

**O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY TA’LIM, FAN VA
INNOVATSIYALAR VAZIRLIGI**

GULISTON DAVLAT UNIVERSITETI

BIOLOGIYA KAFEDRASI

**«MIKROBIOLOGIYA » FANIDAN LABORATORIYA
MASHG‘ULOTLARINI BAJARISH UCHUN METODIK QO‘LLANMA**



GULISTON-2023

Bazarova R.SH. Mikrobiologiya faninidan laboratoriya mashg'ulotlarni bajarish uchun uslubiy qo'llanma–Guliston, 2023– 60 bet.

Mazkur qo'llanma Guliston davlat universiteti tomonidan Mikrobiologiya fani 5320500 – Biotexnologiya (Oziq-ovqat, ozuqa, kimyo va qishloq xo'jaligi), yo'nalishlari uchun tasdiqlagan namunaviy o'quv dasturiga asosan tayyorlandi.

Metodik qo'llanma GulDU O'MKning 30.08.2023 sanadagi № 1 yig'ilishida ko'rib chiqilgan va chop etishga ruxsat berilgan.

Metodik qo'llanma 5320500 – Biotexnologiya (Oziq-ovqat, ozuqa, kimyo va qishloq xo'jaligi) yo'nalishi talabalari uchun mo'ljallangan.

Tuzuvchi: Bazarova R.SH.

Muharrir: Abdurasulova S.SH.

Taqrizchi: b.f.d., H.Q.Qo'shiyev

Uslubiy ko'rsatma Guliston davlat universiteti o'quv – metodik kengashi tomonidan nashrga tavsiya qilingan (1-bayonnoma, 30.08.2023 y).

Mundarija

1	Mikrobiologiya laboratoriyasida ishlash ning umumiy qoidalari. Mikroskopning tuzilishi va uni ishlatish tartib qoidalari. Mikroskop turlari	4
2	Achitqilarning morfologiyasini o'rganish. Achitqilar suspenziyasi tarkibida mavjud bo'lgan o'lik va kurtaklanayotgan hujayralarni o'rganish	8
3	Pasterilizatsiya va sterilizatsiya usullari	10
4	Mikroorganizmlar preparatini tayyorlash usullari.	15
5	Mikroorganizmlarni o'stirish	22
6	Mikrob hujayrasi sonini hisoblash usullari	28
7	Bakteriyalar morfologiyasini o'rganish	30
8	Bakteriyalarni gramm usulida bo'yash	38
9	Mog'or zamburug'lari morfologiyasini o'rganish	39
10	Oziq-ovqat mahsulotlarida achitqi va mog'or miqdorini aniqlash.	42
11	Achitqilarning morfologiyasini o'rganish	43
12	Oziq-ovqat mahsulotlarida ichak tayoqchalari guruhi bakteriyalarini aniqlash	45
13	Mezofil aerob va fakultativ anaerob mikroorganizmlar miqdorini aniqlash	46
14	Havo mikroflorasini tekshirish; mikrob hujayrasi sonini hisoblash usullarini o'rganish.	47
15	Suv mikroflorasini tekshirish.	49
16	Sut va sut mahsulotlari mikroflorasini o'rganish.	54
17	Go'shtning yangiligini bakterioskopik usulda aniqlash.	56
18	Bug'doy mikroflorasini aniqlash.	58

1 –LABORATORIYA MASHGULOTI

Mavzu: Mikrobiologiya laboratoriyasida ishlash ning umumiy qoidalari.
Mikroskopning tuzilishi va uni ishlatish tartib qoidalari. Mikroskop turlari.

Mikrobiologik tadqiqotlar maxsus jihozlangan mikrobiologik laboratoriyalarda olib boriladi. Ko‘pincha mikrobiologik tahlillar steril sharoitlarda o‘tkaziladi. Bunga sabab o‘rganilayotgan materialning boshqa muhitdagi begona mikroorganizmlar bilan zararlanmasligi, atrof–muhitni va tadqiqotchilarni muhofaza qilishdir.

Mikrobiologik laboratoriya tarkibiga tadqiqotlar xonasi, ozuqa muhitlari tayyorlash, reaktivlar tayyorlash, laboratoriyada ishlatiladigan idishlarni yuvish va sterilizatsiya qilish uchun maxsus xonalar kiradi. Sterillangan sharoitda bajariladigan ishlar uchun bitta xonada laboratoriya stollari, reaktivlar, idishlar va apparatura saqlash uchun maxsus shikaflar qo‘yilgan oynaband bokslar tashkil etiladi. Laboratoriyaning asosiy jihozlariga mikroskop, mikroorganizmni o‘stirish uchun termostat, avtoklav, sterilizatsiya qilish uchun asbob – anjomlar, sovutgich kiradi. Laboratoriya xonasi har kuni ehtiyoj uchun ozuqa muhitlari, bo‘yoqlar va boshqa laboratoriya anjomlari bilan ta‘minlanishi zarur.

Talabalarni mikrobiologik laboratoriyada ishlash qoidalari

Har bir talabaning laboratoriyada o‘z ish joyi bo‘lishi kerak. Ish joyi mashg‘ulot uchun mikroskop, uning yoritkichi, probirkalar uchun shtativlar, turli bo‘yoqlar, reaktivlar, suv, preparatlarni bo‘yash uchun vannalar, preparat tayyorlash uchun oyna, bakteriologik sirtmoq hamda dezinfeksiyalovchi eritma solingan idishlar bilan ta‘minlangan bo‘lishi shart.

Mikrobiologik laboratoriyada quydagilar ta‘qiqlanadi:

1. Laboratoriyaga ustki va bosh kiyim bilan kirish;
2. Laboratoriyada xalatsiz ishlash va u erda bo‘lish;
3. Ovqatlanish, chekish, stollarga begona predmetlar, portfel, sumkalar, bosh kiyimlarni qo‘yish;
4. Laboratoriyada ortiqcha harakatlanish, keskin harakat qilish va bu bilan o‘rganilayotgan materialni boshqa mikroblar bilan ifloslantirish.

Mikrobiologiya laboratoriyasiga qo‘yiladigan havfsizlik qoidalari va talablar:

1. Laboratoriyaga kirishda va ishlash davomida oq xalatda bo'lish shart.
2. Tozalik va tartib intizomga qat'iy rioya qilinishi shart.
3. O'qituvchi yoki laborantning ruxsatisiz elektr asbob, mikroskop va boshqa jixozlarni ishga tushirmaslik kerak.
4. Har bir talaba yoki xodim o'ziga biriktirilgan joyda ishlash, faqat shu stoldagi asbob va reaktivlardan foydalanish kerak.
5. Laboratoriyada ovqat eyish, chekish va keraksiz narsalarni olib kirish man etiladi.
6. Stol ustida faqat ishga kerakli narsalar bo'lishi kerak.
8. Spirt lampalarni bir-biridan yondirmasdan faqat gugurt orqali yondirish kerak.
9. Mikroskop bilan ishlash vaqtida, mikroskop vintlarini burab tashlamaslik va mikroskop bilan ishlash texnik qoidalariga rioya qilish shart.
10. Dars (ish) tugagandan so'ng ish joyini tartibga keltirish, hamda laboratoriyadan chiqib ketish oldidan qo'llarni sovunlab yuvish kerak.

Talabalarni laboratoriyada ishlash paytidagi vazifalari:

1. Navbatchi o'qituvchidan o'quv materialni qabul qiladi va talabaga tarqatadi.
2. Mashg'ulot paytida:
 - a) mikroskop va boshqa laboratoriya anjomlari bilan ehtiyot bo'lib ishlash.
 - b) mashg'ulot jarayonida uzatilayotgan ob'ekt haqida ma'lumotlarni uzluksiz yozib borish va albomga chizib borish.
 - v) probirkalar, Petri idishchalariga guruh raqami, ish joyi va sanalarni qayd qilish.
 - g) mashg'ulotlar tugagach esa pipetkalar, shpatellar va boshqa asboblarni dezinfeksiyalovchi eritmaga solib, zararsizlantirish. Sirtmoqlarni spirt alangasida kuydirib, zararsizlantirish.
 - d) o'quv mashg'ulotlari tugagach, ish joyini va mikroskoplarni o'z holiga keltirib qo'yish, mikroorganizmlar ekilgan probirka va Petri chashkalarini termostatga joylash uchun navbatchiga topshirish va o'qituvchiga topshirishlari zarur.

Eslatma

Hamma bakteriya va mikroorganizm preraratlari immersiya ob'ektivi orqli ko'riladi, albomga suratlari chiziladi, tagiga nomi yoziladi. Ish mikroskopini to'g'ri va ohistalik bilan shkafga joylashtirish va o'z ish joyini tartibga solish bilan tugallanadi. Bu qoidalarga mikrobiologiya darslarida doimo amal qilinadi.

Kerakli jihoz va materiallar: Biologik mikroskoplarning turli modellari, imersion ion, tayyor bo'lgan mikrobiologik preparatlar.

Ishga uslubiy ko'rsatma: Mikroskop (grekcha- kichik ko'rish, ya'ni narsalarni ko'rish degan so'zdan olingan)- optik asbob bo'lib, 0,2- 0,3 mkm li kichik ob'ektlarni 56-1800 va 3000 marta kattalashtirib ko'rsatish xususiyatiga ega Mikroorganizmlar turli xil morfologik xususiyatlarga ega ekanligini nazarda tutib, ularni o'rganishda turli xil mikroskoplar, uslublardan ya'ni biologik, lyuminiscent

elektron protonli va maxsus faza–kontratsli kabilardan foydalaniladi. Mikroskop asosan ikki qismdan tashqil topgan: 1.optik. 2. mexanik.

1. Mexanik qism-mikroskopning asosi va trubasini tutib turuvchi yoysimon tutgich, predmet stolchasi va o‘tib turuvchi asosidan tuzilgan. Tubis tutgichi makro va mikro vintlar yordamida yuqoriga ko‘tarish yo‘li bilan ko‘rilayotgan ob‘ektni tiniqligini ta‘minlaydi.

2. Mikroskopning optik qismi okulyar, ob‘ektiv va yoritish qurilmasidan tashqil topgan. Okulyar tubisning yuqori qisimida joylashgan, uning kattalashtirish imkoniyati sonlar bilan belgilangan (7x, 10x,15x, 20x).

Okulyar yuqori optik va pastki yig‘uvchchi linzalardan iborat. Ob‘ektiv mikroskopning asosiy va engi muhim qismi bo‘lib, uning optik quvvatini belgilaydi. Ob‘ektning kattalashtirishga va qo‘llanishiga qarab ko‘rik holda va emirsion moy yordamida quvvatlanish mumkin.

Quruq ob‘ektivlar nisbatan katta fokus oralig‘iga ega bo‘lib (8x, 10x) asosan uncha kattalashtirishni talab qilmaydigan (400-600 marta) yirik biologik hujayralarni ko‘rish uchun foydalaniladi.

Bundan ob‘ektiv va prepatat oralig‘ida havo qatlami bo‘ladi. Preparat oynasi havoning yorug‘lik nurlarini sindirish ko‘rsatmalari turlicha bo‘lganligi uchun, nurlarning bir qismi atrofga taralib kuzatuvchining ko‘ziga etib bormaydi. SHuning uchun mikroorganizmlar o‘rganishda asosan imirsion ob‘ektivlardan (85x, P= 33) foydalaniladi. Ular suv yordamida 900-1500 martagacha ob‘ektni kattalashtira oladi.

Preparatni yorituvchi nurlardan to‘la foydalanish va uning qaytarilishini, preparat oynasi va qoplovchi oynasi orasida sinishini preparat va ob‘ektiv frontal linza orasidagi sinishini oldini olish uchun ob‘ektiv va preparat orasiga immersion moy tomiziladi. Uning yorug‘likni sindirish ko‘rstkichi (P=1,515) shishaning ko‘rsatkichiga (P=1,52) yaqin. Havoning yorug‘ligni sindirish ko‘rsatkichi P=1 ga teng . Shuning uchun yorug‘lik nurlarini bir qismi kuzatuvchining ko‘ziga etib bormaydi suyuqlik tomchisi preparatga tizilib, unga ob‘ektni tushiriladi. Kattalashtirish darajasi yuqori bo‘lgan ob‘ektni Foks masofasi 1,9- 2,1 mm uni tomchidan linza va preparat orasida bir xil optik muhit hosil mikoniyatini beradi. Bu esa o‘z navbatida ob‘ektivdan kelgan nurlarni kuchaytiradi. Biolam tipidagi mikroskoplar 7,10,15,20 marta kattalashtiradigan okulyar bilan jihozlangan bo‘lib, ob‘ektni 1800 martagacha kattalashtira oladi.

Yig‘uvchi linza yoki kondensor bir necha linzalardan iborat bo‘lib preparatni yaxshilab yoritish imkoniyatini beradi. U oynasidan tushadigan nurni predmet yuzasiga o‘tkazadi. Kondensorni vint yordamida yuqoriga va pastga harakatlantirish mumkin. Bo‘yalgan mikroorganizmlarni kondensorni yuqoriga ko‘tarilgan holda kuzatiladi. Bunda nazorat maydoni kengayadi va muhit bilan mikroorganizmlarni yorug‘likni turlicha sindirish hisobiga mikroblarning ko‘rinishi tiniqlashadi.

Iris–kondensor tagiga joylashtirilgan diafragma bo‘lib, u kondensatorga tushayotgan yorug‘likni kerakli miqdorda o‘zgarishini ta‘minlaydi. Iris bir necha

po'lat katakchalardan iborat va bu katakchalar yordamida u yoki bu tarafga surishi mumkin. Natijada tirqishni toraytirish yoki kengaytirish imkoni tug'iladi.

Biokulyar - 2 okulyarli va ob'ektivli mikroskop bo'lib ikki ko'z bilan ob'ektni kuzatish va uni aniq ko'rish imkonini beradi.

Faza kontrast mikroskop-preparatlarining kontrastirni sun'iy ravishda kuchaytirish imkonini beradi. Bu esa bo'yalmagan mikroorganizmlarni hujayralarini yaxshiroq o'rganish imkonini beradi.

