

## Mikrob hujayrasi sonini hisoblash usullari

**Mashg'ulot o'tkazishdan maqsad.** Hisoblash kameralarida fiksirlab bo'yalgan mazoklarda mikroorganizmlar hujayrasini sanash usullarini o'zlashtirish. Quyuq muhitda o'stirish yo'li bilan hujayralar sonini hisoblash. Mikrob biomassasini aniqlash, aerob va anaerob mikroorganizmlarni o'stirish yo'llarini o'rganish. Tashqi muhit omillarining mikroorganizmlarga ta'sirini bilib olish.

Mikroorganizmlar hujayrasini bevosita sanash. Hujayralarni hisoblash kamerasida sanash. Goryayev, Tom-Seys, Byuker va boshqalar kamerasida yirik mikrob hujayralarini- achitqilar, bir hujayrali suv o'tlari, sporalar, zamburug'lar, ayrim bakteriyalarni sanash mumkin. Goryayevning hisoblash kamerasi qalin buyum oynasi bo'lib, to'rtta chuqur chiziq bilan ko'ndalang joylashgan uchta maydonchaga bo'lingan. O'rtadagi maydoncha ko'ndalang chiziq bilan ikkiga bo'lingan. Har qaysi yarmi to'rsimon bo'lingan.

Yon tomondagi maydonchalar o'rtadagidan 0,1 mm balandroq (kamera chuqurligi) bo'lib, uning ustiga qoplagich oyna zich yopiladi.

Goryayev kamerasining to'ri 225 ta yirik kvadratga bo'lingan (15 ta qatorning har qatorida 15 tadan kvadrat bor). Yirik kvadratning maydoni  $1/25 \text{ mm}^2$  ga teng bo'lib, har qaysisining maydoni  $1/400 \text{ mm}^2$  bo'lgan 16 ta mayda kvadratga bo'lingan. Kameraning chuqurligi 0,1 mm ga teng.

Kichik (mayda) kvadratning hajmi  $1/4000 \text{ mm}^3$  yoki  $1/4000000 \text{ ml}$ , katta kvadratniki  $16/4000=1/250 \text{ mm}^3$  yoki  $1/250000 \text{ ml}$  ga teng. Katta kvadratlarning bir qismi vertikal, gorizontal bo'lingan yoki bo'linmagan bo'ladi.

Quyuq substratlardagi achitqilarni sanash uchun oldin ular suvga aralashtiriladi. Buning uchun o'lchov kolbasidagi 100 ml suvga hujayralar konsentratsiyasiga qarab, 2, 4 yoki 10 ml achitqi suspenziyasi qo'shiladi. Nobud bo'lgan achitqi hujayralarini bo'yash uchun Fink bo'yicha 20-30 ml metilen ko'ki ( $1:5000$  nisbatda olingan) yoki  $1:40$  konsentratsiyaligidan 1-2 ml qo'shiladi.

Non pishirish sanoati yarim fabrikatlar namunasini tayyorlashda G. M. Smirnova ishlab chiqqan usulga asoslanishi mumkin: bunda 1 g namunani hovonchada 3-5 ml spirt bilan ezib (spirt oz-ozdan qo'shiladi), keyin 100 ml hajmli kolbachaga solinadi va 40-50 ml ga yetguncha suv qo'shiladi; to'xtovsiz chayqatib turib 1 ml 30% li natriy gidroksid (yoki kaliy gidroksid) eritmasi qo'shiladi. Keyin kolbacha

10 minut  $70^\circ\text{C}$  issiq bo'lgan suv hammomiga botirib qo'yiladi.

Gidroliz tugagandan keyin belgigacha suv qo'shib, yaxshilab aralashtiriladi. Suspenziyadan 10 ml olib, probirkaga solinadi va 5 tomchi metilen ko'ki hamda 3-4 tomchi karbolli fuksin qo'shiladi. Achitqilar hujayrasi to'q binafsha rangga, bakteriyalar hujayrasi havo rangga bo'yaladi.

Kamera va maxsus silliqlangan qoplagich oynani yaxshilab yuvib quritiladi. Setkalar yuzasiga tayyorlangan to'plam aralashmasidan kichik tomchi tomizib, qoplagich oyna bilan yopiladi. Oyna tagidagi suyuqlik kataklar bo'ylab bir tekis tarqalishi, pufakchalar hosil bo'lmasligi kerak. Suyuqlikning hajmi kameraning hisoblanadigan hajmiga mos kelishi uchun to Nyuton halqalari deb ataladigan halqalar paydo bo'lguncha qoplagich oyna kameraning yon maydonchasiga ishqalanaveradi. Qoplagich oynani oldin ishqalab, keyin pipetkada kamerani mikroorganizmlar suspenziyasi bilan to'ldirish ham mumkin. Hujayralar cho'kishi va bir tekisda (bir sathda) ko'rinishi uchun kamera to'ldirilgandan 3-5 minutdan keyin hisoblash boshlanadi. Mikroorganizmlarning harakatchan shakllarini kataklarga tushirishdan oldin ularni isitib yoki suspenziyaga 0,5% formalin qo'shib nobud qilinadi.

Kamerani mikroskopning buyum stolchasiga joylashtirib qo'yib, oldin 8x, keyin 40x obyektivda ko'riladi. Katta kvadratning ichidagi hujayralar ham, chekka chizig'idagi, ammo ko'proq qismi muayyan kvadrat ichida bo'lgan hujayralar ham-hammasi hisobga olinadi. Yarmidan ko'pi boshqa kvadratda bo'lgan hujayralar hisobga olinmaydi. Agar hujayralar chegara chiziq bilan teng ikkiga kesilib turgan bo'lsa, kvadratning ikkita yonma-yon (bir-biriga yaqin) tomonidagi, masalan, pastki va chap tomonidagi hujayralar hisobga olinadi.

