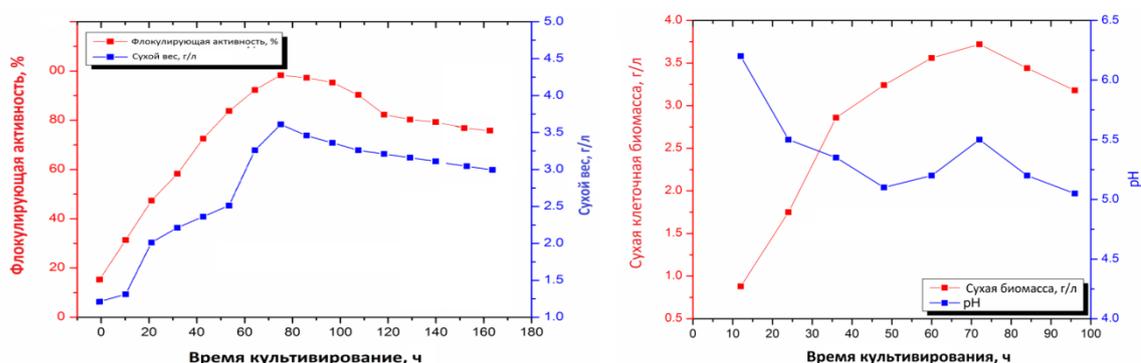


Рис. 3а. Корреляция между синтезом ЭПС и клеточной биомассой, временем инкубации, флокулирующей активностью штамма *R. radiobacter* SZ4S7S14 в логарифмической фазе роста

Рис.3б. Корреляция между количеством клеточной биомассы и pH среды, временем инкубации штамма *R.radiobacter* SZ4S7S14

Анализируя полученные данные можно заключить, что синтез ЭПС штаммом *R.radiobacter* SZ4S7S14 связан с временем инкубирования, клеточной биомассы и pH питательной среды. Это значит, что синтез ЭПС усиливается с увеличением количества клеточной биомассы.

Из тестированных углеродных и азотных источников, D-маннитоза и дрожжевой экстракт способствовали максимальному синтезу ЭПС – 5,41 г/л; тогда как при использовании D-глюкозы образовалось 3,46 г/л ЭПС после 96 ч культивирования (табл.1). Следует отметить, что при использовании D-маннитозы выход ЭПС увеличивался в 1,5 раза, по сравнению с использованием D-глюкозы.

Аналогичная ситуация наблюдалась со штаммами *A.chroococcum* XU1 и *V.japonicum* 36. Синтез ЭПС штаммом *V.japonicum* 36 происходит как и у штамма *R.radiobacter* SZ4S7S14, но следует отметить некоторые различия. Если D-маннитоза и дрожжевой экстракт оказались наиболее оптимальными субстратами для развития штамма *R.radiobacter* SZ4S7S14 и синтеза ЭПС, то *V.japonicum* 36 образовывал максимальную клеточную биомассу и

продуцировал ЭПС в питательной среде, содержащей сахарозу и дрожжевой экстракт.

Таблица 1. Влияния источников углерода и азота на синтез ЭПС и

Источник углерода	Синтез ЭПС, г/л	Активность флокуляции, %	Источник азота	Синтез ЭПС, г/л	Активность флокуляции, %
D-Глюкоза	3,46	89	Дрожжевой экстракт	3,46	92
D-Фруктоза	2,02	77	Пептон	3,41	88
Сахароза	3,51	90	Триптон	2,87	86.5
Мальтоза	2,767	86	Экстракт из суслы	1,65	74
D-Маннитоza	5,41	97	Экстракт из говядины	2,89	87.2
D-Манноза	3,981	92	Казаминокислота	2,5	80

флокулирующую активность штамма *R.radiobacter* SZ4S7S14

Как было отмечено выше, в синтезе вторичных метаболитов большую роль играют макро- и микроэлементы. Исходя из этого, было изучено влияние катионов, таких как Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Al^{+3} , Fe^{+3} и Mo^{+4} на синтез ЭПС и флокулирующую активность биополимеров. Изучение влияния катионов на синтез ЭПС штаммом *R.radiobacter* SZ4S7S14 и флокулирующую активность выявило, что катионы Mo^{+4} , Mg^{+2} , Mn^{+2} и Fe^{+2} способствуют увеличению синтеза биополимера в питательной среде, содержащей глюкозу и дрожжевой экстракт. Следует особо отметить, что соединения Mo^{+4} (в виде соля Na_2MoO_4) значительно увеличивали синтез ЭПС по сравнению с Mg^{+2} , Mn^{+2} и Fe^{+2} (Рис. 4а,б).

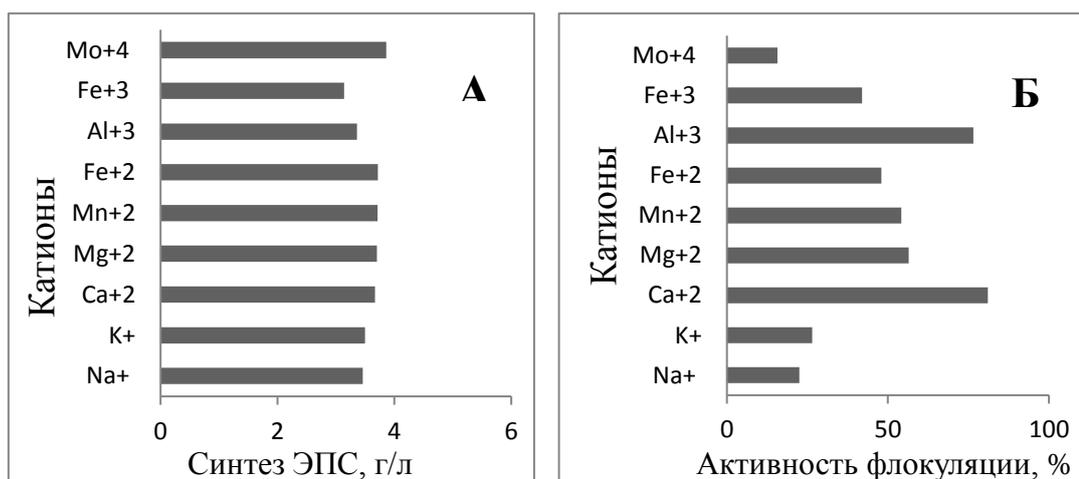


Рис. 4. Влияние катионов на синтез ЭПС штаммом *R. radiobacter* SZ4S7S14 (А) и флокулирующую активность

В среде, содержащей глюкозу/дрожжевой экстракт в присутствии Mo^{+4} *R.radiobacter* SZ4S7S14 продуцировал 3,86 г/л ЭПС, что было на 11,5% больше, чем в отсутствии Mo^{+4} .

ЭПС, синтезированный в среде сахароза/дрожжевой экстракт, состоял из 94,5% полисахарида и 3,05% белков. Mo^{+4} не только влиял на синтез ЭПС штаммом *R.radiobacter* SZ4S7S14, но и способствовал максимальному синтезу ЭПС штаммом *B.japonicum* 36 в среде, содержащей сахарозу/дрожжевой экстракт. При добавлении в среду катионов Ca^{+2} и Al^{+3} , флокулирующая активность ЭПС была выше, чем при применении других катионов.

В разделе 3.3, “Физико-химические свойства ЭПС штаммов” приведены результаты исследования по изучению физико-химических свойств биополимеров. Некоторые физико-химические свойства ЭПС штаммов заслуживают особое внимание. Микроснимки полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии образцов ЭПС штамма *R.radiobacter* SZ4S7S14 выявили, что биополимер образует фибриллы размером 100-350 мкм (Рис.5). Рентген-зондный анализ данного образца показал, что он состоит из 51,47 % О и 45,79 % С.