Lyuminiscent mikroskop-to'lqin uzunligi 300-400 nm ultrabinafsha yoki qisqa to'lqinli havo rang nurlari (460 nm) mikroorganizmlarga tushirilganda ulardan chiqadigan yorug'liklar (flyuresensiya) hodisasi foydalanishga asoslangan.

Elektron mikroskop-biologik ob'ektlarni 500000 marta va undan ham kattaroq ko'rsatish qobiliyatiga ega. Bu usul bilan mikrobiologiyada viruslarni va mikroblar hujayralarini eng noziq strukturlarini o'rganiladi. Elektron mikroskoplarda oq yorug'lik o'rniga elektronlar oqimidan foydalaniladi.

Mikroskopdan foydalanish qoidalari: Mikroskop bilan ishlashning asosiy qoidalaridan biri uni to'g'ri o'rnatish, nazorat maydonchasini va preparatni to'g'ri yoritishdan iboratdir. Yoritish uchun tabiiy yorug'likdan yoki OI-19,7,32 kabi maxsus yoritgichlardan foydalanish mumkin.

Maksimal yoritish uchun revolvorni eng kichik ob'ektivga etkazib uni kuzatilayotgan ob'ekt bilan oralig'ini 1,5-2 sm qo'yiladi.

Okulyarga qarab oynacha orqali yorug'lik nurlari tutilgach diafragma kondensator orqali ob'ektivga yo'naltiriladi va kuzatish maydonchasi bir xilda yoritilishiga erishiladi. Mikroskopni ish oxirigacha joyidan jildirilmasligi kerak. Bo'lmagan ob'ektlarni ko'rishda nazorat maydoni diafragmani toraytirish yoki kondensatorni pastga tushirish yo'li bilan qoraytirib preparat yuzasiga fosk to'g'rilanadi. Mikroskopga imersion ob'ektlar bilan ishlaydi quydagicha amalga oshiriladi.

- Tayyor preparatga yoki ob'ektga bir tomchi imersion moyi tomizilib preparat predmet stoliga o'rnatiladi.

- Revolvorni aylantirib ob'ektni (90 x) ehtiyotkorlik bilan o'rnatib, tubs asta sekin ob'ektiv immersion moyga tekunicha tushiriladi.

-Ehtiyotkorlik bilan qoplagich oynani sindirmay mikrometrik vint bilan taxminiy fosk o'rnatiladi.

- Oxirgi aniq foskni mikrovint orqali bir martadan ortiq buramasdan to'g'irlanadi.

Tuzatish ishlari tugamay, predmet oynasini mikroskopdan olib tubs tagiga kichik ob'ektni qo'yib ob'ektivdagi immersion moyini benzin yoki spirt bilan ho'llangan yumshoq latta bilan artib mikroskopni qobiq ostiga joylashtiriladi.

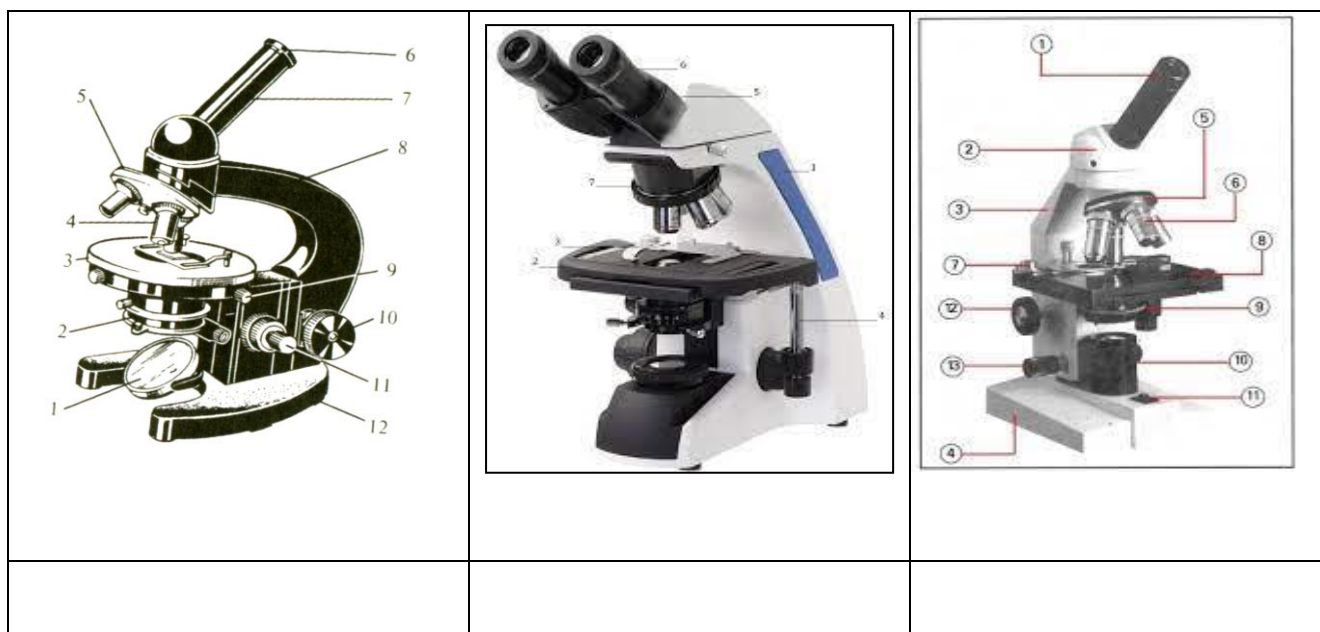
Ishning bajarilish tartibi: Mikroskopni talaba o'ziga nisbatan perpendikulyar holda qo'yadi. Ko'zguan va kondensorning iris diafragmasidan foydalanib, kunduzgi yorug'likda yoki mahsus yoritgichlar, masalan, OI-19 dan foydalanib yorug'lik topiladi. Preparatga bir tomchi immersion moyi tomiziladi va mikroskopning buyum stolchasiga joylashtiriladi. Mikroskop revolveridagi 90x ob'ektiv

(immersiya obektivi) preparatni ko'rishga moslanadi, yon tomonidan kuzatilgan holda obektiv linzasi moyga botiriladi. Okulyarga qaragan holda makrovint yordamida obektiv topiladi. Aniq ko'rinishga erishish uchun mikrovintdan foydalaniladi. Mikrovintdan juda ehtiyotlik bilan foydalaniladi-soat milli yo'nalishida yoki aksincha, faqat 1-2,5 aylanishdan ortiq buralmaydi. Preparatni yoritilishini kondensorni vertikal yo'nalishda harakatga keltirib, kamaytiriladi yoki ko'paytiriladi. Bo'yalgan preparatlarni kuzatganda kondensor taqalguncha yuqoriga ko'tariladi.

Mikrobiologiyadan laboratoriya mashg'ulotlar uchun tutilgan maxsus albomga ko'rish maydoniga o'hshash, 3-4sm lik doira chiziladi. Unga o'rganilayotgan bakteriya hujayralarining rasmi chiziladi, o'lchamlari va shakllariga alohida ahamiyat beriladi, kerakli yozuvlar yoziladi.

Ish tugagandan so'ng ob'ektivdagi moy tozalanadi, (toluol shimdirilgan paxta bilan artiladi) revolverdagi kichik ob'ektiv fiksirlanadi, tubus va kondensor tushiriladi hamda mikroskop va boshqa o'quv qurollari maxsus joyga qo'yiladi, ish joyi tartibga keltiriladi.

1-topshiriq. Mikroskopning nomini yozing va jadvalni to'ldiring



Ishning borishi:

Petri likopchasidagi quyuq oziqa muxitiga achitqi sporasi shtrix usulda ekiladi. 5-8 kun davomida har 8-10 soatda ko'z bilan chamalab kuzatib boriladi. chamalab kuzatib boriladi. Har gal kuzatilganda: koloniyaning o'lchami (yirik-maydaligi), shakli, zich yoki siyrakligi, tashqi chetining tuzilishi, o'rtasining tuzilishi, yuzasi, koloniyalarning, substratning va koloniya tubining rangi, tomchi suyuqlik ajralishi aniqlanadi.

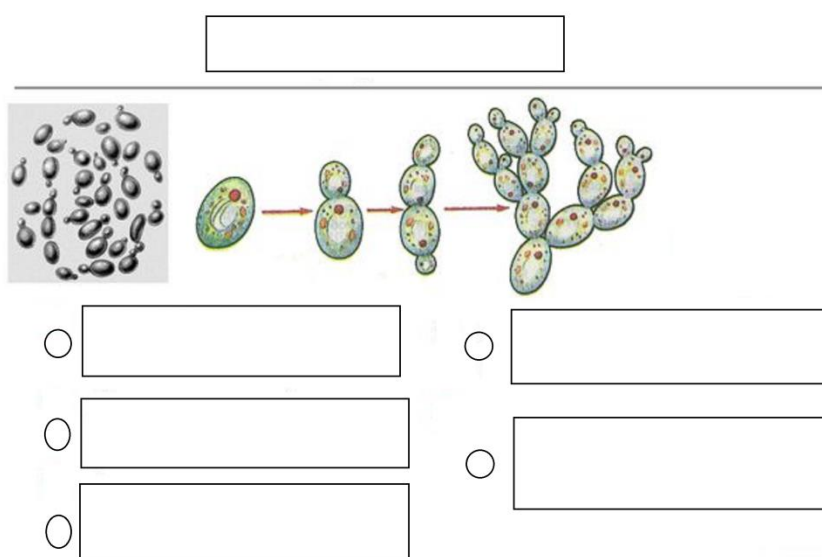
Shundan keyin achitqilar mikroskopda o'rganiladi. Bunda stereoskopik yoki oddiy mikroskopda o'rganish va koloniyalarni bevosita Petri likopchasining o'zidan ko'rish mumkin. Mikroskopda 80-200 marta kattalashtirib qarab, vegetativ ko'payish organlari, ya'ni kurtaklari borligi, ularning hosil bo'lishi xarakteri va joylashuvi aniqlanadi.

Mikroskopda ko'riladigan preparatlar qizdirib, so'ngra sovutilgan ikkita preparat oval ignada tayyorlanadi. Ignalarda mitseliyni meva hosil qiluvchi gifalari va yupqa oziqa muhiti bilan birga kichik bo'lakcha shaklida olib, yaxshilab yog'sizlantirilgan buyum oynasidagi 1:1 nisbatda olingan bir tomchi glitserin va etanol aralashmasiga qo'yiladi. Ehtiyotlik bilan, ustiga qoplagich oyna yopiladi va sekin bosiladi. Preparat dastlab 8x yoki 10x, keyin 40x ob'ektivda qaraladi. Achitqilar tirikligida har xil buyoqlar bilan bo'yaladi, biroq ularning konsentratsiyasi 0,5-1 foizdan oshmasligi kerak. Achitqilar hujayrasini kimyoviy o'rganish, hujayralari strukturasi, turli qo'shilmalarni aniqlash, yosh xususiyatlarini aniqlash, yadrolarni topishda achitqilarni o'rganishdagi usullar qo'llanadi.

O'rganilayotgan achitqilarning avlodini va turini aniqlash uchun N.M.Pidoplichkoning "Грибы-паразиты культурных растений" (I va II tomi, Киев: Наукова думка, 1977), «Определитель грибов Украины» (1-5 t., Киев: Наукова думка, 1972), « Определитель низших растений» (Л.И.Курсанов taxriri ostida, М., Наука, 1954, 1956) aniqlagichlaridan foydalaniladi.

Nazorat savollari

1. Achitqilarning umumiy tavsifi va achitqi hujayrasining tuzilishi.
2. Pag'a-pag'asimon achitqilar va chansimonlarining farqini ko'rsating.
3. Achitqilarning ko'payish usullari qanday?
4. Qaysi achitqilar oqsil-karotinoidli preparatlar olishda qo'llaniladi?
1-topshiriq: rasmni nomlang va unga xos xususiyatlarni yozing.



3 –LABORATORIYA MASHGULOTI

Mavzu : Pasterizatsiya va sterilizatsiyalash usullari

Mashg'ulot o'tkazishdan maqsad. Sterilizatsiyalash va pasterizatsiyalash usullarini o'rganib, tayyorlangan oziq muhitini, idishlarni va boshqa narsalarni avtoklavlarda sterilizatsiyalash; sutni pasterizatsiyalash. Avtoklav, Kox apparati, Paster javoni, Zeyts filtrini tuzilishi va prinsipini bilish.

2.1. Pasterizatsiyalash usullari. Pasterizatsiyalashni yoki chala sterilizatsiyalashni Lui Paster taklif etgan. Bu usul oziq-ovqat sanoatida keng qo'llanadi. Pasterizatsiyalashda asosan kasal keltiruvchi - patogen mikroorganizmlar va vegetativ hujayralar haloq bo'lib, ozuq muhitlarni, oziq-ovqatlarni va boshqa mahsulotlarni sifati saqlanib qoladi. Pasterizatsiyalashning 2 turi mavjud: uzoq muddatli va qisqa muddatli.

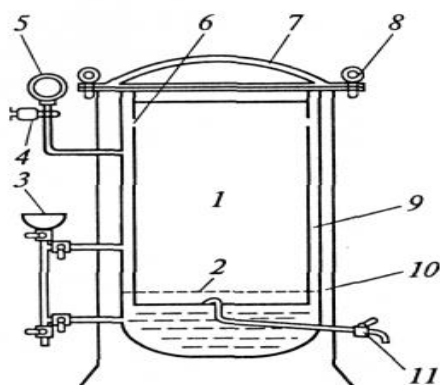
Uzoq muddatli pasterizatsiyalashda mahsulot 60-70 °S haroratda 15-20 min davomida qizdiriladi.

Qisqa muddatli yoki darhol - bir onda pasterizatsiyalash oziq-ovqatlar ishlab chiqarishda keng joriy etilgan (masalan: sut, turli sharbatlar ishlab chiqarishda). Mahsulot 90-100 °S da bir necha sekunddan boshlab 1-3 minutgacha qizdiriladi. Pasterizatsiyalashda issiqqa chidamli mikroorganizmlarning vegetativ shakllari va sporalar tirik qoladi. SHu sababli pasterizatsiyalangan mahsulotlarni uzoq vaqt saqlab bo'lmaydi.