Har bir tomchida 10 ta katta kvadratdagi hujayralarni sanash tavsiya etiladi. 1 ml dagi hujayralar soni  $x = a \cdot 25104$  ga teng.

Juda quyuq suspenziyalarda hujayralarni sanash qiyin, shuning uchun ularni suv qo'shib suyultirish kerak; yaxshisi shunday suyultirish kerakki, bitta yirik kvadratdagi hujayralar soni 16 tadan oshmasin. 1 ml dagi hujayralarning sonini aniqlashda suyultirishni hisobga olish kerak.

Fiksirlab, keyin bo'yalgan mazoklardagi hujayralarni sanash (Vinogradskiy-Shulgina-Brid usuli). Bu usulning mohiyati shundan iboratki, ma'lum miqdordagi tekshirilayotgan suspenziyani bevosita

mikroskopda ko'rib, mikroorganizmlar hujayrasining miqdori (soni) hisoblanadi (sanaladi).

Preparat tayyorlash. Tekshiriladigan suspenziyadan aniq hajmda (odatda, 0,02 dan 0,05 ml gacha) olib, mikropipetkada yaxshilab yog'sizlantirilgan va quritilgan buyum oynasiga tomiziladi; bu buyum oynasi maydoni 6 yoki 4 sm<sup>2</sup> qilib chizilgan millimetr qog'ozga joylashtirilgan bo'ladi. Keyin suspenziya tomchisiga agar-agarining sterillangan 0,03% li suvli eritmasidan bir tomchi qo'shib, sterillangan biologik ilmoq bilan tez aralashtiriladi va qog'ozda belgilangan maydonga bir tekis taqsimlanadi. Mazokni havoda quritib, 96% li spirt bilan 20-30 minut fiksirlanadi va ma'lum vaqt davomida u yoki bu bo'yoq bilan bo'yaladi. Keyin preparat ehtiyotlik bilan kristallizatorda suvda yuviladi. Preparat suv tiniq bo'lguncha bir necha marta yuviladi. Tayyor bo'lgan preparat havoda quritiladi.

Mikroorganizmlar hujayrasi immersion obyektivda okulyarga o'rnatilgan okulyar to'ridagi kvadratlardan sanaladi.

Preparatni diagonal bo'yicha u yoq-bu yoqqa surib, to'rdagi 50-100 ta kvadratdagi (kamida 10 ko'rish maydonidagi) mikroorganizmlar hisobga olinadi. Okulyar setkasi bo'lmasa, mikroskopning butun ko'rish maydonidagi hujayralarni sanash mumkin. Amaliy maqsadga muvofiqlik nuqtai nazaridan qaralganda hisoblangan hujayralarning umumiy soni ( $\sum x$ ) 600-1000 birlikka teng bo'lganda maksimal aniqlikka erishiladi.

Olingan ma'lumotlarga asoslanib, setkaning kvadratidagi  $\bar{y}$  hujayralarning o'rtacha soni aniqlanadi  $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$ ; bu yerda  $n$ - setkadagi hujayralar soni sanalgan kvadratlar (ko'rish maydoni). Ishonchli intervalni aniqlashda variant uchun o'rta kvadratlilik o'zgarish ushbu formula bo'yicha hisoblanadi:

$$\check{\sigma}_x = \pm \frac{\sqrt{\sum x}}{n}$$

95% ga teng darajali ko'rsatkichda ( $P_{095}$ ) to'rning kvadratidagi (ko'rish maydonidagi) ehtimolga yaqin bo'lgan hujayralar soni ushbu formuladan foydalanib hisoblanadi:

$$\bar{x} \pm 2\check{\sigma}$$

$P_{099}$  da ishonchli interval  $\pm 2,7 \check{\sigma}$  ga muvofiqdir.

O'rganilayotgan substratning 1 g (1 ml) dagi hujayralarning ehtimolga eng yaqin sonini aniqlash uchun suyultirilganligini,

suspenziyaning hajmini, mazokdagi okulyar setkasi kvadrati maydonini (ko'rish maydonini) hisobga olish zarur.

Okulyar to'ri kvadratining maydoni (ko'rish maydoni) obyektiv mikrometr yordamida aniqlanadi . Obyekt-mikrometrni mikroskop stolchasiga preparat o'rniga qo'yib, hujayralar sanalgan kattalashtirishda to'r kvadratining tomoni (yoki ko'rish maydonining diametri) o'lchanadi. Kvadratning tomonini bilgandan keyin, uning maydoni-S aniqlanadi. Ko'rish maydoni  $S = \pi R^2$  formula bo'yicha hisoblab topiladi.

To'r kvadratidagi hujayralar sonini 1 g (1 ml) substratdagi mikroorganizmlar miqdoriga aylantirish uchun quyidagi formuladan foydalaniladi:

$$\frac{(x \pm 2\sigma_x) - 6 \cdot 10^8}{S \cdot 0,05} \cdot K$$

Bu yerda: S- to'r kvadratining maydoni (mkm<sup>2</sup>), 0,05-olingan suspenziyaning miqdori,  $6 \cdot 10^8$ -mazokning maydoni,  
K - suspenziyaning suyultirilganligi.