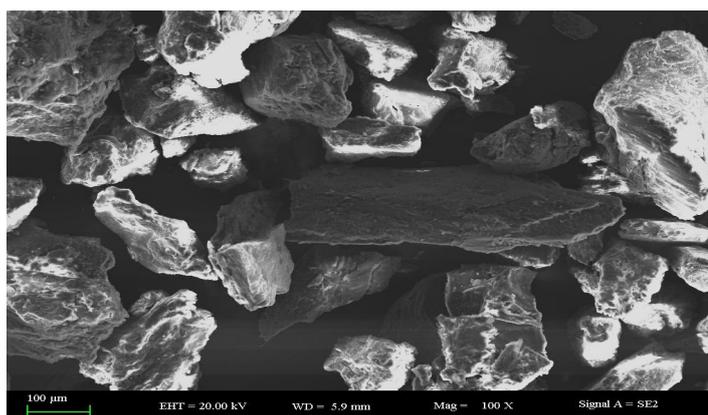


Рис.5. Микроснимок ЭПС штамма *R. radiobacter* SZ4S7S14, полученный с помощью просвечивающей микроскопии

ИК-спектроскопия занимает важную роль в изучении химической структуры неизвестных органических веществ. На ее основе можно судить о наличии химических связей и функциональных групп. ИК-спектр ЭПС штамма *R.radiobacter* SZ4S7S14 выявил широкий и сильный пик при 3447 см^{-1} , свойственный гидроксильным группам (-OH) (Рис.6). Слабый несимметричный пик при 2922 см^{-1} исходит от химической связи C-H в углеводах (Xiong et al., 2010). Пик при 1730 см^{-1} свойственен валентным колебаниям C=O. Несимметричный пик при $1630\text{-}1670 \text{ см}^{-1}$ характерен валентным колебаниям C=O в группе NHCOCH_3 (Xiong et al., 2010). Пик при $1465,7 \text{ см}^{-1}$ соответствует C=C связи и пик при 1074 см^{-1} исходит от валентных колебаний C-O-C в гликозидной связи (Rasulov et al. 2016a).

ИК-спектр ЭПС *V.japonicum* 36 выявил наличие различных пиков от 3420 см⁻¹ до 800 см⁻¹. Самый широкий и сильный пик наблюдался при 3420 см⁻¹, который соответствовал валентным колебаниям гидроксилных групп (О-Н). Широкий пик при 1236-1063 см⁻¹ свойственен валентным колебаниям С-О-С из гликозидных связей и О-Н колебаниям спиртов, тогда как пик при 995 см⁻¹ подтверждает наличие углеводов. Кроме того, пик при 820-972 см⁻¹ подтверждает связь между моносахаридами в полисахаридной матрице ЭПС.

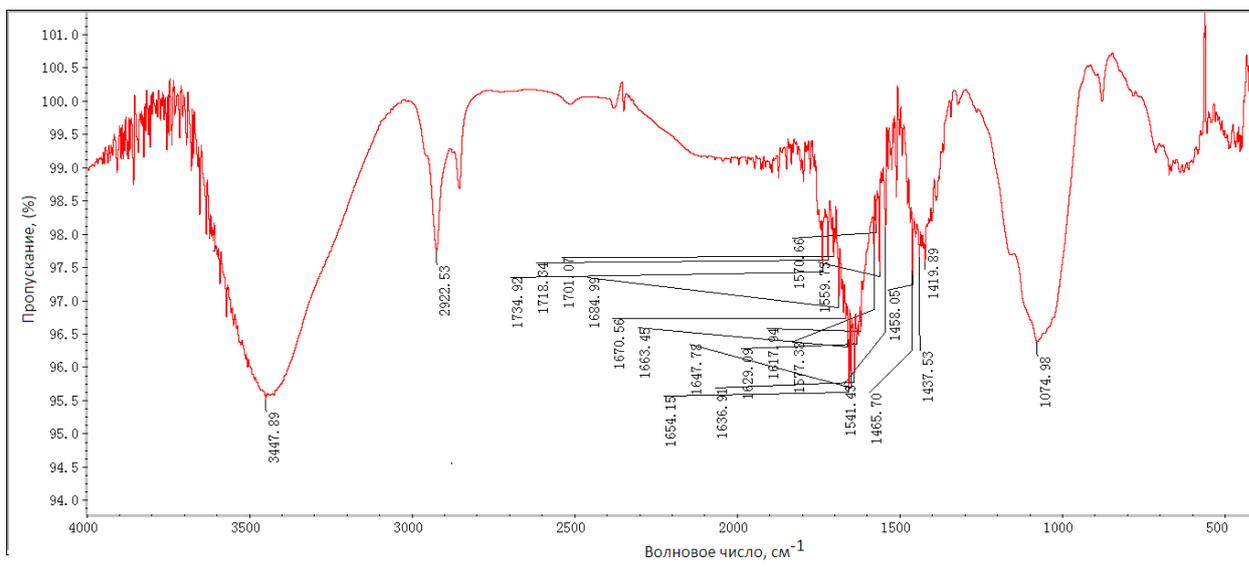


Рис.6. ИК-спектр ЭПС штамма *R. radiobacter* SZ4S7S14

ЭПС штамма *R. radiobacter* SZ4S7S14 состоит из 76,2% углеводов, 12,7% белков, 6,53% урсонных кислот и других компонентов. Состав ЭПС штамма *V.japonicum* 36 значительно варьировал в зависимости от углеродного/азотного источника. В оптимальной для штамма среде, содержащей 2,8% дрожжевого экстракта, синтезировался ЭПС, который содержал 94,68% углеводов и 3,05% белков. ЭПС *A. chroococcum* XU1 состоит в основном из альгинато-белкового комплекса, в котором содержание белков не превышало 3%.

В 3.4-разделе диссертации «Модификация ЭПС штаммов и физико-химические свойства модифицированных биополимеров» описываются результаты по модификации и физико-химическим свойствам ЭПС штаммов. Многие свойства нанобиокмозитов напрямую связаны с физико-химическими свойствами биополимеров – диэлектрической матрицы, которая составляет их основу. Исходя из этого, была исследована структурная модификация ЭПС штаммов *R. radiobacter* SZ4S7S14, *A. chroococcum* XU1 и *V.japonicum* 36, полученных при различных условиях культивирования.

Влияние С/Н источников на синтез ЭПС различными структурами штамма *R. radiobacter* SZ4S7S14 было выявлено на основе анализа ИК-спектров образцов. На различных С/Н источниках (18 вариантов) штамм

синтезировал 7 образцов ЭПС. Это различие было замечено в валентных колебаниях функциональных групп и химических связей (Рис.7).