Ultrasterilizatsiyalashni sutni zararsizlantirish uchun qo'llaniladi. Mahsulot 150 °S da 1 sekund qizdiriladi. Bunda vitamin S-ni parchalaydigan oksidlovchi jarayonlar to'xtaydi va sutning sifati uzoq vaqt saqlanadi.

2.1. Sterilizatsiyalash usullari. Sterilizatsiya-hamma mikroorganizmlarni va ularning sporalarini to'liq yo'qotishdir. Sterilis - naslsizlik. Sterilizatsiyalash usullari bir nechta bo'lib, ob'ektning xususiyatiga qarab va maqsadga kerakli usul tanlanadi.

To'yingan par yordamida bosim ta'sirida sterilizatsiyalash avtoklavlarda olib boriladi (3-rasm). Avtoklav qopqog'i germetik yopiladigan ikki devorli metall qozondir. Uning suv-par kamerasiga voronka orqali yuqori belgisigacha (3) suv quyib, kran yopiladi. Sterilizatsiya qilinadigan ozuqa muhitlari, idishlar va boshqa



3-Расм. Автоклавнинг схематик тuzилиши

materiallar avtoklav ichiga - kamerasiga (1) maxsus g'ovakli barkash (2) ustiga qo'yiladi va qopqog'i (7) mahkam yopiladi. Avtoklavga ikkita manometr o'rnatilgan (5), biri kameradagi bosimni ko'rsatadi, ikkinchisi devorlar orasidagisini. Avtoklav gaz yoki elektr bilan qizdiriladi. Suv qaynaganda hosil bo'lgan par ichki devorning yuqori qismida joylashgan teshikdan (6) qozon ichiga kiradi va havoni suv tushiradigan klapanidan (11) chiqara boshlaydi. Havoni to'la siqilib sterilizatsiyalash kamerasidan chiqib ketgandan so'ng kuchli par oqimi chiqara boshlaydi. SHunda suv tushiriladigan kran (11) yopiladi, avtoklavda sekin-asta bosim ko'tarila

boshlaydi. Manometrlar 1atm. bosimni ko'rsatganda parning haroratsi 120-121 °S ga ko'tariladi. SHu daqiqadan boshlab sterilizatsiyalash vaqti belgilanadi.

Ko'pincha sterilizatsiyalash vaqti 20 min. Agar ozuqa muhitlarning hajmi 1 litrdan ortiq bo'lsa yoki tarkibida tuproq, qum bo'lsa sterilizatsiyalash vaqti 40 minutga boradi. Manometr strelkasi kerakli bosimdan o'tib ketsa, ortiqcha hosil bo'lgan par, saqllovchi klapandan (4) chiqib turadi.

Agar saqllovchi klapandan par xushtak bilan chiqa boshlasa, avtoklavni darxol o'chirish lozim. Sterilizatsiyalash vaqti tugagach, qizdirish to'xtatiladi va manometrni strelkasi nolga tushgandagina suv tushiriladigan kran (11) ochiladi. Agar kran oldinroq ochib yuborilsa, idishlardagi ozuq muhitlari qattiq qaynab, ko'tarilib tiqinlarni ho'l qiladi yoki tiqinlar otilib chiqib ketib, idishlardagi suyuqlik to'kilishi mumkin.

2-jadval

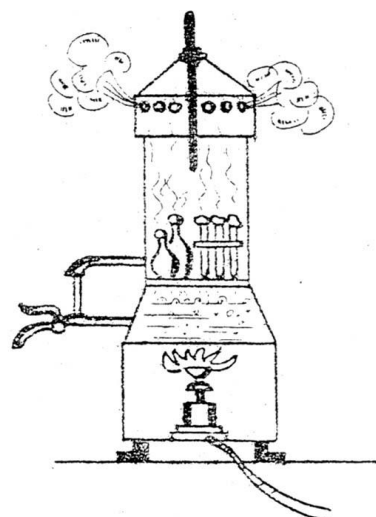
Sterilizatsiya apparatining ko'rsatkich talablari

Manometrning ko'rsatishi MPa	To'yingan parning haroratsi °S	Manometrning ko'rsatishi MPa	To'yingan parning haroratsi °S
0,00	100	0,15	128
0,05	112	0,20	134
0,10	121	0,30	144

Vaqtdan oldin qopg'og'ni ochishga ruhsat etilmaydi, chunki chiqa boshlagan par oqimi terini kuydirishi mumkin.

Oquvchan par yordamida Kox apparatida sterilizatsiyalash. Kox apparati metallardan yasalgan silindirdir. Uning tashqi tarafi issiqlikni izolyasiya qiladigan material (asbest, linoleum) bilan qoplangan (4- va 5-rasm).

Silindrning tagligigacha suv quyiladi. Sterilizatsiya qilinadigan materiallarni hamma devorlari teshikchali g'ovaklardan tuzilgan, Kox apparatining tagligi ustiga qo'yiladi. Silindrning qopqog'i konus shak-lida bo'lib, unda par chiqib turishi uchun teshikchalar qilingan. Energiya manbaasi - gaz yoki elektr bo'lishi mumkin. Kox apparatidagi harorat 100 °S dan oshmaydi.



4-расм. Кох аппарати
(оқувчан парли)

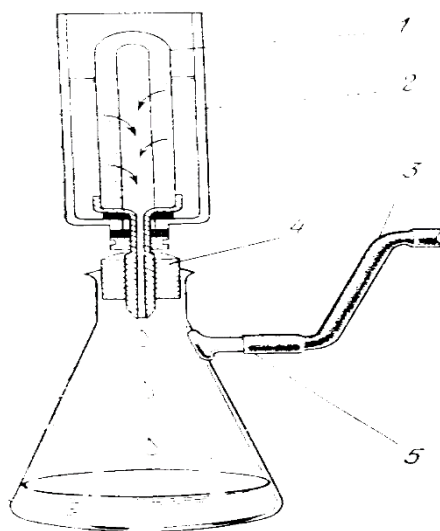
Oquvchan par bilan harorat 100°S dan oshganda tarkibi o'zgaradigan ozuqa muhitlarini (masalan qantli muhitlarni) sterilizatsiya qilinadi. Bu usulda sterilizatsiyalash 3 kun davomida ketma-ket 30 minutdan 100°S da qizdiriladi. Birinchi kun 30 min qaynatganda mikroblarning hamma vegetativ hujayralari o'lib, sporalar esa saqlanib qoladi. Ertasiga ko'pchilik sporalar o'sib vegetativ hujayralarga aylanadi, yana 30 min sterilizatsiya qilinganda ular o'ladi. Tirik qolgan sporalar yana o'sib vegetativ hujayraga aylanadi. Uchinchi kuni qaynatganda ular ham o'ladi. Suyuqlik hajmiga qarab qizdirish vaqtini 45-60 minutgacha ko'paytirish mumkin.

Quruq issiqlik bilan Paster pechkasida sterilizatsiyalash. Paster pechi ikki devorli shkaf bo'lib, tashqi devori asbest yoki boshqa issiqqa chidamli, issiqlikni izolyasiya qiladigan boshqa material bilan qoplangan (4-rasm). Elektroenergiya yordamida shkaf qizdiriladi. Sterilizatsiyalash 140°S dan yuqori haroratda olib boriladi. Bu usulda $160-170^{\circ}\text{S}$ da 1,5 - 2 soat davomida shisha idishlar, paxta, qog'oz, qum va boshqa materiallar sterilizatsiyalanadi. Sterilizatsiya qilinadigan idishlarni tozalab yuvib, qurutib, qog'ozga o'raladi. Probirka, kolba, pipetkalar paxta tiqinlar bilan berkitiladi.

Filtrlab sterilizatsiyalash (sovuq sterilizatsiyalash).

Ozgina qizdirishga ham bardosh bermaydigan suyuq ozuqa muhitlarini maxsus mayda g'ovakli (porali) bakterial filtrlar yordamida sterilizatsiya qilinadi. Bakterial filtrlar yuzasida mexanik aralashmalar bilan birga mikroorganizmlar ham ushlanib qoladi.

Faqat viruslar va faglar undan o'tib ketadi. Filtrlash yo'li bilan tarkibida oqsillar, antibiotiklar, vitaminlar va uchuvchan moddalari bor ozuqa muhitlarni sterilizatsiya qilinadi. Bunda muhit tarkibi va xususiyatlari o'zgarmay saqlanadi. G'ovak filtrlardan SHamberlan, Berkefeld shamlari (4-rasm), Zeytsning asbest filtrlari (5-rasm) va nitrotsellyulozadan yasalgan membrana filtrlari qo'llanadi. Filtrlashni yuqori bosimda yoki filtr tagidagi bo'shliqqa vakuum yaratib olib boriladi.



6-расм. Керамика шамлари

оркали фильтрлаш:

1 - шам; 2 - шиша идиш;

Filtrlar ishlatilish oldidan sterilizatsiya qilingan bo'ladi. Filtrlangan suyuqlikni sterillik qoidalariga rioya qilib, oddiy sterillangan kolbaga quyib, tiqinini berkitib, qog'oz bilan o'rab qo'yiladi.

Qaynatib sterilizatsiyalashni maxsus ichiga distillangan suv va 1 foizlii natriy gidrokarbonati qo'shilgan sterilizatorlarda olib boriladi. Distillangan suv birlamcha, qaynatilgan suv quyish mumkin. Sterilizator tagiga tekislab paxta yoki marlini yoyib, ustiga shprits, nina, pinset, qaychi, skalpel va boshqa narsalar solinadi va 10 minutdan 40 minutgacha qaynatiladi (ifloslangan darajasiga qarab).

Bu sterilizatsiyalashni turmush sharoitida sanatoriya, dam olish uylarida, kasalxonalarda, turli transport vositalarida ham qo'llaniladi.

Olovda cho'g' qilib qizdirib sterilizatsiyalash yoki flambirovanie qilish. Bu usul mikrobiologik nina ushlovchini, Paster pipetkalarini, pinsetlarni va boshqa olovda buzilmaydigan predmetlarni sterilizatsiyalash uchun qo'llaniladi.

SHisha idishlarni sterilizatsiyalash. Idishlarni sterilizatsiyalashdan oldin tozalab yuvib quritiladi. Probirka va kolbalar paxta tiqinlar bilan yopiladi. Probirkalarni 10, 20, 30, 40 donadan qog'ozga o'raladi. Kolbalarning tiqinlari ustidan yana qog'oz bilan o'rab, ip bilan bog'lab qo'yish kerak. Pipetkalarining og'izga soladigan tomoniga paxta tamponlar tiqiladi. Pipetkalarini uzun eni 4-5 sm li qog'ozlarga o'raladi va qopqoqli karton yoki metalldan yasalgan penallarga solinadi. Agar penallar bo'lmasa, qalin qog'ozdan penallar yasash mumkin. Sterilizatsiya qilingan pipetkalarini faqat tamponli tomonidan ushlab mumkin. Petri likobchalarini har birini alohida yoki 2-3 donadan qog'ozga o'rash kerak.

Tayyorlangan idishlarni quritish shkafining reshetkalariga yoki avto-klavga solganda juda zich joylamaslik kerak, chunki quruq havo va quruq to'yingan par bir tekisda idishlarni qizdirishi kerak. Quritish shkafi zich, mahkam yopilishi kerak. Agar quritish shkafida haroratni birdek saqlay-digan moslamasi bo'lmasa, sterillashda doim haroratga qarab turish kerak. Haroratni 175 °S dan oshirmaslik lozim, chunki qog'oz va tiqinlar buziladi. Idishlar yorilib ketmasligi uchun sterilizatsiya tugagandan keyin shkaf 100-70 °S gacha sovushi kerak, shundagina idishlarni chiqarib olish mumkin. Steril idishlarni o'ragan qog'ozlarni bevosita ishlash oldidan ochish kerak, aksida sterillik buzilishi mumkin.

Asbob va uskunalarni sterilizatsiyalash. Mayda metall asboblarni (ilmoq, igna, pinset, qaychilarni) sterilizatsiyalash uchun ishlatishdan oldin olovda qizdirib olinadi. Olovda qisqa muddatda kolba va probirkalarining og'zini hamda kulturalarni ekishda, ozuqa moddali muhitlarni quyishda paxta tiqinlar ham qizdiriladi.

Mikroorganizmlar o'stiriladigan uskunalarni, ularning qismlarini, rezina tiqinlarni, ulaydigan shlangalarni dastlab qalin qog'ozga o'rab, avtoklavda sterilizatsiya qilinadi.

Issiqqa bardoshli bo'lmagan plastmassadan yasalgan toza sentrifuga probirkalarini ultrabinafsha nurlar yordamida sterilizatsiya qilinadi.

Nazorat savollari

1. Sterilizatsiya nima?
2. Sterilizatsiya qilishning qanday usullari mavjud?
3. Laboratoriya idishlari qanday sharoitda sterilizatsiya qilinadi?
4. Pasterizatsiya nima? Pasterizatsiyaning qanday usullari bor?

1-topshiriq. Laboratoriyadagi idishlarni quritish shkafida sterillash shartlarini yozing.

2--topshiriq. Gaz bilan sterillash qanday sterillash turiga kirishini izohlang va qaealarda qo'llaniladi.

4 –LABORATORIYA MASHGULOTI

Mavzu: Mikroorganizmlar preparatini tayyorlash usullari.

Buyum va qoplagich oynalarni tayyorlash. Preparatlar buyum oynasida tayyorlanadi va ustidan qoplagich oyna bilan yopiladi. Buyum oyna - bu qalinligi 1,2-1,4 mm dan oshmaydigan chetlari yaxshi silliqlangan yupqa plastinkalaridir (76x26 mm). Qalinroq oynalar tasvir aniqligiga salbiy ta'sir ko'rsatadi. Bu esa immersion ob'ektiv bilan ishlashni qiyinlashtiradi. Qoplagich oynalarning o'lchamlari ularning qalinligi 0,15-0,17 mm bo'lsa, 18x18, 20x20, 18x24 mm va boshqacharoq bo'lishi mumkin. Katta qalinlikdagi qoplagich oynalar ham tasvir sifatini pasaytiradi.