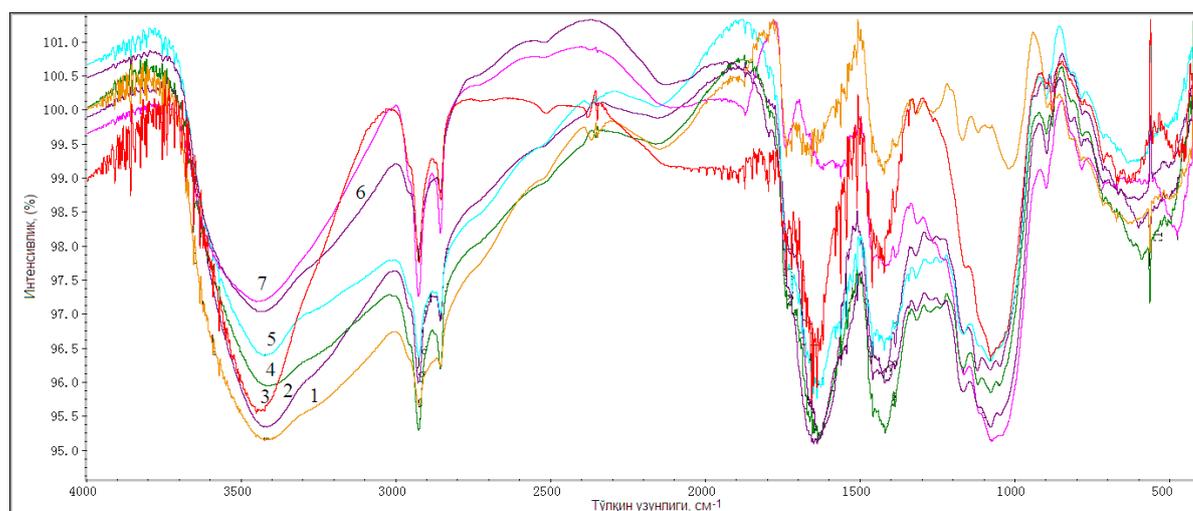
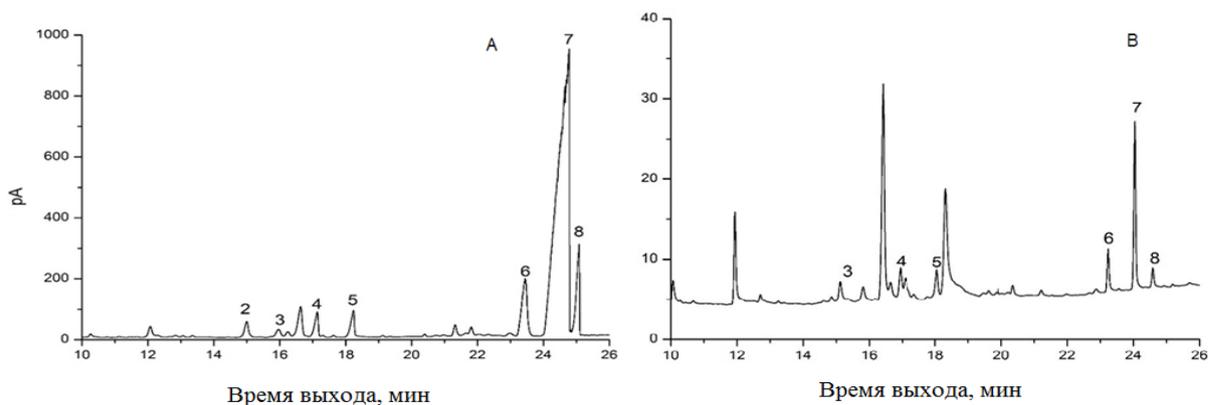


Рис.7. ИК-спектры образцов ЭПС, полученные при культивировании штамма *R. radiobacter* SZ4S7S14 на модифицированной среде ISP2 (1-глюкоза/экстракт солода; 2-сахароза/экстракт солода; 3-сахароза/пептон; 4-манноза/казаминокислота; 5-манноза/дрожжевой экстракт; 6-сахароза/дрожжевой экстракт; 8-глюкоза/экстракт говядины)

Значительные спектральные изменения были намечены при культивировании штамма *R. radiobacter* SZ4S7S14 на средах с глюкозой/экстрактом солода (1-образец), сахарозой/экстрактом солода (3-образец), сахарозой/пептоном (9-образец), маннозой/казаминовой кислотой (11-образец), маннозой/дрожжевым экстрактом (14-образец), сахарозой/дрожжевым экстрактом (15-образец) и глюкозой/экстрактом говядины (18-образец). Например, валентные колебания –ОН групп этих образцов были выявлены при 3412,66, 3421,10, 3431,17, 3447,39 и 3447,67 см⁻¹. Валентные колебания ассиметричного С-Н в углеводах были выявлены при от 2922,2 до 2927,0 см⁻¹. Валентные колебания химической связи С=О в группе –NHCOCH₃ были выявлены при 1617,94, 1629,09, 1636,42, 1636,91, 1647,35, 1647,78, 1653,71 и 1654,15 см⁻¹. Валентные колебания свойственные к С-О-С гликозидной связи были выявлены при от 1074 до 1076,16 см⁻¹. Эти изменения показывают, что С/Н источники влияют не только на продуктивность синтеза ЭПС, но и на их химическую структуру.

ИК-спектры веществ дают характеристику о природе химических связей и функциональных групп, тогда как их масс-спектры позволяют делать выводы о качественном и количественном содержании соединений. То же самое было выявлено у ЭПС образцов штамма *R. radiobacter* SZ4S7S14, полученных при культивировании штамма на различных средах (Рис.8). Например, на среде, содержащей 0.5% NaCl штамм синтезировал ЭПС со следующим мономерным составом: Glu:Man:Gal:Xyl:Ara:Rha:Rib=31.21:3.02:2.77:1:0.91:0.64:0.41, тогда как при 1.0% NaCl Glu:Man:Gal:Xyl:Ara:Rha:Rib=7.65:1:0.69:0.22:0.2:0.16:0.1, при

1.5% NaCl Glu:Man:Gal:Ara:Xyl:Rha:Rib=9.39:1.89:1:0.58:0.52:0.46:0.26, при 2.0% NaCl Glu:Man:Ara:Xyl:Rha:Rib=7.9:2:2:1.58:1.1:1. На нормальной среде ISP2 штамм синтезировал ЭПС с мономерным составом



Glu:Gal:Man:Ara:Xyl:Rha:Rib=11.66:1:0.9:0.37:0.37:0.15:0.14 (в молярных соотношениях).

Рис.8. ГХ-МС спектроскопия моносахаридов ЭПС штамма *R. radiobacter* SZ4S7S14, полученных при культивировании штамма на среде с 0,5% (А) и 2,0% (В) NaCl (2-рамноза, 3-рибоза, 4-арабиноза, 5-ксилоза, 6-манноза, 7-глюкоза, 8-галактоза).

В экспериментах было доказано, что в стрессовых условиях штамм *R. radiobacter* SZ4S7S14 синтезирует различные ЭПС, отличающиеся по химической структуре. Влияние C/N источников на синтез ЭПС у штамма *V.japonicum* 36 было иным, чем у штамма *R. radiobacter* SZ4S7S14. Это различие было отмечено в соотношениях полисахарида и белка в конечном продукте штамма *V.japonicum* 36 при культивировании штамма на среде, содержащей дрожжевой экстракт (как N-источник). В присутствии 2,5 г/л дрожжевого экстракта штамм синтезировал ЭПС, который состоял из 94,5% полисахарида и 3,05% белка.

У штамма *A.chroococcum* XU1 это изменение было выявлено на валентных колебаниях гидроксильных групп (-ОН) при 3440-3445,5 см⁻¹.

В 3.5-разделе диссертации «Синтез наночастиц серебра на основе матриц ЭПС diaзотрофных ризобактерий, физико-химическая характеристика нанобиокмозитов и оценка их устойчивости» описаны результаты биосинтеза наночастиц Ag, AgCl и Ag/AgCl, изучение их морфологии, некоторых физико-химических свойств и устойчивости.

Мониторинг синтеза НЧ-Ag, НЧ-AgCl и НЧ-Ag/AgCl на основе матрицы ЭПС проведен путем УФ-спектроскопией нанокolloидных растворов.

Например, НЧ-Ag, полученные на основе ЭПС штамма *Bradyrhizobium japonicum* 36, проявили максимум поглощения при 450 нм, тогда как НЧ-Ag, синтезированные на основе ЭПС штамма *R.radiobacter* SZ4S7S14 проявили максимум поглощения при 420 нм. Аналогичная картина наблюдалась и с НЧ-Ag, полученными на основе ЭПС штамма *A.chroococcum* XU1 (Рис.9А). НЧ-Ag, синтезированные на основе ЭПС штаммов, проявили максимум

поглощения при 410-450 нм. Обычно, НЧ-Ag проявляют максимум поглощения при 380-550 нм в зависимости от их морфологии и способности образовывать своеобразные кластеры. НЧ-Ag, имеющие максимумы поглощения при 400-440 нм имеют сферическую форму (Manivasagan et al., 2015). Исходя из этого можно заключить, что синтезированные на основе ЭПС трех штаммов НЧ-Ag имеют сферическую форму.

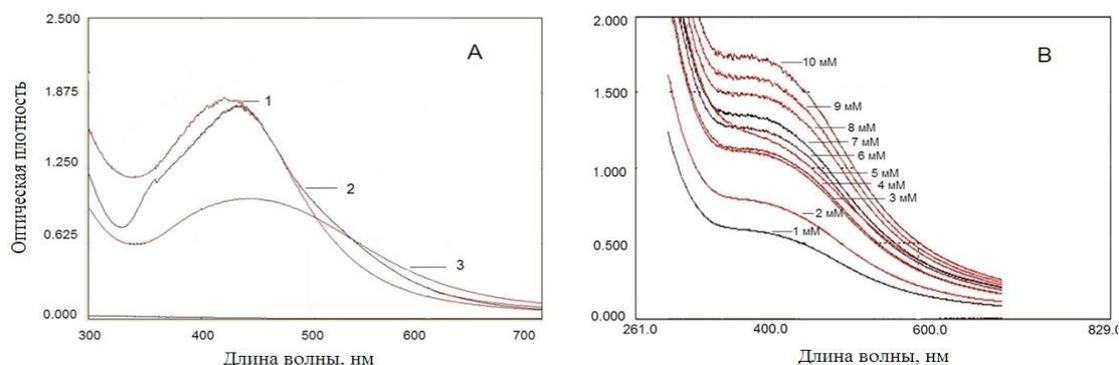


Рис.9. УФ-спектроскопия коллоидов НЧ-Ag, синтезированных на основе матриц ЭПС штаммов (1- *R.radiobacter* SZ4S7S14 ЭПС+Ag⁺; 2-*A.chroococcum* XU1 ЭПС+Ag⁺; 3-*Bradyrhizobium japonicum* 36ЭПС+Ag⁺) (А); УФ-спектры НЧ-Ag, синтезированных на основе ЭПС штамма *B.japonicum* 36 при различных концентрациях AgNO₃ (В)

В синтезе НЧ-Ag, важное значение имеют начальные концентрации исходных веществ – ЭПС и AgNO₃. Исходя из этого, было изучено влияние концентраций субстратов на синтез НЧ-Ag. Во всех вариантах экспериментов увеличение концентрации субстратов, в первой очереди концентрации AgNO₃, положительно влияло на синтез и количество НЧ-Ag. Об этом можно судить на примере ЭПС *B.japonicum* 36, когда при увеличении концентрации AgNO₃ в реакционной среде резко возросло образование НЧ-Ag. При концентрации 10 мМ Ag⁺ наблюдался максимальный синтез (Рис.9В).

Стабильность НЧ-Ag, полученных на основе матриц ЭПС, изучалась в течение 2 месяцев путем снятия УФ-спектров нанокolloидных растворов. УФ-спектры всех образцов остались почти неизменными в течении 2 месяцев.

В отличие от НЧ-Ag, НЧ-AgCl имеют максимумы поглощения при 200-350 нм. Именно эти различия позволяют отличать их от НЧ-Ag. Были синтезированы и НЧ-Ag, и НЧ-AgCl на основе матриц ЭПС в присутствии ионов Cl⁻ (в условиях C_м(Ag⁺)>C_м(Cl⁻) в реакционной среде). Когда концентрация ионов Cl⁻ превышала или была равной концентрации ионов Ag⁺(C_м(Cl⁻)≥C_м(Ag⁺) на матрице ЭПС были синтезированы только НЧ-AgCl. Например, на матрице ЭПС штамма *B.japonicum* 36 при равных концентрациях ионов Ag⁺ и Cl⁻ (в виде солей AgNO₃ и NaCl) синтезированы только НЧ-AgCl, с максимумом поглощения при 335 нм (Рис.10а).

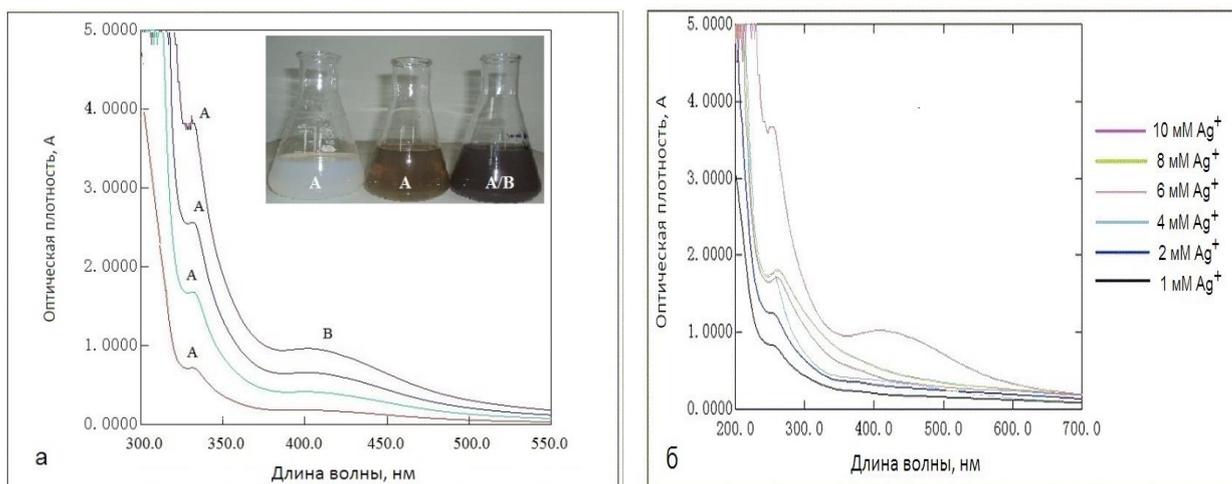


Рис. 10. УФ-спектры Ag/AgCl-НЗ, синтезированные на основе матриц ЭПС разных штаммов. а-УФ-спектры НЧ-Ag (А) и НЧ-AgCl (В), синтезированные на матрице ЭПС *B.japonicum* 36; б – УФ-спектры НЧ-Ag/AgCl, полученные на основе матрицы ЭПС штамма *A.chroococum* XU1 при различных концентрациях Ag^+

На матрице ЭПС *A.chroococum* XU1 были синтезированы НЧ-AgCl, с максимумом поглощения при 250 нм. Проявления различных максимумов при разных длинах волн объясняется морфологией НЧ. С образованием кластеров увеличиваются максимумы поглощения.