Buyum va qoplagich oynalar toza hamda yog'siz bo'lishi kerak. Oynaning tozaligini tekshirish uchun uning sirtiga suv tomiziladi. Agar oynaning sirti yog'siz bo'lsa, suv tomchilari sekin quriydigan qavariq pufakchalar hosil qilgan holda bir joyga to'planmasdan bir tekis yoyilib ketadi. Ishlatilgan oynalar 1-2 soat mobaynida xromli aralashmaga (1 litr suv + 50 gr kaliy dixromat + 100 gr texnik oltinugurt kislotasi) solib qo'yiladi. SHundan keyin ular iliq suv va spirt bilan chayiladi. Kundalik ishlarda buyum oynasi sirtidagi yog'larni ketkazish uchun u avval sovun bo'lagi bilan ishqalanadi va shundan keyin toza paxta ipli salfetka bilan artiladi.

Toza buyum oynalari quruq holatda yoki 96 foizli spirt to'ldirilgan zich tiqimli bankalarda saqlanadi. Oynalarni pinset bilan olish lozim. CHunki barmoqlar ularning sirtida yog'li dog'lar qoldiradi. Oynalarni ishlatishdan oldin havoda quritish yoki filtr qog'oz, toza mato bilan artish kerak. Qoplagich oynalar ham yaxshi yuvilgan, quritilgan bo'lishi hamda maxsus qutilar va Petri likopchalarida saqlanishi lozim.

Tadqiqot uchun kulturalarni ajratib olish. Laboratoriya sharoitida mikroorganizmlar qattiq va suyuq ozuq muhitlarda probirkalar, kolbalar, Petri likobchalarida o'stiriladi. Suyuq muhitdan hujayralarni ajratib olish uchun sterillangan bakteriologik ilmoq yoki pipetkalaridan foydalaniladi. Qattiq muhitda o'sgan mikroorganizmlar ilmoq yoki preparoval ninalar yordamida olinadi.

Kulturalarni olishda ularning yot mikroorganizmlar bilan ifloslanishini oldini olish uchun quyidagi qoidalarga rioya qilishi lozim:

1. Spirtovka yoki gaz gorelkasi yoqiladi.
2. Suyuq muhitda o'stirilgan kulturalar mavjud probirka kaftlar orasida sekin aylantiriladi, keyin chap qo'lga, bosh va ko'rsatkich barmoqlar orasida qiya holatda ushlanadi. Agar to'plam qattiq muhitda o'sgan bo'lsa, mikroorganizmlar kulturasi yuzasi yuqoriga qaratilgan bo'lishi va yaxshi ko'rinib turishi kerak.
3. Ilmoq vertikal holda garelka alangasiga tutib turiladi va sim qizarguncha qizdiriladi, shundan keyin tutqichning unga tutash qismi ham kuydiriladi.
4. O'ng qo'lning jimjilog'i nomsiz barmog'i bilan paxtali tiqinning tashqi qismi kaftga bosiladi, probirkadan sug'urib olinadi va boshqa narsalarga tegdirmasdan tutib turiladi.
5. Ochilgan probirkaning chetlari gorelka alangasida kuydiriladi.
6. Sterillangan ilmoq ehtiyotkorlik bilan kultura bor probirkaga kiritiladi. Qattiq muhitdagi hujayralarni shikastlamaslik uchun ilmoq probirkaning ichki sirtiga yoki mikroorganizmlar bo'lmagan ozuq muhitiga tegizib sovutiladi. Engil silliq xarakat bilan ozgina mikrob massasi yoki hujayrali suyuqlik tomchisi olinadi. Ilmoqni probirkadan chiqarayotganda olingan material probirkaning devorlari yoki chetlariga tegib ketmasligiga e'tibor qilish kerak.
7. Yana probirkaning chetlari, keyin paxtali tiqinning ichki uchi, gorelka alangasida kuydiriladi va probirka yopiladi. Agar paxtali tiqin yona boshlasa, uni puflab o'chirishga harakat qilish yoki tashlab yuborish kerak emas. Balki uni zudlik bilan probirkaga tiqish va cho'g'langan joyini barmoq bilan bosib o'chirish lozim.
8. Kultura mavjud probirka shtativga qo'yiladi, olingan material esa preparat tayyorlash uchun ishlatiladi.
9. Ilmoqda qolgan mikroorganizm hujayralari gorelka alangasida kuydirib tashlanadi.

Petri likobchasida qattiq muhitda o'sgan mikroorganizm kulturalari ham xuddi shu ketma-ketlikda ajratib olinadi: gorelka yoqiladi, ilmoq(igna) sterillanadi, shundan keyin chap qo'lning bosh va ko'rsatkich barmoqlari yordamida Petri likobchasining qopqog'i qiya ochiladi. Sterillangan ilmoq likobcha qopqog'i ostiga kiritiladi va mikroorganizm koloniyalaridan xoli muhitga tegiziladi. Qizigan ilmoq muhitning "erib" ketishiga olib keladi. YUzadan uncha ko'p bo'lmagan miqdorda mikrob hujayralari olinadi hamda shundan keyin likopchaning qopqog'i zudlik bilan berkitiladi. Ilmoq yordamida olingan material preparat tayyorlash yoki ekish uchun ishlatiladi. Ilmoq (igna) ni qizdirish orqali unda qolgan hujayralar yo'q qilinadi. Xo'l ilmoqni qizdirish vaqtida mayda suyuqlik tomchilari va ular bilan birga mikrob hujayralari ham aerosol hosil qilgan holda atrofga sachrash mumkin. SHuning uchun ilmoq simning halqaga tutashgan joyidan boshlab qizdiriladi. Ilmoqda qolgan hujayralar quriydi, shundan keyin igna tutqich tik holatga keltirib, ilmoq qizdiriladi.

Suyuq muxitdan mikroorganizmlarni graduslarga bo'lingan yoki Paster pipetkasi bilan ajratib olish mumkin. Qog'ozga o'ralgan sterillangan pipetkalar paxtali tampon bilan berkitilgan yuqori uchidan tutgan holda sug'urib olinadi.

Suyuq kultura mavjud kolba (probirka) chap qo'lda ushlanadi. Pipetkaning yuqoridagi teshigini (tamponli) ko'rsatkich barmoq bilan berkitgan holda o'ng qo'lning bosh va o'rta barmoqlari bilan ushlanadi. Agar pipetkadagi suyuqlik etarli bo'lmasa, uning paxtali tampon tiqilgan uchidan og'iz bilan so'riladi. Suyuq kulturani rezina nok yordamida so'rish ham mumkin. Ajratib olingan namuna preparatlar tayyorlash yoki yangi ozuq muhitiga ekish uchun ishlatiladi. Iflos pipetkani shtativga o'rnatish yoki boshqa narsalarga tegdirish mumkin emas. U darhol dezinfeksiyalovchi suyuqlikka (xloraminning 0,5-3% li suvdagi aralashmasi yoki fenolning 3-5% li suvdagi aralashmasiga) solib qo'yilishi kerak.

Tirik hujayralar preparatini tayyorlash.

Tirik holatdagi mikroorganizmlar "ezilgan omchi", "osilgan tomchi" va "tamg'a" ko'rinishidagi preparatlar yordamida kuzatiladi.

"Ezilgan tomchi" preparati. Buyum oynasiga suv, bulon yoki fiziologik aralashma (NaCl ning 0,5% li aralashmasi) ning kichik bir tomchisi tomiziladi. Unga ilmoq yoki igna yordamida qattiq ozuq muhitidan olingan kultura yoki o'rganilayotgan boshqa material (xamir, achitqi sharbat va hokazo) qo'shiladi. SHundan keyin sal loyqalangan suspenziya hosil bo'lgunga qadar yaxshilab aralashiriladi. Suyuq muhitlarda o'sgan mikroorganizmlarni kuzatilayotganda buyum oynasida suv tomchisini tomizish shart emas. Qoplagich oynaning cheti mikroorganizmlar tomchisi chekkasiga qo'yiladi va oynalar orasida mikroskopda ko'rish uchun halaqit beruvchi xavo pufakchalari hosil bo'lmasligiga harakat qilib, sekin-asta tushiriladi. Ilmoqning shisha uchi bilan qoplagich oyna buyum oynasiga qisiladi. Qoplagich oyna chetidan chiqib qolgan ortiqcha suyuqlik filtr qog'oz parchasi bilan artib olinadi. Tayyorlangan preparat zudlik bilan o'rganilishi lozim. CHunki suyuqlik qurib qolishi va mikroskopda ko'rish qiyinlashishi mumkin.

"Ezilgan tomchi" preparati yordamida yorug' va qora maydonlarda hujayralarning shakli va o'lchamlari, fiziologik holatlari, ko'payish turlari, sporalarning joylashishi, zahira ozuq moddalarning mavjudligi, harakatchanligi aniqlanishi mumkin. Hujayralarning harakatchanligini aniqlashda ularning haqiqiy xarakatini braun harakatidan farqlash lozim, Braun harakatida hujayralar bitta joyda qolgan holda tebranma harakatni amalga oshiradi yoki suyuqlik oqimi bo'yicha ko'chadi.

"Osilgan tomchi" preparati. Bu preparatni tayyorlash uchun dumaloq shaklda ishlangan chuqurchali buyum oynasidan foydalaniladi. CHuqurcha chetlariga vazelin surtiladi. YOg'sizlantirilgan qoplagich oyna o'rtasiga mikroorganizmlar suspenziyasining kichik bir tomchisi tomiziladi. Tomchini pastga qaratib oyna to'ng'ariladi va ehtiyotkorlik bilan vazelinli halqaga bosiladi. Tomchi chuqurchaning o'rtasiga joylashishi, uning chetlari va tubiga tegmasligi lozim (2-rasm).

Bunday preparatda tomchi qoplagich oynaning ichki sirtiga osilgan holda bo'lib, germetik berk kamera ichida qoladi. Bu esa uni bir necha kun mobaynida o'rganishga, mikroorganizmlarning o'sishi va ko'payishini, sporalarning hosil bo'lishi va o'sishini hamda hujayralarning harakatchanligini kuzatishga imkon beradi.

“Tamg‘a” preparati aktinomitsetlar va mitselial zamburug‘larning hujayralarini koloniyadagi tabiiy joylashishini o‘rganish uchun tayyorlanadi. Mikroorganizmlar koloniyasi o‘sgan qattiq muhitdan skalpel yordamida uncha katta bo‘lmagan kubik yoki alohida koloniya kesib olinadi va buyum oynasi ustiga qo‘yiladi. Mikroorganizmlar joylashtirilgan oyna yuzasi tepaga qaratilgan bo‘lishi kerak. So‘ngra uning ustiga toza qoplagich oyna qo‘yiladi, ilmoq yoki igna bilan u sal bosiladi va chetga surib yubormaslikka harakat qilgan holda tezlik bilan ko‘tarib olinadi. Hosil bo‘lgan tamg‘ani pastga qaratgan holda preparat buyum oynasiga tomizilgan suv yoki ko‘k metilen (1:40) tomchisi ustiga joylashtiriladi va mikroskopda qaraladi.

Tirik hujayralarni bo‘yash. Hujayralarning ba‘zi xususiyatlarini va ulardagi qo‘shilmalarni aniqlash uchun mikroorganizmlarni tirik holda bo‘yash usulidan foydalaniladi. Bo‘yoq moddalarning zaharliligini hisobga olgan holda, tirik hujayralar neytral qizil, neytral binafsha, ko‘k metilen, fkusin, eozin va eritrozinning juda kam miqdordagi (0,001 -0,0001%) konsentratsiyalari bilan bo‘yaladi. O‘rganilayotgan mikroorganizmlar tomchisi buyumoynasida bo‘yoq aralashmasi tomchisi bilan aralashtiriladi, qoplagich oyna bilan yopiladi va 2-3 minutdan so‘ng mikroskopda qaraladi.

Mikroorganizmlarning tabiiy shakli, kattaligi va tuzilishi, ularning ayrim tuzilmalari (hujayradan tashqaridagi shilimshiqlik) to‘g‘risidagi tushunchalarni negativ preparatlar beradi. Negativ bo‘yash uchun suyuq tush, qizil kongoning 3% li suvli eritmasi, nigrozinning 10 foizli eritmasi va mirob hujayralariga singmaydigan boshqa bo‘yoqlar ishlatiladi. Tush yoki boshqa bo‘yoq eritmasini tomchisi o‘rganilayotgan kultura tomchisi bilan aralashtiriladi, ustidan qoplagich oyna bilan yopiladi. Bo‘yoqlar hujayrani o‘rab turgan bo‘shliqni to‘ldiradi. Natijada bo‘yalmagan mikroorganizmlar preparatning to‘q fonida yaxshi yoritilgan rangsiz kapsulalar ko‘rinishida aniq ajralib turadi.

Negativ bo‘yash boshqacha tarzda amalga oshirilishi ham mumkin. Buyum oynasiga qizil kongoning 3 foizli suvdagi eritmasining tomchisi tomiziladi. Bu tomchiga o‘rganilayotgan material qo‘shiladi va sal aralashtiriladi. SHundan keyin hosil bo‘lgan aralashma ilmoq yordamida spiral ko‘rinishida yoyiladi. Bunda ilmoq har gal yangi joydan olib o‘tiladi. Material qon surtmasi tayyorlash jarayonidagi singari qoplagich oyna bilan ham yopilishi mumkin. Surtma havoda quritiladi, fiksirlanmaydi va immersion ob‘ektiv bilan mikroskopda ko‘riladi. Qizil-jigarrang fonda mikroorganizmlarning bo‘yalmagan shakllari yaxshi ko‘rinadi.

Fiksatsiya qilingan mikroorganizmlar preparatlarini tayyorlash. YAshash jarayoni to‘gatilgan, lekin nozik tuzilmalari to‘liq saqlangan mikroorganizm hujayralari fiksatsiya qilingan hisoblanadi. Fiksatsiya qilingan bo‘yalgan hujayralar va ularning tuzilish detallari preparatda yaqqol ajralib turadi. Bu hujayralarning shakli va ichki elementlarini o‘rganishni engillashtiradi. Fiksatsiya qilingan preparatlar odatda immersion orqali ko‘rinadi. Fiksatsiya qilingan, bo‘yalgan preparatlarni tayyorlash quyidagi bosqichlarni o‘z ichiga oladi: surtmani tayyorlash, quritish, fiksatsiya qilish va uni bo‘yash.