Когда концентрация ионов Ag^+ в среде была больше, чем концентрация ионов Cl^- , выявлено образование специфических комплексов НЧ-Ag/AgCl. Этот процесс можно объяснить на примере использования ЭПС *A.chroococum* XU1. В результате электростатического притяжения ионов Ag^+ и Cl^- в реакционной среде образуется сначала AgCl. Не прореагировавшие ионы Ag^+ начинают восстанавливаться на матрице ЭПС. На спектрах подобных комплексов выявляются максимумы поглощения, свойственные и НЧ-Ag, и НЧ-AgCl. Аналогичную картину можно наблюдать на УФ-спектре комплекса НЧ-Ag/AgCl, синтезированных на основе матрицы ЭПСА *chroococum* XU1 (Рис. 10б).

Для изучения состояния элементарного Ag и его количества в нанобиокompозитах, содержащих НЧ-Ag и НЧ-AgCl, методы рентгенструктурного (XRD) и рентген-зондового микроанализа (EDX) играют важную роль. Исходя из этого, был проведен рентгенструктурный анализ нанобиокompозитов, полученных на основе матриц ЭПС штаммов *A.chroococum* XU1, *B.japonicum* 36 и *R.radiobacter* SZ4S7S14. На рентгенструктурном спектре НЧ-Ag синтезированных на матрице ЭПС были выявлены пики на 2θ регионе, свойственные атомам серебра (Рис.11а,б).

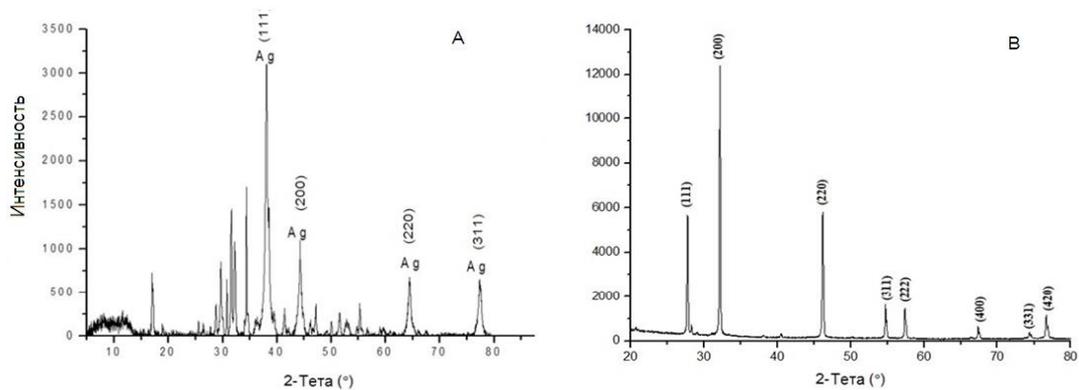


Рис. 11. Рентгенструктурный анализ (XRD) НЧ-Ag (А) и НЧ-AgCl (В), синтезированных на матрице ЭПС штамма *B.japonicum* 36

На рентгенструктурном спектре НЧ-Ag, синтезированных на матрице ЭПС *A.chroococum* XU1 были выявлены четыре пика Ag на 2θ регионе 47.5° , 55.5° и 64.5° , соответствующие к панелям (111), (200), (220) и (311), тогда как на рентгенструктурных спектрах НЧ-Ag, полученных на основе матриц ЭПС штаммов *B.japonicum* 36 и *R.radiobacter* SZ4S7S14 были выявлены пики на 46.5° , 54.5° , 64.5° и 46.5° , 54.5° , 65.5° 2θ регионе. На рентген-зондовом микроанализе нанобиокомпозитов был выявлен пик при 3 КЭв, соответствующий атомарному Ag.

Размеры НЧ-Ag, синтезированных на матрицах ЭПС штаммов варьировали от 6 до 50 нм (Рис. 12), характеризовались неровной, полидисперсной поверхностью (Рис. 13).

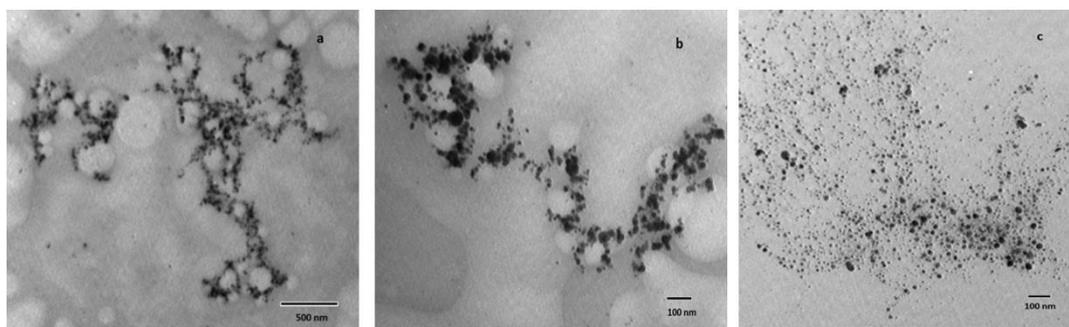


Рис. 12. Просвечивающая-электронная микроскопия НЧ-Ag, полученных на основе матрицы ЭПС штамма *B.japonicum* 36

Надо отметить, что НЧ-Ag, полученные на основе матриц ЭПС штаммов, были одинаковыми.

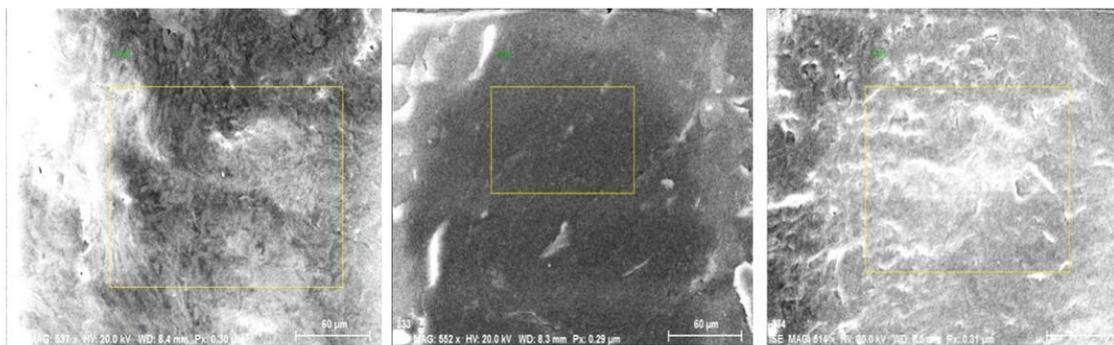


Рис. 13. Микроснимки, полученные с помощью сканирующей-электронной микроскопией поверхности комплекса НЧ-Ag/AgCl, синтезированных на основе матрицы ЭПС штамма *Azotobacter chroococcum* XU1

В 3.6-разделе диссертации «Антимикробные свойства синтезированных нанобиокомпозитов» описываются результаты по исследованию антимикробных свойств НЧ-Ag и НЧ-AgCl, содержащие нанокompозиты, полученные на основе матриц ЭПС штаммов *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 и *R.radiobacter* SZ4S7S14.