Surtmani tayyorlash. Surtmalar yog'sizlantirilgan toza buyum oynalarda tayyorlanadi. Buyum oynasi pinset yordamida yoki ikki chetidan barmoqlar bilan ushlagan holda olinadi va gorelka alangasiga tutib sal kuydiriladi. SHundan keyin kuydirilgan tomonini tepaga qaratib vannacha ustidagi ko'prikcha (rezina shlang parchalari bilan tutashtirilgan ikkita shisha tayoqcha)ga qo'yiladi. "Ezilgan tomchi" preparati tayyorlanadi, ilmoq yordamida yaxshilab aralashtiriladi va hosil bo'lgan suspenziya yupqa tekis qatlam ko'rinishida 1-2 sm maydonga yoyiladi.

Surtmani quritish. Surtma xona haroratida quritiladi. Agar quritish jarayoni sekin kechsa, surtma tepaga qaratilgan preparat gorelka alangasi ustida balandroq ko'tariladi va oynani qizdirmasdan iliq havoda quritiladi. Aks holda hujayralar shakli buzilishi mumkin.

Fiksatsiya qilish. Fiksatsiya qilish jarayonida mikroorganizm hujayralari o'ldiriladi va xavfsizlantiriladi. Bu esa patogen kulturalar bilan ishlashda muhim ahamiyatga ega. Fiksatsiya qilish natijasida hujayralar oynaga jips yopishib qoladi va keyingi operatsiyalarda tushib ketmaydi. O'lik hujayralar bo'yoqni o'ziga yaxshi singdiradi, ya'ni yaxshi bo'yaladi.

Fiksatsiya qilish uchun preparat pinset yordamida yoki bosh va ko'rsatgich barmoqlar bilan ushlanadi va gorelka alangasi ustidan 3-4 marta olib o'tiladi. Buyum oynasi barmoq tekkizilganda sal kuydiradigan darajagacha 2-3 sekund mobaynida qizdiriladi. Bundan ortiq termik fiksatsiya mikroob hujayralarining tuzilishi va shaklini o'zgartirib yuborishi mumkin. SHuningdek kimyoviy moddalar bilan fiksatsiya qilish ham qo'llaniladi. Buning uchun surtmali buyum oynasi 96% li etanol solingan menzurkaga 15-20 min, suvsiz metanolga 3-5 min, atsetonga 5 min, Nikiforov aralashmasiga 15-20 min, 96% etanol va 40% li shakllinning 95:5 nisbatdagi aralashmasiga 2 min solib qo'yiladi. Fiksatorni bevosita surtma ustiga qo'yish va ko'rsatilgan vaqtgacha tutib turish ham mumkin. Fiksatsiya tugagandan keyin surtma distillangan suv oqimi bilan yuviladi va shundan keyin bo'yaladi.

Fiksatoridan yuvilgan surtma vannacha ustiga o'rnatilgan ko'prikchaga joylashtiriladi. Surtma ustiga bo'yoq eritmasi tomizg'ich bilan quyiladi. Bo'yash davomiyligi har xil bo'ladi: suvli fuksin uchun – 1-2 min, ko'k metilen uchun esa - 3-5 min. Bo'yash jarayoni tugagandan keyin preparat oynaning chetidan ushlagan holda olinadi, qiya holatda tutiladi va kuchsiz suv oqimi yordamida bo'yoq yuvib tashlanadi. YUvish oqib tushayotgan suvda bo'yoq deyarli qolmagunga qadar davom ettiriladi. SHundan keyin preparat havoda yoki oynaga ehtiyotlik bilan filtr qog'ozini tegizib quritiladi. Bo'yalgan surtma immersion ob'ektiv orqali mikroskopda ko'riladi. Puxta tayyorlangan va to'g'ri bo'yalgan preparatda ko'rish maydoni toza bo'lib, faqat hujayralar bo'yalgan bo'ladi xolos.

Toza fon hosil qilish uchun bo'yoq eritmasini surtma ustiga qo'yilgan filtr qog'ozga qo'yish yoki oldindan tegishli bo'yoq singdirilgan filtr qog'ozdan foydalanish mumkin. Fiksatsiya qilingan surtma ustiga bir necha distillangan suv tomchisi tomiziladi, uning ustidan esa surtma o'lchamiga moslab qirqib olingan va tegishli bo'yoq bilan bo'yalgan filtr qog'oz qo'yiladi, u oyna sirtiga bosiladi va belgilangan muddatda shunday ushlab turiladi. SHundan keyin qog'oz olib

tashlanadi, preparat suv bilan yuviladi, quritiladi va immersiya orqali mikroskopda ko'riladi.

Predmetlarni fikssatsiyalash usullari.

Preparatlar : 1) undagi mikroorganizmlarni nobut qilish : 2) mikroblarni buyum oynasiga mustahkam yopishtirish (suv bilan yuvilganda buyum oynasidagi mazok yuvilib ketmasligini ta'minlash) 3) nobut bo'lgan bakteriyalar (oqsil birikmalar) tezroq bo'yalishini ta'minlash maqsadida fikssatsiyalanadi.

Odatda mikroblar buyum oynasiga yopishib qolishi uchun preparat spirt lampa alangasi ustidan bir necha marta o'tkaziladi. Biroq bunday fikssatsiyalashda ularning morfologik tuzilishi o'zgarib ketishi sababli preparatlar ximiyaviy birikmalar bilan fikssatsiyalanadi. Ularning morfologik tuzilishi o'zgarib ketishi sababli preparatlar quydagi kimyoviy brikmalar bilan fikssatsiyalanadi .

1. Etil spirt. Odatda, etil spirtining 95 % eritmasi, ayrim vaqtlarda absalyut spirt ham ishlatiladi. Fiksatsiyalash vaqtida bu spirt buyum oynasida tayyorlangan mazok ustiga tomiziladi. Oradan bir necha minut, preparat suv bilan yuviladi va bo'yaladi.

2. 50 ml spirtga 50 ml efir qo'shilgan aralashma. Buyum oynasidagi mazok ustiga bu aralashmadan bir necha tomchi tomiziladi va bug'lanib ketguncha qoldiriladi (Nikiforov bo'yicha).

3. Atseton. Mazokli buyum oynasi atseton eritmasiga botiriladi. Oradan besh minut o'tgach, mazok quriydi . Keyin bo'yab ko'riladi.

4. Formalin . Mazokli buyum oynasini xo'llab Petri idishining qopqog'iga yopishtiriladi va idishga 10-15 ml chamasi formalin eritmasi quyiladi. So'ngra qopqog'i yopilib, unga yopishtirilgan buyum oynasidagi mazok bir muncha vaqt formalin bilan bug'lantiriladi . Formalin bug'i ta'sirida mikroblar nobud bo'lib, buyum oynasiga yopishib qoladi .

5. Fiksatsiyalovchi moddalarning aralashmasi. Bu tipdagi fiksatorlani tayyorlashda bir xil kimyoviy brikmaladan foydalanildi. Sitologik tekshirishlarda mikroblarning ichki tuzilishini aniqlash uchun tayyorlangan mazoklar 7 ml 3% li bixromat, 7 ml 1% li xromat kislotasi eritmasi va 4 ml osmiy kislota eritmasidan iborat aralashmada 1-2 minut fikssatsiyalanadi.

Bo'yash. Mikroorganizmlarni bo'yashning oddiy, murakkab va differensial usullari mavjud. Oddiy bo'yash usulida bitta bo'yoq ishlatiladi va barcha hujayralar bo'yaladi. Murakkab bo'yash usulida ikki yoki bir nechta bo'yoqlardan foydalanish ko'zda tutiladi. Masalan, bakteriyalarning Gram bo'yicha bo'yashga munosabatini diagnostik aniqlash. Differensial bo'yash usuli hujayra biologik tuzilmalarining turli bo'yoqlarga nisbatan individual munosabatiga asoslangan (sporalarni, qobiqni, xivchinlarni, yadroni, kapsulani va hokazolarni bo'yash).

Preparatni bo'yashda ishlatiladigan bo'yoqlar.

Fiksatsiyalangan preparatni suv bilan yaxshilab yuvib ustiga yo'l qilib bo'yoq tomiziladi. Mikrobiologiyada ishlatiladigan bo'yoqlarning turi juda ko'p bo'lib , har qaysi bo'yoq o'ziga xos ta'sir ko'rsatadi .

1. Metilen ko'ki. 100 ml 96% li spirtida 3 g metilen ko'ki eritiladi. Hosil bo'lgan eritma bir necha kun saqlanadi shu vaqt ichida bir necha marta chayqatiladi . So'ngra eritma fil'tirlanadi Bu bo'yoqni ishlatishdan oldin unga

5-10 barovar suv quyiladi, bu bo‘yoq bilan preparat 2-3 minut davomida bo‘yaladi.

2. Fuksin (asosiy). Qizil rangli fuksin bo‘yog‘i juda barqaror bo‘ladi. Uni tayyorlash uchun 100 ml 96% li spirtga 10 g asosiy fuksin kiristallarini qo‘shib, to‘yingan eritma hosil qilinadi. SHu eritmadan 10 ml olib. Unga 100 ml suv qo‘shiladi, bu bo‘yoq bilan preparat 1-3 minut davomida bo‘yaladi.

3. Sil’ - karbol fuksini. Avval konsentrlangan fuksin eritmasi tayyorlanadi. Buning uchun 1 g fuksin 10 ml 96% ml spirtga eritiladi. SHu eritmaga 100 ml 5% li karbol (fenol) kislotaga eritmadan qo‘shiladi. Oradan 24soat o‘tgach, aralashma fil’tirlanadi, bu bo‘yoq bilan preparat 2-3 minut davomida bo‘yaladi.

4. Metlen –violet yoki pioktanin bo‘yog‘i. Bu bo‘yoq ham metilen ko‘ki va fuksin bo‘yoqlari singari tayyorlanadi. Metalen bo‘yog‘i yod eritmasi bilan birgalikda ishlatilganda bakteriyalar juda yaxshi bo‘yaladi. Bu bo‘yoq bakteriyalarni Gramm asosida bo‘yashda ishlatiladi.

5. Eritrozin. Avval 5 g karbol kislotaga (fenol) 100 ml distillangan suvda eritilib, so‘ngra unga 1-5 g eritrozin bo‘yog‘i qo‘shiladi. eritrozining karbol kislotadagi eritmasida tuproq zarrachalarini bo‘yamasdan, uning ichidagi bakteriyalarnigina bo‘yaladi. Bu bo‘yoq tuproq tarkibidagi mikroorganizmlarning umumiy sonini aniqlashda ishlatiladi.

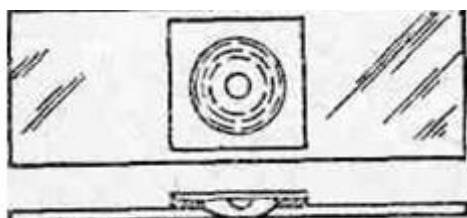
6. Yod eritmasi. Bu eritmani tayyorlash uchun 1g kiristal yodni 2g kaliy yodid tuziga qo‘shib, 300 ml suvda eritiladi, bu eritmada lyugol eritmasi ham deyiladi ..

7. Gensan –violet bo‘yog‘i. Bu bo‘yoq 100 ml suvga 11 ml gensan - violet bo‘yog‘ning to‘yingan eritmasi va 10 tomchi anilin aralastirilib tayyorlanib, bakteriyalarni gramm usulida bo‘yashda ishlatiladi.

Kerakli jihoz va materiallar: mikroskop, buyum oynasi, bakterial ilmoq spirt lampa, to‘xtab qolgan suv yoki tish kiri, filtr qog‘ozi, fuksin bo‘yog‘i.

Ishning borishi: Ishning bajarilish tartibi: Bakteriyalarni tirik holda ko‘rish uchun to‘xtab qolgan iflos suv ishlatiladi. Bu suvni tayyorlash uchun 20—25 g quruq pichan maydalanadi va 200 ml suv solingan idishga botirilib, 30⁰ li termostatda 2—3 kun saqlanadi. Mikroorganizmlar neytral sharoitda yaxshi rivojlanishini nazarda tutib, idishga ozgina oq bo‘r solinadi. Hosil qilingan iflos suvdan osma hamda ezilgan tomchili preparatlar tayyorlanadi.

Osma tomchili preparat tayyorlash uchun o‘rtasi chuqur buyum oynasining chuqurchasi atrofiga vazelin surkab qo‘yiladi. Tozalangan qoplag‘ich oyna o‘ng qo‘lga olinib sterillanadi, ya‘ni sirtidagi mikroblarni yo‘qotish uchun spirt lampa alangasi ustidan 2—3 marta o‘tkaziladi. So‘ngra chap qo‘lga bakterial ilmoq olinib, cho‘g‘ bo‘lguncha spirt lampasi ustiga tutiladi. Sterillangan ilmoq yordamida tekshiriladigan ob`ektdan —sasigan suvdan bir tomchi olib qoplagich oyna ustiga tomiziladi. So‘ngra u teskarisiga aylantirilib, buyum oynasidagi atrofiga vazelin surkalgan chuqurcha ustiga qoplanadi.



2-rasm. Osmo tomchi preparati tayyorlash uchun ishlatiladigan o'rtasi chuqur buyum oynasi
a -ustidan ko'inishi; b -yonidan ko'inishi

Ezilgan tomchili preparat tayyorlash uchun tekis buyum oynasi artib tozalangandan keyin sterillanadi va ustiga tekshiriladigan suyuqlik tomchisi tomiziladi. So'ngra usti qoplag'ich oyna bilan yopiladi. Natijada suyuqlik ezilgan holatga aylanadi. Tayyorlangan preparatlar mikroskopning 8x va 40x li ob'ektivlari orqali tekshirilib, ularning ichida harakatsiz va harakatlanayotgan tirik mikroorganizmlar borligi aniqlanadi.