Одним из основных свойств нанобиокомпозитов является их биоцидная активность. В наших исследованиях была изучена биоцидная активность всех нанобиокомпозитов против тест – культур патогенов, таких как *E.coli* ATCC 229, *S.aureus* ATCC6538, *C.albicans* ATCC10231, *Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectedum и *Verticillium dahliae*. Все тестируемые нанобиокомпозиты проявили высокую биоцидную активность. В частности, НЧ-Ag, полученный на основе матрицы ЭПС штамма *B.japonicum* 36, при малых концентрациях показал биоцидную активность против *E.coli* ATCC 229, *S.aureus* ATCC 6538, *C.albicans*. На твердых средах было отмечено образование лизисных зон диаметром 18-23 мм, тогда как в жидких средах наблюдалось резкое снижение титра клеток всех штаммов.

Изучена антибактериальная активность НЧ-Ag, полученных на основе матрицы ЭПС штамма *B.japonicum* 36, при низких (0,25-2,5 мкг/мл) и высоких (до 50 мкг/мл) концентрациях. Титр клеток патогенных тест – культур был оценен в разных интервалах времени: до 3 дней при низких концентрациях, тогда как при высоких концентрациях в течении 12 ч. Было намечено резкое снижение титра клеток при воздействии НЧ-Ag. При высоких концентрациях НЧ-Ag титр клеток составлял $1,2 \cdot 10^4$ – $1,5 \cdot 10^5$ кл/л или 25-30% от общего титра клеток (Рис.14). Из тест-культур *S.aureus* ATCC 6538 оказалась намного неустойчивой, чем штамм *E.coli* ATCC 229. Во всех экспериментальных вариантах этот штамм характеризовался низким титром клеток. При концентрациях НЧ-Ag 2,0 и 2,5 мкг/мл – 70 % биомассы штамма *S.aureus* ATCC 6538 погибло после 12 ч. После второго и третьего дня все клетки в культуральной среды осаждались на дне пробирки в мертвом виде (Рис.15). При высоких концентрациях среды НЧ-Ag (>2.5 мкг/мл) после 2 ч наблюдалось снижение титра клеток.

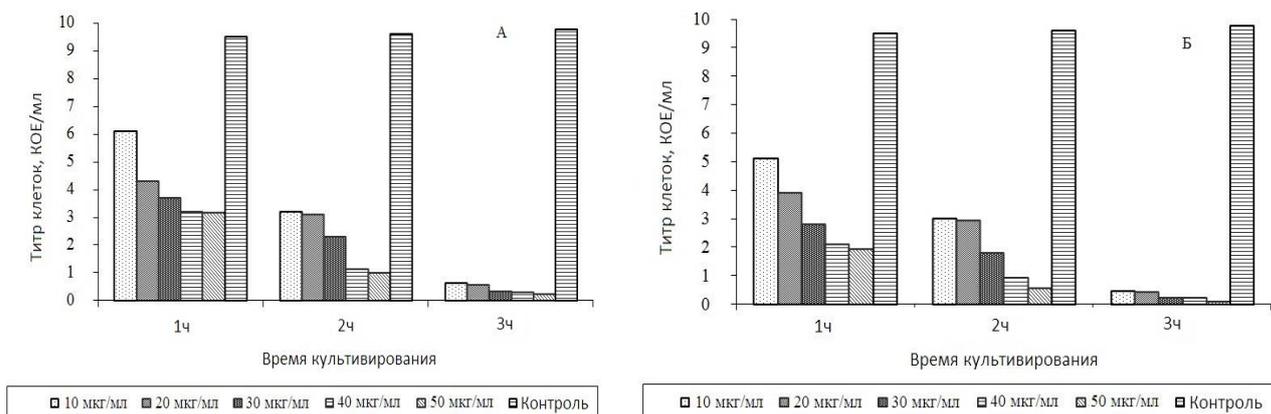


Рис.14. Снижение титра клеток штаммов *E.coli* ATCC 229 (А) и *S.aureus* ATCC 6538 (Б) при высоких концентрациях НЧ-Ag, полученных на основе матрицы ЭПС штамма *V.japonicum* 36



Рис.15. Осаждение мертвых клеток тест – культур после воздействия НЧ-Ag, полученных на основе матрицы ЭПС штамма *V.japonicum* 36

Аналогичная ситуация было отмечено и с НЧ-Ag, полученными на основе матриц ЭПС, и НЧ-Ag/AgCl, полученными на основе матрицы ЭПС штамма *A.chroococcum* XU1 против *Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfecum и *Verticillium dahliae*. Например, даже при низких концентрациях НЧ-Ag/AgCl наблюдалось подавление развития патогенных штаммов.

Таким образом, можно заключить, что нанобиокомпозиты содержащие НЧ-Ag, НЧ- AgCl и НЧ-Ag/AgCl, синтезированные на основе ЭПС штаммов diaзотрофных ризобактерий имеют высокую биоцидную активность. Увеличение их концентрации способствуют увеличению их антимикробных свойств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе полученных данных диссертационной работы «Изучение механизмов антимикробного действия наночастиц серебра на основе экзополисахаридов diaзотрофных ризобактерий» были представлены следующие выводы:

1. Путем проведения скрининга штаммов diaзотрофных ризобактерий на синтез ЭПС были отобраны штаммы *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 и *R.radiobacter* SZ4S7S14. На основе ПЦР-амплификации генов 16SPHK определена видовая принадлежность этих культур. В модифицированных средах активность штаммов была следующей: *B.japonicum* 36 -5,6; *R.radiobacter* SZ4S7S14 -3,6; *A.chroococcum* XU1 – 3,2 г/л.

2. При применении D-мальтозы и дрожжевого экстракта как углеродного и азотного источника, *R.radiobacter* SZ4S7S14 продуцировал 5,41 г/л ЭПС, при использовании D-глюкозы, после 96 ч культивирования продуцировалось 3,46 г/л ЭПС. Аналогичная ситуация наблюдалась и со штаммами *A.chroococcum*XU1 и *B.japonicum* 36.

3. В синтезе ЭПС у штаммов участвуют несколько генов и их кластеры, степень экспрессии которых напрямую связана с наличием субстратов в культивируемой среде. Например, гены *exoK* и *exoM* в штамме *R.radiobacter* SZ4S7S14 образуют большой кластер, который отвечает за образование ЭПС штаммом. Манноза способствует максимальной экспрессии этих генов, в результате чего увеличивается синтез ЭПС. Добавление в среду NaCl снижает экспрессию генов *exoK* и *exoM*, при этом образуются образцы ЭПС, отличающиеся по мономерному составу. Аналогичная картина наблюдалась и со штаммами *A.chroococcum*XU1 и *B.japonicum* 36(ген *algA*).

4. Примечательно резкое увеличение синтеза ЭПС при использовании Mo^{+4} (в виде соли Na_2MoO_4). В присутствии Mo^{+4} в среде, содержащей глюкозу/дрожжевой экстракт, штамм *R.radiobacter* SZ4S7S14 продуцировал 3,86 г/л ЭПС. Выход ЭПС был выше на 11,5 г/л чем на среде без Mo^{+4} . Применение катионов Ca^{+2} и Al^{+3} увеличивало флокулирующую активность ЭПС штамма *B.japonicum* 36.

5. ЭПС штамма *R.radiobacter* SZ4S7S14, полученные после культивирования в среде содержащей сахарозу /дрожжевой экстракт состоит из 94,5% полисахарида и 3,05 % белка. Фибриллы ЭПС были размером 100-350 мкм, в виде неровных кирпичей, и состояли из 51,47 % и 45,5 % C.

6. На основе ЭПС штаммов можно получать нанобиокомпозицы, содержащие НЧ-Ag с максимумом поглощения при 410-460 нм, и НЧ- AgCl с максимумом поглощения при 250-270 нм.