Eslatma: a— qoplag'ich oyna o'miga emulsiyadan tozalangan fotoplyonka bo'laklari ishlatilsa, u bir marta foydalanib, so'ngra tashlab yuboriladi; b —o'rtasi chuqur oyna o'miga oddiy buyum oynasi ishlatilganda uning ustiga o'rtasi doira shaklida o'yib olingan va namlangan filtr qog'oz yopishtirib qo'yiladi. Uning ustiga tekshiriladigan tomchi tomizilgach, qoplag'ich oyna yopiladi.

To'xtab qolgan iflos suvdan yoki tish kiridan bakteriyali preparat tayyorlash uchun oddiy buyum oynasi ishlatiladi. U yaxshilab artilib sterillanadi. Buning uchun oyna spirt lampa alangasi ustidan 2—3 marta o'tkaziladi. So'ngra tekshiriladigan suyuqlikdan sterillangan bakterial ilmoqda bir tomchi olib, buyum oynasiga surkaladi, ya'ni mazok tayyorlanadi. Mazok ochiq havoda quritiladi, so'ngra bakteriyalarni oyna ustida fiksatsiyalash maqsadida, oyna spirt lampa alangasi ustidan 2—3 marta o'tkaziladi. Tayyorlangan preparat ustiga 2—3 tomchi Lyoffler sin'kasi yoki fuksin bo'yog'i tomiziladi. Oradan 1—2 minut o'tgach, bo'yoq yuviladi. Preparat ustidagi suv tomchilari filtrlanadi qog'ozga shimdirib olinadi. So'ngra mazok ustiga bir tomchi kedr yoki kastorka moyi tomizib, u avval quruq (moyga botirilmagan, 8x li), keyin immersion ob'ektiv orqali ko'riladi. Preparatda sharsimon, tayoqchasimon, spiralsimon va boshqa shakldagi mikroblar borligi aniqlanadi.

Nazorat savollari

1. Biologik mikroskop nima maqsadda ishlatiladi?
2. Mikroskop qanday qismlardan tashkil topgan?
3. Makro- va mikrovintlarning vazifasi nima va ulardan qanday foydalaniladi?
4. Quruq va immersion ob'ektivlar nima?
5. Nima uchun immersion ob'ektivlarda kedr va boshqa shunga o'xshash yog'lar ishlatiladi?
6. Buyum oynasi va yopqich oyna nima? Nima uchun ular ishlatiladi?
7. «Ezilgan tomchi» preparati qanday tayyorlanadi?
8. «Osilgan tomchi» preparati qanday tayyorlanadi?
9. Fiksatsiya qilingan preparat qanday tayyorlanadi?
10. Mikroorganizm preparatlarini bo'yash usullari qanday?

5 –LABORATORIYA MASHGULOTI

Mavzu: MIKROORGANIZMLARNI O‘STIRISH

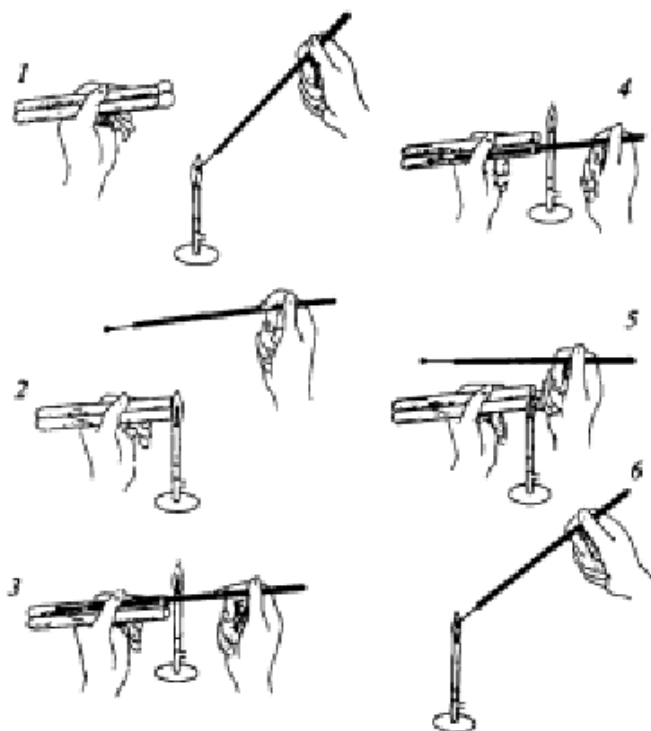
Mashg'ulot o'tkazishdan maqsad. Mikroorganizmlarni suyuq va qattiq ozuqa muhitiga ekish va qayta ekish usullarini o'rganish, har xil mikroorganizmlarning yig'ma (elektiv) to'plamini, shuningdek, ularni qattiq ozuqa muhitli Petri likobchasiga ekish yo'li bilan toza to'plam olishni o'rganish.

Mikroorganizmlarni ekish va qayta ekish usullari

Har xil substratlardan mikroorganizmlarni ajratib olish, ularning toza to'plamlarini ko'paytirish va aktiv holatda saqlash uchun ular laboratoriya sharoitida ekiladi va qayta ekiladi. Tekshiriladigan materialdan ozgina olib, ozuqa muhitiga ekish inokulyatsiya (ekish) deb, boshqa yangi ozuqa muhitiga ekish qayta ekish deb ataladi. Ekishda va qayta ekishda quyidagi usullarga amal qilish zarur :

Probikadan Petri likopchasiga ekishda quyidagi ishlar amalga oshiriladi:

1. Petri likopchasining ustiga mum qalam yordamida talabanning ismi, guruhining raqami, sana yoziladi.
2. Yuqorida aytilganday, probirkadan ilmoq bilan kultura olinadi.
3. Bo'sh qo'l bilan Petri likopchasining qopqog'i ochiladi, lekin stolga qo'yilmaydi va likopcha ustida ushlab turiladi.
4. Petri likopchasidagi oziqli muhitga ilmoqdagi kultura "shtrix" usulida ekiladi. Bunda agarni o'ymasdan ehtiyot qilib ekish lozim (6-rasm).
5. Petri likopchasi yopiladi.
6. Ilmoq flambirlanadi va joyiga qo'yiladi. Ekmalar 28°C da keyingi darsgacha o'stiriladi. Aseptika qoidasiga rioya qilingan bo'lsa Petri likopchasida faqat sof kultura o'sadi, aksincha qoidaga rioya qilinmasa likopchada har xil rangli va har xil kattalikdagi bakteriya koloniyalari o'sib chiqadi. Preparat tayyorlab mikroskop ostida ko'rilganda ko'rish maydonida biz ishlayotgan kulturadan tashqari shakli va o'lchamlari turlicha bo'lgan mikroorganizmlarni kuzatish mumkin. Bunday mikroorganizmlar bilan ishlash usuli mikrobiologik aseptika qoidalariga xilof bo'ladi va ishni qaytadan bajarish talab qilinadi.



Mikroorganizmlar to'plamini qayta ekish.

1. O'ng qo'lda esa bosh va ko'rsatkich barmoq bilan bakterial ilmoqni ushlab turib, gorelka alangasida sterillanadi.

2. Ikkala probirkaning paxta tiqinini olib, o'ng qo'lning jimjilog'i va nomsiz barmog'i bilan qo'l kaftiga bosib turiladida, probirkaning chetlari kuydiriladi. Paxta tiqinlar boshqa biror narsaga tegib ketmasligiga e'tibor berish kerak.

3. Ilmoq qayta ekiladigan mikroob to'plami bo'lgan probirkaga tushiriladi. Probirka devorlariga tegib ketmasdan ehtiyotlik bilan bir tomchi suyuq to'plam olinadi. Agar qiya agar yuzasidan olib qayta ekiladigan bo'lsa, ilmoqni sovitish uchun oldin u to'plami yo'q agarga botirib olinadi, shundan keyin qattiq qiya muhitdan ozgina mikroob massasi olinadi.

4. Keyin mikroob materiali bo'lgan ilmoq sterillangan suyuq muhitli probirkaga tushiriladi. Bunda probirka devorlariga tegib ketmaslik kerak. Qiya ozuqa muhitiga ekishda mikroorganizmlar hujayrasi bo'lgan ilmoq probirkaning ozginagina kondensatsion suv to'plagan tubigacha tushiriladi.

Keyin ehtiyotlik bilan, ozuqa muhitini titib yubormay, probirka tubidan ozuqa muhit yuzasigacha shtrix chiziq chizib chiqiladi.

5. Ilmoqni probirkadan olib, uning chetlari va tiqinining ichki tomoni kuydiriladi, shundan keyin probirkalarning og'zi berkitiladi.

6. Ilmoq gorelka alangasida qayta qizdiriladi.

7 Probirkaga: to'plamning nomi va ekish muddati yozib qo'yiladi. Yozuv shishaga yozadigan siyohda yoki qalamda yoziladi yoki etiketka yopishtiriladi. To'plam o'sishi uchun ekilgan probirkalar termostatda doimiy temperaturada saqlanadi.

Yuqorida bayon etilgan ishlar garelka alangasi yonida (lekin alanga ustida emas), iloji boricha tez bajariladi, aks holda to'plam begona mikroorganizmlar bilan ifloslanadi.

Toza to'plam bilan ishlovchi shaxs oldida keskin harakatlanish, yurish, yo'talish, gapirish mumkin emas, chunki havoning harakati to'plam va muhitning tasodifiy ifloslanish xavfini ko'paytiradi. Shuning uchun mikroorganizmlarni yaxshisi bokslarda ekish va qayta ekish kerak.

Suyuq muhitga to'plamlar ilmoqda yoki pipetkada ekiladi.

Bunda paxta tiqini ho'l bo'lmasligi uchun har ikkala probirka qiya holatda ushlanadi. Mikroorganizmlar material bo'lgan ilmoq bevosita sterillangan muhitga tushiriladi va chayiladi. Hujayralarni (qattiq muhitdan ilmoqda olingan) probirkaga o'tkazishda material uning devoriga yaxshilab ishqalanadi (suyuq muhit yuzasi sathida) va har doim muhit bilan yuvib turiladi.

Qattiq muhitga to'plamlar ignada, ilmoqda va Drigalskiy shpatelida ekiladi. Qiya agarga mikroorganizmlar turli usullarda ekiladi: zigzagsimon shtrix qilib ekishda ilmoq muhit yuzasida probirkaning bir devori chekkasidan ikkinchisiga tomon erkin surkab sirpantirib boriladi; to'g'ri chiziq bo'ylab ekishda ozuqa muhiti yuzasining o'rtasidan pastdan yuqoriga tomon ilmoqda to'g'ri chiziq chiziladi; materialni muhitning butun yuzasi bo'ylab ehtiyotlik bilan aylantirib ishqalash yo'li bilan ham ekiladi.

Petri likopchasiga quyidagicha ekiladi: qattiq ozuqa muhiti probirkada yoki kolbada eritib (qaynayotgan suv hammomida), 48-50°C gacha sovutiladi va sterillik qoidalariga amal qilgan holda probirka yoki kolba ichidagi material garelka alangasi ustida sterillangan likopchaga 3-5 mm qalinlikda quyiladi va sekin aylantirib harakatlantirib bir tekis yoyiladi. Sovigan muhitni termostatda ozgina quritish mumkin. Keyin ilmoqda parallel yoki zigzagsimon shtrixlar shaklida siyrak ekish usulida yoki Drigalskiy shpatelida ekiladi. Shpatel, odatda, bir uchi uchburchak shakldagi shisha tayoqcha bo'ladi. Petri likopchasidagi qattiq ozuqa muhiti yuzasiga ekiladigan materialdan kichik tomchi tomizib, shpatelda sekin-asta oziqa muhiti yuzasi bo'ylab yoyiladi. Ekish vaqtida likopchanning qopqog'i garelka alangasi tomonga qarab ochiladi. Ekib bo'lingandan keyin shpatelni olovda qizdirib, shtativga qo'yiladi. Keyin likopcha qopqog'ining ustiga to'plamning nomi, ekilgan vaqti va talabaning familiyasi yozib qo'yiladi. Likopchalar to'nkarib qo'yiladi. Bunda koloniyalar bir-biriga qo'shilib ketmaydi.

Probirkalardagi GPA yoki go'sht-peptonli jelatina ustuniga mikroorganizmlar igna yordamida ekib o'stiriladi.

Ekilgan va tegishli yozuvlar yozilgan probirka, kolba va Petri likopchalari to'plam o'sishi uchun termostatga qo'yiladi.

Mikroorganizmlarning yig'ma (elektiv) to'plamini olish usullari Tarkibida mikroorganizmlar yaqin turlarining yoki hatto bir turining vakillari ko'pchilikni tashkil etgan to'plamlar yig'ma yoki elektiv deb ataladi (lotincha e lestus- tanlangan degani). Oziq-ovqat mahsuloti (yoki boshqa obyekt) ning mikroflorasi tarkibini o'rganishda yig'ma to'plamdan toza to'plam ajratib olinadi. Yig'ma to'plam olish uchun tekshiruvchini qiziqtiradigan

mikroorganizmlarning ko'plab rivojlanishini ta'minlovchi sharoit yaratiladi. Buning uchun eng avvalo o'ziga xos tanlama muhitdan foydalaniladi; ular mikroorganizmlar muayyan guruhlarining ozuqa muhitiga bo'lgan fiziologik talabini eng to'liq ta'minlaydi. Bu muhitlar birga uchraydigan boshqa mikroorganizmlar uchun kam foydali yoki ular uchun umuman yaroqsiz bo'lishi kerak.

Muhit reaksiyasi (pH), temperatura, kislorod bor-yo'qligi, antibiotiklarga va boshqa birikmalarga chidamliligi yig'ma to'plam olishga ta'sir etadigan muhim omillardir. Masalan, muhitning kislotaliligi oshirilib, bakteriyalarning rivojlanish imkoniyati yo'qotiladi va achitqi hamda mitseliyli zamburug'larning o'sishi uchun qulay sharoit yaratiladi. Termofil organizmlarning yig'ma to'plami 45-65°C, ba'zan hatto 70-75°C temperaturada olinadi. Muhitga ma'lum konsentratsiyada penitsillin qo'shilsa, grammanfiy bakteriyalarning yoki achitqilarning rivojlanishiga ta'sir etadi. Neomitsin yoki penitsillin streptomitsin bilan birgalikda bakterial mikroflorani nobud qiladi va achitqilarning rivojlanishi uchun sharoit yaratadi. Nistatin esa aksincha, bakteriyalarga ta'sir etmay, achitqilarning hayot faoliyatiga to'sqinlik qiladi.