7. Управление концентрациями Ag^+ и Cl^- в реакционной среде позволяет синтезировать НЧ-Ag, НЧ-AgCl и НЧ-Ag/AgCl. При соотношении $C_m(Ag^+) > C_m(Cl^-)$ синтезируются НЧ-Ag/AgCl, при $C_m(Cl^-) \geq C_m(Ag^+)$ синтезируются только НЧ-AgCl.

8. Можно изменить морфологию, увеличить стабильность отдельно синтезированных НЧ-Ag путем их впитывания в матрицу ЭПС *R.radiobacter*

SZ4S7S14. В результате впитывания НЧ–Ag с максимумом поглощения 440 нм (отдельно синтезированный) на матрицу ЭПС *R.radiobacter* SZ4S7S14 получаются новые нанобиокомпозиты с максимумом поглощения при 410-420 нм.

9. Впитывание наночастиц в матрицу ЭПС позволяет создать новые типы нанобиокомпозитов. При этом, не изменяются химические связи и функциональные группы в матрице – ЭПС.

10. Синтезированные НЧ– Ag, НЧ–AgCl и НЧ–Ag/AgCl на основе ЭПС штаммов позволяют контролировать популяции патогенных микроорганизмов. Эффективность применение наночастиц зависит от их конечной концентрации.

**SCIENTIFIC COUNCIL AWARDING SCIENTIFIC DEGREE
DSc.27.06.2017.B.38.01 AT INSTITUTE OF MICROBIOLOGY AND
NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

**INSTITUTE OF GENETICS AND PLANT EXPERIMENTAL BIOLOGY
ACADEMY OF SCIENCES REPUBLIC OF UZBEKISTAN**

RASULOV BAKHTIYOR ABDUGHAFUROVICH

**STUDY OF SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES ON THE BASIS
OF EXOPOLYSACCHARIDES OF DIAZOTROPHIC RHIZOBACTERIA
AND MECHANISMS THEIR ANTIMICROBIAL EFFECT**

03.00.04 – microbiology and virology

**DISSERTATION ABSTRACT FOR THE DOCTOR OF SCIENCES (DSc)
OF BIOLOGICAL SCIENCES**

Tashkent – 2019

This dissertation of DSc has been registered with the number B2019.2.DSc/B94 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.

The dissertation has been prepared at the Institute of Genetics and Plant Experimental Biology Chemistry.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council (microbio.academy.uz) and on the website of «Ziyonet» information and educational portal (www.ziyonet.uz).

Scientific consultant:

Davranov Kahramon

Doctor of biological sciences

Official opponents:

Tashmuhamedova Shohista Sobirovna

Doctor of biological sciences, professor

Normahamatov Nodirali Sokhobalievich

Doctor of chemical sciences

Buriev Zabardast Tojiboevich

Doctor of biological sciences

Leading organization:

Tashkent State Agrarian University

Defence will take place on «_____» 2019 year 10:00 at the once-only meeting of the Scientific council DSc.27.06.2017.B.38.01 of the Institute of Microbiology and National University of Uzbekistan at the following address: 100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71.

Dissertation is registered at the Information Resource Centre at the Institute of Microbiology (100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71), e-mail: microbio@academy.uz

Abstract of dissertation is distributed on «_____» 2019 year.
(Protocol at the register _____ on «_____» 2019 year)

Aripov Takhir

Chairman of the scientific council

awarding scientific degrees,

D.B.Sc., academician

Juraeva Rohila

Scientific secretary of the scientific council
awarding scientific degrees, PhD, senior researcher

Gulyamova Tashkhan

Chairman of the academic seminar under the
scientific council awarding scientific degrees,

D.B.Sc., professor

INTRODUCTION (abstract of DSc thesis)

The aim of the research work was synthesis of the silver nanoparticles on the basis of exopolysaccharides of rhizobacteria and study of their antimicrobial properties.

The object of the research work were selected strains *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 and *R. radiobacter* SZ4S7S14 – active producers of exopolysaccharides, their biopolymers and nanobiocomposites, containing silver nanoparticles.

Scientific novelty of the research work:

as a result of screening for synthesis of exopolysaccharides it was selected three active strains, which further were identified as *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 and *R. radiobacter* SZ4S7S14;

it was researched ability of the strains produce exopolysaccharides in different substrates; and was selected optimal conditions of cultivation for maximal yield of the biopolymers;

for the first time it was revealed a large gene cluster, containing *exoK* and *exoM*, which take part in biosynthesis of exopolysaccharides. In presence of mannose relative expression abundance of these genes increased, whereas in salt stress, decreased. It was confirmed a structural modification of molecular structure depending on relative expression degree. Thus, strain *R. radiobacter* SZ4S7S14 produced four exopolysaccharides in different stress conditions and chemical structures of these biopolymers were identified;

it was researched physic-chemical properties and monomers content of exopolysaccharides of *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 and *R. radiobacter* SZ4S7S14. Besides, it was revealed structural modification of exopolysaccharides due to the nature of the substrate. FT-IR spectra of the exopolysaccharides exhibited qualitative changes of hydroxyl groups (-OH);

on the basis of exopolysaccharides of the strains, namely *A.chroococcum* XU1, *B.japonicum* 36 and *R. radiobacter* SZ4S7S14 was synthesized silver nanoparticles (Ag-NPS) with absorption maximums at 400-420 nm, and silver chloride nanoparticles (AgCl-NPs) with absorption maximums at 250-275 nm;

XRD of nanobiocomposites exhibited elemental Ag at 2θ at 47.5° , 55.5° and 64.5° degrees (the nanobiocomposite obtained with exopolysaccharide of *B.japonicum* 36). The nanobiocomposite, biofabricated with application of exopolysaccharide of *A.chroococcum* XU1 and containing AgCl-NPs at 2θ at 27.64° , 32.24° , 46.2° , 54.78° , 57.44° , 67.42° , 74.4° and 76.6° . analogical data was also obtained from other nanobiocomposites;

it was synthesized novel nanobiocomposite with a new method – impregnation of Ag-NPs into exopolysaccharide of *R. radiobacter* SZ4S7S14 and was characterized its physic-chemical properties;

it was revealed antimicrobial properties of all obtained nanobiocomposites against pathogenic bacteria and fungi.

Implementation of the research results. As a result of obtained data on development of “Bioazot” biofertilizer:

a patent of the Republic of Uzbekistan have been issued for indole-3-acetic acid and gibberellins producing, salt-tolerant bacterial strain *Azotobacter chroococcum* N1 (IAP 04887, 2012). The strain can be used for manufacturing of the biopreparation for cotton (*Gossypium hirsutum* L) and (*Triticum aestivum* L).

The “Bioazot” biopreparation have been applied in popcorn and potato plantation of Akkurgan region, Tashkent Province (a certificate of Ministry of Agriculture № 02/023-221 issued on 11.11.2018). Application of the biofertilizer resulted in crop enhancement, soil fertility improvement, immobilization of soil salts and enhanced resistance of the plants against the pathogens.

The “Bioazot” biopreparation on the basis of diazotrophs and their exopolysaccharides have been registered by State Chemistry commission of the Republic of Uzbekistan (certificate № 1A 1670 issued on 23.04.2018) to apply in agriculture of Uzbekistan. Application of the biofertilizer resulted in increasing of incomes of farmers, and crop enhancement of cotton, popcorn and potato.

The structure and volume of the thesis. Containing 180 pages of text, the dissertation has introduction, four chapters, conclusions, applications and list of references.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS
I бўлим (I часть; I part)

1. Rasulov B.A., Davranov K.D., Jun L.W., Formation of Ag/AgCl nanoparticles in the matrix of the exopolysaccharide of a diazotrophic strain *Azotobacter chroococcum* XU1//Microbiology –2017.-№2.P.197-200 (№40 ResearchGateИФ-0.78).
2. Расулов Б.А., Давранов К. Продуцирование экзополисахарида штаммом *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 // Вестник НУУз – 2017.-№3/2.-С.130-133 (03.00.00; №9).
3. Расулов Б.А., Давранов К. Изучение синтеза экзополисахарид-белкового комплекса *Azotobacter chroococcum* XU1 в условиях глубинного культивирования // Вестник НУУз – 2017.-№3/2.-С.134-137 (03.00.00; №9).
4. Расулов Б.А., Давранов К. Влияние физико-химических факторов на продуцирование экзополисахарида штаммом *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 // Вестник НУУз – 2017.-№3/2.-С.138-140 (03.00.00; №9).
5. Rasulov B.A., Li L., Yong-Hong L., Osama A.M., Xiao M., Ma J.B., Li W.J. Production, characterization and structural modification of exopolysaccharide-based biofloculant by *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 and media optimization // 3 Biotech – 2017. - №. 7. P.179 (№11 SpringerIF- 3.05).
6. B.A. Rasulov, M.A. Pattaeva, A. Yili, H.A. Aisa. Polysaccharide-based biofloculant template of a diazotrophic *Bradyrhizobium japonicum* 36 for controlled assembly of AgCl nanoparticles//International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 86,P. 682-688 (№40 ResearchGate IF-2.61).
7. B.A. Rasulov, P. Rozi, M.A. Pattaeva, A. Yili, H.A. Aisa. Exopolysaccharide-based biofloculant matrix of *Azotobacter chroococcum* XU1 for synthesis of AgCl nanoparticles and its application as novel biocide nanobiomaterial // Materials, 2016, 9, P. 528 (№40 ResearchGate IF-1.73).
8. B.A. Rasulov, N. Rustamova, Z.H.Qing, A. Yili, H.A. Aisa. Synthesis of silver nanoparticles on the basis of low- and high-molar-mass exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* 36 and its antimicrobial activity against some pathogens // Folia Microbiologica, 2016, 61, P.283-293 (№40 ResearchGate IF-1.21).
9. Расулов Б.А., Хасанов Р.К., Паттаева М.А., Хохлачева В.Е., Бегматова Г.Н. Синтез наночастиц серебра на основе экзополисахарида *Azotobacter chroococcum* 79(1) и их фунгицидная активность //Узбекский биологический журнал, 2016, 2, С.56-58 (03.00.00 №5).
10. Rasulov, B.A., Yili, A., Aisa, H.A. Removal of Silver from Aqueous Solution by *Azotobacter chroococcum* XU1 Biomass and Exopolysaccharide

//*Advances in Microbiology* – 2015. - №5.-P.198-203 (№40 ResearchGate IF-0.60).

11. Расулов Б.А. Изучение синтеза экзополисахарид-белкового комплекса *Azotobacter chroococcum* XU1 в условиях глубинного культивирования // Доклады Академии Наук, 2014, 6, С. 32-33 (03.00.00 №2).
11. Расулов Б.А. Некоторые свойства экзополисахарид синтезирующего штамма *Azotobacter chroococcum* XU1 // Доклады Академии Наук, 2014, 6, С. 65-67 (03.00.00 №2).
12. Rasulov B.A., Yili A., Aisa H.A. Biosorption of Metal Ions by Exopolysaccharide Produced by *Azotobacter chroococcum* XU1 // *Journal of Environmental Protection* – 2013. -№4.-P. 989-993 (№40 ResearchGate IF-0.60).
13. Расулов Б.А., Кадырова Г.Х. Солеустойчивый штамм бактерий *Azotobacter chroococcum* N1, продуцент индолил-3-уксусной кислоты и гиббереллинов для приготовления препаратов внекорневой и корневой подкормки хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L) и пшеницы (*Triticum aestivum* L), произрастающих на засоленных почвах. Патент.(IAP 04887 2014).

Пбўлим (Пчасть;Пpart)

14. Расулов Б.А. Получение и активность наночастиц серебра на основе экзополисахарида diaзотрофного штамма *Bradyrhizobium japonicum* 36 и $AgNO_3$ // *Biotechnologia Acta*, 2014, 7(6), P. 57-61.
15. Rasulov B.A., Yili A., Aisa H.A. Synthesis of exopolysaccharides by *Azotobacter chroococcum* XU1 // Сборник тезисов докладов V съезда микробиологов Узбекистана. Ташкент, 2012. -С. -9.
16. Расулов Б.А. *Azotobacter chroococcum* XU1 штамми экзополисахарид-оксил комплексининг кимёвий таркиби // Достижения и перспективы экспериментальной биологии растений: Материалы Республиканской науч.-практич.конф.–Ташкент, 2013.- С.149-150.
17. Расулов Б.А., Хожиев З.А., Ядгаров Х.Т. Изучение активных местных штаммов клубеньковых бактерий вида *Bradyrhizobium japonicum* и их ассоциативный симбиоз с новыми сортами сои // Достижения и перспективы экспериментальной биологии растений: Материалы Республиканской науч.-практич.конф.– Ташкент, 2013.- С.150-153.
18. Расулов Б.А., Хасанов Р.К., Паттаева М.А., Хохлачева В.Е., Бегматова Г.Н. Изучение синтеза наночастиц серебра на основе экзополисахарида *Azotobacter chroococcum* 79(1) и $AgNO_3$ // Сборник тезисов докладов Республиканской науч.-практич.конф. молодых ученых – Ташкент, 2015. – С.361-363.
19. M.A.Pattaeva, B.A.Rasulov, O.G. Abdullaev, A. Yili. Synthesis and stabilization of AgCl-nanoparticles by exopolysaccharide-based biofloculant of *Azotobacter chroococcum* XU1 // “Актуальные проблемы физики конденсированных сред и преподавания физики”: Материалы научно-

- практической конференции с международным участием.–Наманган, 2016. -С.22-23.
20. Kadirova G.Kh., Rasulov B.A., Djabarova O.I., Khalilov I.M. Bioremediation of saline soils by cyanobacteria // International scientific conference «Microorganisms and Biosphere». Moscow. 2007. pp.49-50.
 21. Rasulov B.A. Production of indole-3-acetic acid by *Azotobacter* //11th Inter. Conference «Current problems of chemical natural compounds» 18-19 march. Tashkent, 2009. p.138
 22. Расулов Б.А., Шакиров З.С., Влияние бактерий рода *Azospirillum* и клубеньковых бактерий на рост и развитие ксерофитных бобовых растений // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 16-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 16 - 21 апреля 2012 года). Сборник тезисов, С.22.
 23. Кадырова Г.Х., Расулов Б.А. Изучение некоторых свойств “γ” мутантов цианобактерий *Nostoc pruniforme* устойчивых к цианофагу пр-1t (5) // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 16-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 16 - 21 апреля 2012 года). Сборник тезисов, С.23.

Босишга рухсат этилди 12.06.2019

Бичими 60x84^{1/16}, «Times New Roman»

гарнитурада рақамли босма усулида босилди.

Шартли босма табоғи 4. Адади: 100. Буюртма: № 39.

Ўзбекистон Республикаси Фанлар Академияси,

«ФАН» нашриёти давлат корхонаси босмахонасида чоп этилди
100047, Тошкент ш, Яхё Ғуломов кўчаси, 70-уй.