Aeroblarning yig'ma to'plamini olish uchun ozuqa muhitni kolbalarga yupqa qilib (1,5-2 sm) quyib, tebratma uskunada (kachalkada) o'stiriladi. Anaerob mikroorganizmlar bilan boyitish uchun muhit uzun probirkalarga yoki flakonchalarga to'ldirib quyiladi.

Bitta elektiv muhitning o'ziga yana ikkinchi marta qayta ekilishi va ma'lum turlar uchun qulay bo'lgan sharoit yaratilishi natijasida to'plam asta-sekin kerakli xossaga ega bo'lgan mikroorganizmlar bilan boyib boradi, birga uchraydigan formalar kamayadi.

Quyida oziq-ovqat sanoatida ishlatiladigan, amalda muhim ahamiyatga ega bo'lgan ayrim mikroorganizmlarning, shuningdek, oziq-ovqat mahsulotlarini buzadigan, ko'p tarqalgan qo'zg'atuvchilarning elektiv to'plamini olish usullari bayon etiladi.

Har bir talaba biror elektiv to'plamni oladi, ya'ni mavzuning bitta topshirig'ini bajaradi. Har qaysi topshiriq ikkita laboratoriya mashg'ulotida bajariladi: birinchi mashg'ulotda ma'lum bakteriyalarni to'plash-yig'ish uchun tajriba o'tkaziladi; ikkinchi mashg'ulotda tajriba natijasi tahlil qilinadi. Sut achituvchi bakteriyalarning yig'ma to'plamini olish. Bunda qatiq, tuzlangan sabzavot va mevalar, o'simliklar guli yoki bargi va boshqa obyektlar sut achituvchi bakteriyalarni ajratib olish uchun boshlang'ich material bo'lib xizmat qiladi.

Sut achituvchi bakteriyalar o'stiriladigan elektiv muhit 3-ilovada berilgan. Ye. I. Kvasnikov sut achituvchi bakteriyalarning spirtga chidamliligini hisobga olib, sut achituvchi mezofil bakteriyalarning yig'ma to'plamini olishning quyidagi usulini taklif etdi: tekshiriladigan material optimal muhitga ekiladi va 18-24 soatdan keyin unga etil spirti qo'shiladi. Sut achituvchi kokklarni ajratib olish uchun muhitdagi spirt konsentratsiyasini 8-10 hajm %, sut achituvchi tayoqchalar uchun 12-14 hajm % darajada saqlash mumkin. Spirtli manbalar (vino, brajka, pivo) dan ajratib olingan ba'zi turlar (*Lactobacillus buchneri*, *L. brevis*, *L. fermenti*) uchun spirt konsentratsiyasi 16-18 hajm % gacha oshiriladi.

Sut achituvchi termofil bakteriyalarning yig'ma to'plamini olish uchun solod sharbati bo'lgan kolbaga ozgina yanchilgan arpa yoki arpa solodi qo'shib, termostatda 48- 50°C da saqlash mumkin. 1-2 kundan keyin muhit qavatida tovlanadigan kuchsiz to'lqinsimon loyqa paydo bo'ladi; mikroskopda tekshirilganda ingichka, uzun, harakatlanmaydigan sporasiz tayoqchalar ko'rinadi. Achitqilarning yig'ma to'plamini olish. Boshlang'ich material sifatida presslangan yoki ekiladigan ishlab chiqarish achitqilaridan, pishgan uzum, rezavor mevalardan, pivo yoki vino cho'kmasidan, non achitqilari va hokazolardan foydalanish mumkin. Materialdan ozgina olib, solod sharbatiga (pH 4-4,5), uzum sharbatiga yoki sintetik elektiv muhitga qo'shilsa va termostatda 28-30°C da saqlansa, achitqilar avj olib rivojlanadi. Solod sharbatida avj olib, rivojlanadigan mitseliyli zamburug'lari o'sishining oldini olish uchun 4-6 hajm % etil spirti yoki 0,2 % natriy propionat qo'shish mumkin. Birga uchraydigan bakteriyalar muhitga levomitsetin (50 mg/1), neomitsin (20 birlik/mg) yoki penitsillin bilan streptomitsinning aralashmasini (50- 100 birlik/ ml) qo'shib yo'qotiladi. Takomillashmagan achitqilarni yo'qotish uchun ozuqa muhitiga 0,1-0,2 % miqdorda yod-sirka kislota yoki lizinli sintetik muhitga boshlang'ich materialdan qo'shiladi. Saxaromitsetlarni boshqa achitqilardan ajratib olish uchun muhitga 2,5 % etilatsetat qo'shib, sirka kislota bilan muhit pH 4,0 gacha yetkaziladi.

Spora hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma to'plamini olish. Bu to'plamlar dastlab pasterlangan substratlardan olinadi. Bacillus subtilis ning yig'ma to'plami uchun maydalab qirqilgan pichan ustiga 40°C gacha isitilgan suv quyib, keyin 10-15 minut qaynatiladi. 2-3 kundan keyin substrat yuzasida akatsiya hidi anqib turadigan kulrang-oq plyonka hosil bo'ladi. U B. subtilis tayyoqchalaridan tashkil topgan bo'ladi.

Moy kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma to'plamini olish. Buning uchun bo'r (mel) qo'shilgan sterillangan kartoshkali muhitdan foydalaniladi. Muhitni probirkalarga 10 ml dan yoki 100 ml li kolbachalarga 80 ml dan quyib oquvchan bug'da yoki avtoklavda 0,05 MPa da sterillanadi. Ekishdan oldin muhitni albatta 20-30 minut qaynatib, keyin tezda suv bilan sovutiladi. Boshlang'ich materialni sterillangan suvda ishqalab, probirkalarga 1-2 ml dan yoki kolbachalarga 8-10 ml dan ekiladi. Shuningdek, boshlang'ich materialni shakarining 10 % li eritmasi to'latilgan va tubida bo'r cho'kmasi bo'lgan ingichka uzun bo'yinli kolbaga ham ekish mumkin. Muhitga kichik bo'lak aynigan pishloq qo'shiladi.

Moy kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma to'plamini olishning oddiy (sodda) usuli quyidagicha: uzun bo'yinli kolbaga po'chog'i archilmagan kartoshkadan bir necha bo'lak solib, ustiga suv quyiladi va 80°C da 10 minut pasterlanadi, shundan keyin termostatga 37°C issiqqa qo'yiladi. 1-2 kundan keyin mikroskopda qaralganda suyuqlikda spora hosil qiluvchi juda ko'p tayoqchalar borligini ko'rish mumkin.

Sirka kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma to'plamini olish. Buning uchun 50 ml hajmli konussimon kolbaga ozuqa muhiti - pasterlangan pivodan

yupqa qatlam qilib (1-1,5 sm) quyib, unga 1 ml 5% li sirka kislotasi qo'shiladi. Muhitga kislota qo'shish sirka kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning rivojlanishiga to'sqinlik qilmaydi, lekin begona mikrofloraning o'sishini cheklab qo'yadi. Kolba termostatga 25-30°C issiqqa qo'yiladi. 2-3 kundan keyin pivo yuzasida sirka kislota hosil qiluvchi bakteriyalar plyonkasi paydo bo'ladi. Spora hosil qilmaydigan bu bakteriyalar mayda tayoqchalardir, ular harakatchan yoki harakatlanmaydigan bo'ladi.

Sirka kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma to'plami solodli yoki karamli muhitda ularga 4 hajm % etil spirti va 20 birlik/ml monomitsin antibiotigi qo'shib, bu muhitlarga achigan vino, pivo yoki boshqa materiallarni ekish yo'li bilan olinadi.

Chirituvchi bakteriyalarning elektiv to'plamini olish.

Protey (*Proteus vulgaris*) va kartoshka tayoqchasi (*Bac. m esen tericu s*) chirituvchi bakteriyalarning tipik vakillari hisoblanadi. Bularning yig'ma to'plamini olish uchun ichida sterillangan GPB bo'lgan probirkaga ozgina tuproq solinadi. Probirkaning og'zi paxta tiqin bilan berkitiladi. Bunda keyinchalik oqsilning ayrim parchalanish mahsulotlari (NH_3 va H_2S) hosil bo'lishini aniqlash maqsadida tiqin tagiga nam lakmus qog'oz va qo'rg'oshin atsetat shimdirilgan filtr qog'oz lentasi bir uchi bilan qistirib qo'yiladi. Qog'ozlar probirka devoriga tegmasdan erkin osilib turishi kerak. Tarkibidagi ammiak va vodorod sulfid uchib ketmasligi uchun probirkaning paxta tiqini ustiga sellofan o'rab yoki rezina qalpoqcha kiydirib qo'yiladi. Keyin probirka termostatda 30°C issiqda 2-3 kun saqlanadi. Vaqt o'tishi bilan lakmus qog'ozning ko'karishi ammiak ajralayotganidan dalolat beradi. Agar vodorod sulfid ajralsa, qo'rg'oshin atsetat bilan namlangan qog'oz qorayadi (yoki qo'ng'ir rangga kiradi), chunki bunda qo'rg'oshin atsetat qora rangli qo'rg'oshin sulfatga aylanadi. Mikroskopda ko'rish uchun "ezilgan tomchi" preparati tayyorlanadi va tayoqchalarning harakatlanishi o'rganiladi, shuningdek, fiksirlangan preparat tayyorlanadi, "oddiy" usulda bo'yaladi va hujayralarning shakli hamda sporalar bor-yo'qligi o'rganiladi.

Proteylarning yig'ma to'plamini olish.

Protey nihoyatda harakatchanligi bilan xarakterlanadi. U mayda tayoqcha shaklida bo'lib, spora hosil qilmaydi, Gram usulida bo'yalmaydi. Ayrim xillari toksin ishlab chiqaradi. Bu bakteriyalar ko'paygan mahsulot iste'mol qilinsa, zaharlanish mumkin.

Yig'ma to'plam olish uchun qiya go'sht-pepton agarli probirkaga bug'doy donidek aynigan go'sht tashlab, og'zi paxta tiqin bilan berkitiladi va termostatda 30°C issiqda 1-2 kun saqlanadi. Protey aktiv harakatlanadigan bo'lgani uchun boshqalardan oldin qiya agar yuzasida chirmashib o'sib, uning yuqori qismida o'ziga xos och havorang-kulrang mayin g'ubor hosil qiladi. Ana shu g'ubor (nalyot) ning eng yuqori qismidan olib "ezilgan tomchi" preparati tayyorlanadi. Uni mikroskopda ko'rilsa hujayralarning shakli va harakatchanligini qayd etish mumkin.

Kartoshka tayoqchasining yig'ma to'plamini olish.

Bacillus mesentericus spora hosil qiluvchi harakatchan tayoqcha. Uning yig'ma to'plamini olish sporalarning issiqqa chidamliligiga va ishlatiladigan ozuqa muhitining o'ziga xosligiga (spetsifikligiga) bog'liq. 1 sm qalinlikdagi 1-2 bo'lak kartoshkani olib, hujayra shirasining kislotalarini neytrallash uchun har tomoni bo'r bilan ishqalanadi. Keyin shu kartoshka bo'lakchalarini Petri likopchasiga qo'yiladi. So'ngra likopchani Kox apparatiga qo'yib, oquvchan bug'da 100°C da 10 minut qizdiriladi. Sovitilgandan keyin termostatga quyib, 100°C da 2—3 kun saqlanadi. Kartoshka bo'lakchalari ustida *B. mesentericus* jigar rang mayda yoki yirik burmali g'ubor shaklida o'sadi. G'uborni mikroskopda ko'riladi, "ezilgan tomchi" va oddiy usulda bo'yalgan preparat tayyorlanadi.

6-Laboratoriya mashg'uloti

Mavzu: 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 mm² ga teng bo'lib, har qaysisining maydoni 1/400 mm² bo'lgan 16 ta mayda kvadratga bo'lingan. Kameraning chuqurligi 0,1 mm ga teng.

Kichik (mayda) kvadratning hajmi 1/4000 mm³ yoki 1/4000000 ml, katta kvadratniki 16/4000=1/250 mm³ yoki 1/250000 ml ga teng. Katta kvadratlarning bir qismi vertikal, gorizontol 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 konsentratsiya ligidan 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

mi 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°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 sm² qilib chizilgan millimetr qog'ozga joylashtirilgan bo'ladi. Keyin suspenziya tomchisiga agar-agarning 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 kristallizatorida 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 (Σx) 600-1000 birlikka teng bo'lganda maksimal aniqlikka erishiladi.

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

$$\check{O}x = \pm \frac{\sqrt{\Sigma x}}{n}$$

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

$$x + 2\check{O}$$

P_{099} da ishonchli interval $+ 2,7 \check{O}$ 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:

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

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

K - suspenziyaning suyultirilganligi.

Mavzu: Bakteriyalar morfologiyasini o'rganish

Mikroorganizmlar sistematikasida qo'llanadigan belgilar

Har qanday mikroorganizm faqat sof kulturasida o'rganiladi. Sof kulturalarning morfologik-sitologik, kultural va fiziologik-biokimyoviy xossalari o'rganiladi. Ana shu xossalari asoslanib, mikroorganizmlarni tasniflash va taksonomik joylashuvini (taksonomik holatini) aniqlash mumkin.

Mikroorganizmlarni shakli va o'lchami, ularning bir-biriga nisbatan joylashuvi, Gram usulida bo'yalishi, spora va kapsulalar hosil qilishi, harakatchanligi, xivchinlarining joylashishi, hujayralarida ayrim qo'shilmalar hosil bo'lishi ularning morfologik-sitologik belgilaridir. Kultural belgilari – mikroorganizmlarning qattiq va suyuq ozuq muhitida o'sish hossalari. Fiziologik-biokimyoviy belgilarini o'rganishda ularning uglerod va azotning turli manbalariga munosabati, kislorodga talabi, o'sish temperatura chegaralari, sho'rga chidamliligi, safroga chidamliligi, antibiotiklarga sezgirligi, fermentativ testi aniqlanadi. SHuningdek, qo'shimcha belgilaridan serologik, fagochidamlilikni, hujayralar devorining kimyoviy tarkibini, DNKdagi alohida nukleotidlarning miqdorini ham hisobga olish tavsiya etiladi.

Binobarin, mikroorganizmlarning sistematik holatini aniqlash uzoq vaqt kuzatiladigan, juda ko'p o'ziga hos tadqiqot ishlari olib boriladigan va biokimyoviy analizlar o'tkaziladigan murakkab vazifadir.

Mazkur qo'llanmada mikroorganizmlarni tasniflashda ko'p foydalaniladigan belgilari bayon etilgan. Ularni o'quv laboratoriyalarida va sanoatdagi mikrobiologik laboratoriyalarida va sanoatdagi mikrobiologik laboratoriyalarida bemalol bajarish mumkin.

Bakteriyalarning morfologik belgilari

Ko'pchilik bir xujayrali mikroorganizmlar bakteriyalar guruhiga kiradi. Ularning shakli, yirik-maydaligi va ulardagi moddalar almashinuvi turlichadir. Bakteriyalar - prokariotlardir, ularning ajralib turadigan yadrosi bo'lmaydi. YAdro moddasida va hujayradagi boshqa organellalarda sitoplazmadan ajratib turadigan maxsus membranalar yo'q. Tashqi ko'rinishiga qarab bakteriyalar uchta asosiy guruhga bo'linadi: sharsimon, tayoqchasimon yoki silindrsimon va buralgan. O'z navbatida ular ham shakli bo'yicha xar xil turlarga bo'linadi. YAna bakteriyalarning bir hujayrali va ko'p hujayrali ipsimon, shoxlangan hamda yon o'simtali turlari ham mavjud. So'nggi yillarda turli substratlardan yana halqasimon, yulduzsimon, chuvalchangsimon va boshqa shakllari ham ajratib olingan.

Bakteriyalar o'lchami. Kokk shaklli bakteriyalarning o'rtacha diametri 1-25 mkm ga teng, tayoqchasimon bakteriyalarning eni o'rtacha 0,5-1 mkm, uzunligi 1-5 mkm, ba'zan 8-12 mkm dir. Ammo juda maydalari – pigmeylar (0,12-0,25 mkm) va juda yirik bakteriyalar (500 mkm) ham bor. Vibrionlarning o'lchami 1,5-3 x 0,5; spirillalarniki - 2-60 x 0,2-1,7; spiroxetalarniki -5-500 x 0,2-0,75 mkm ni tashkil qiladi.

Bakteriyalar sporasi va ularni bo'yash usullari

Ba'zi tayoqchasimon bakteriyalarda - batsillalarda spora hosil bo'ladi. Spora tinch xolatidagi hujayradir. Uning qobig'i vegetativ hujayraning qobig'iga nisbatan ancha qalin va pishiq bo'ladi, tarkibida suv kam bo'lib, kalsiy va dipikolin kislota mavjudligi sababli tashqi muhit ta'siriga ancha chidamliroqdir. Bakteriyalar hujayrasida faqat bitta spora hosil bo'ladi. Spora hosil qilish bakteriyalarning tashqi muhitga moslashish uchun kurash qobiliyatidir.

Sporalar bir qator morfologik, sitologik va fiziologik xossalari bilan vegetiv hujayralardan farq qiladi.

"Ezilgan" yoki "osilgan tomchi" preparatlaridagi tirik hujayralardagi sporalar yorug'likni sindirish ko'rsatkichi eng yuqori ekanligi bilan farq qiladi, shuning uchun ular mikroskopda (hujayralar ichida) yumaloq yoki oval shakldagi qoramtir yoki yaltiroq hosila shaklida ko'rinadi. Eski kulturalarda sporalar hujayradan tashqarida yumaloq yoki bir oz cho'ziq mayda yaltiroq tanachalarni eslatadi.

Bakteriyalarni tasniflash uchun ularning spora hosil qilish turini (batsilla, klostridiy yoki plektridiy), hujayrada sporasining joylashuvini (markazda, terminal yoki qutiblarda, subterminal yoki ekssentral), erkin sporalar shaklini (yumaloq,aval, silindrsimon) va o'lchamni aniqlash zarur. Bular ikki yoki uch kunlik kulturalar hujayrasidan aniqlanadi.

Sporalar maxsus murakkab usullarda bo'yaladi, chunki asosiy bo'yoqlar ularning ko'p qavatli qobig'idan qiyin o'tadi. Sporalar qobig'ini yumshatish uchun surtmalar kuchli bo'yoqlarda va isitib turib bo'yaladi, keyin sitoplazmasi rangsizlantiriladi va qo'shimcha ravishda kontrast rangga bo'yaladi.

Peshkov usulida bo'yash. Bakteriyalarning 2-3 kunlik kulturasidan tayyorlangan yupqa surtma gorelka alangasida yoki 5 qism 40 foizli shakllin bilan 95 qism 96 foizli etanolning aralashmasida 15 minut davomida fiksatsiyalanadi. Keyin ustiga Lyoffler bo'yicha metilen ko'ki quyib, buyum oynasini gorelka alangasi ustida tutib turiladi. Bo'yash 10-20 sekund davom etadi. Bo'yovchi suyuqlik bug'langan sari yangisi oz-ozdan qo'shib turiladi. Keyin preparatni yaxshilab yuvib, 30 sekund davomida neytral qizilning 0,5% li suvli eritmasida qo'shimcha bo'yaladi. Preparatni yana suv bilan yaxshilab yuvib, quritiladi va immersion ob'ektivda kuzatiladi. Bunda sporalar havorang yoki ko'k rangda, yosh sporalar to'q-qoramtir, vegetativ hujayralar sitoplazmasi pushti yoki qizil rangda bo'lib ko'rinadi.

Zlatogorov usulida bo'yash. Bunda spora hosil qiluvchi bakteriyalardan tayyorlangan surtma ochiq havoda quritiladi. Sporalar fiksatsiyalash va qobig'ini yumshatish uchun surtma 10 marta gorelka alangasidan o'tkaziladi. So'ng preparat ustiga filtr qog'oz lentachasini yopib, ustiga Silning karbolli fuksini quyiladi, keyin bug' hosil bo'lguncha (lekin qaynamasligi kerak) 8-10 minut davomida isitiladi. Bunda bo'yovchi modda bug'lanib ketishi, lekin qog'oz qurib qolmasligi muhim ahamiyatga ega. SHuning uchun davriy ravishda bo'yovchi moddadan qo'shib turish kerak. So'ngra qog'ozni olib tashlab, preparat 6-10 sekund davomida sulfat kislotaning 5 foizli eritmasi bilan rangsizlantiriladi va suv bilan yuviladi. Natijada

vegetativ hujayralar rangsizlanadi, keyin ular Lyofflarning metilen ko'ki bilan 2 minut davomida qo'shimcha bo'yaladi. Surtmani yana qaytadan yuvib, filtr qog'oz bilan quritiladi va mikroskopning immersion ob'ektivida kuzatiladi. Preparat tayyorlashda bo'yash ishlari to'g'ri bajarilsa, sporelar och qizil rangga kiradi va sitoplazmaning havorang fonida aniq ko'rinib turadi.

Kapsulalarni bo'yash

Uglevodlarga boy bo'lgan va azot kam bo'lgan muhitda ayrim bakteriyalar o'sayotganda shilimshiq kapsula hosil qiladi. Bunday bakteriyalarda kapsula mavjudligi ularning tur belgisi bo'lib, tashxis ahamiyatga ega. Har xil turdagi bakteriyalarning kapsulasi o'lchami (yirik-maydaligi) va kimyoviy tarkibiga ko'ra bir-biridan farq qiladi, sust (kuchsiz) bo'yaladi va bo'yashda shakli oson o'zgaradi. Kapsulalarni aniqlash uchun negativ kontrastlash usuli, Olt va Mixin usullari qo'llanadi.

Olt usuli. Bunda surtma safranining 2-3 foizli eritmasi bilan bo'yaladi. Bo'yovchi eritma bevosita ishlatishdan oldin tayyorlanadi. Buning uchun bo'yoq moddani issiq suvda eritib, keyin filtrlanadi. Surtma bir oz isitib turib, 1-3 minut davomida bo'yaladi va tezda suv bilan yuviladi. Preparat quritilmaydi, unda suv bo'lishi kerak. Keyin ustiga qoplag'ich oyna yopib, mikroskopning immersion ob'ektivida ko'riladi. Bunda yorug'lik nuri suv qatlamidan o'tib, kapsula va mikroob hujayrasining tanasida nur sinishining farqini ko'paytiradi. Mikroskopda qaralganda, mikroob hujayralari tanasi qizil rangga, kapsulalar sariq rangga bo'yalgani yaqqol ko'rinadi.

Mixin usuli. Fiksatsiyalangan surtma isitib turib, 2-3 minut davomida Lyofflarning metilen ko'ki (yaxshisi eski eritma) bilan bo'yaladi. Keyin tezda suv bilan yuvib quritiladi. Mikroskopda qaralganda mikroob hujayralarining tanasi qoramtir, kapsulalar och-pushti rangda ko'rinadi.

Bakteriyalarning harakatchanligi o'rganish va xivchinlarini bo'yash

Bakteriyalar orasida harakatlanadigan va harakatlanmaydigan turlari mavjud, Ko'pincha, bakteriyalar xivchinlari yordamida harakatlanadi. Faqat spiroxetalar tanasini bukib harakatlanadi. Xivchinlar sitoplazmadan ip shaklida o'sib chiqqan o'simta bo'lib, yo'g'onligi 0,02-0,05 mkm ga teng, ammo hujayraga nisbatan ancha uzun, ba'zan 10 va undan ham ko'proq marta uzun bo'ladi. Xivchinlarning joylashuvi va soni turli bakteriyalarda har xildir (7-rasm).

Bakteriyalarning harakatlanishini "muallaq" yoki "osilgan tomchi" preparatida kuzatish qulay. Buning uchun bulon yoki agarda 6-12-18 soat davomida o'stirilgan yosh kulturalardan foydalaniladi. Mikroskopda qaraganda hujayralar har xil yo'nalishda va turlicha tezlikda harakatlanayotgani yaxshi ko'rinadi. Hujayralarning mustaqil harakatidan farq qilib, muallaq zarrachalar va harakatlanmaydigan hujayralarning broun harakati mavjud bo'lib, u bir joyda tartibsiz tebranishdan iborat.

Peshkov modifikatsiyasi bo'yicha Lyoffler usulida bo'yash. Bunda bakteriyalar kulturasi 2-3 kun davomida har kuni tarkibida 1,5 foizgacha agar bo'lgan qattiq yoki suyuq muhitga ekiladi. Hujayralar ehtiyotlik bilan ilmoqda

olib, ichiga sterillangan suv quyilgan, harorati kultura o'stirilgan muhitniki bilan bir hil bo'lgan probirkaga solinadi. Hosil bo'lgan suspenziya tomchisi mikroskopda qaralganda, hujayralarning serharakatligiga va suspenziyaning zichligi ko'rish maydonida 5-10 ta hujayrani tashkil etishga ishonch hosil qilinadi. Surtma tayyorlashdan oldin buyum oyna 3-4 marta gorelka alangasi ustidan o'tkaziladi, keyin sovitilib ustiga bakteriya hujayralari suspenziyasidan paster pipetkasida yoki ilmoqda 3-4 tomchi tomiziladi. Tomchilar buyum shishasi ustida yoyilib ketib, tezda qurishi kerak. Agar uzoq vaqtda qurisa, ko'pincha bakteriyalarning xivchinlari tushib ketadi. Quritilgan surtma ustiga yumshatkich (protrava) quyiladi, isitmasdan 15 minut davomida saqlanadi, keyin distillangan suv bilan yuviladi. So'ng preparat 5 minut davomida Silning suvga aralashtirilgan (1:1) fuksini bilan bo'yaladi. Bunda surtma bo'yoqqa botirib qo'yiladi. Keyin suv bilan yaxshilab yuvib, quritiladi va mikroskopning immersion ob'ektivida qaraladi. Bunda bakteriyalar xivchinining joylashuviga, ularning soniga va uzunligiga e'tibor beriladi.

Hujayradagi kiritmalarni bo'yash

Glikogenni bo'yash. Mikroblar hujayrasi sitoplazmasida ko'pincha hayvon kraxmali - glikogen uchraydi. U polisaxarid hisoblanadi. Bir tomchi kulturaga bir tomchi Lyugol eritmasi tomizib, uning borligini bilish mumkin. Bunda glikogen Lyugol eritmasi bilan birikib, qizil-qo'ng'ir rangga kiradi. Agar muhitda etarli miqdorda uglevodlar bo'lsa, glikogen to'planadi.

Granulyozani bo'yash. Granulyoza – kraxmalga o'xshagan polisaxarid. Hujayralar spora hosil qilishi oldidan granulyoza miqdori ko'p bo'ladi. Glikogen singari, granulyoza ham Lyugol eritmasidan ta'sirchan bo'ladi. Uning ta'sirida qoramtir rangga kiradi. YOg'larni bijg'ituvchi bakteriyalar tarkibida granulyoza ko'p miqdorda bo'ladi. Kartoshkali muhitda o'stirilgan yog'larni bijg'ituvchi batsillalar kulturasiidan bir tomchi olib, tarkibidagi granulyozani aniqlash uchun ustiga bir tomchi Lyugol eritmasi tomiziladi va qoplovchi oyna bilan yopiladi. Mikroskopning immersion sistemasida ko'rilgan, ko'k rangga bo'yalgan urchuqsimon hujayralari ko'rinadi. Bunday hujayralarning bir uchida bo'yalmagan sporalari joylashgan bo'ladi.

Mashg'ulot o'tkazishdan maqsad. Agarli muhitda o'sgan bakteriyalar koloniyasini kattaligini, cheti va yon tomondan ko'rinishini o'rganish va ularga ta'rif berish; bakteriya preparatini tayyorlash, hujayra shaklini, harakatchanligini, sporasi borligini aniqlash.

Asbob va uskunalari: biologik mikroskop, spirt lampasi yoki gaz gorelkasi, buyum oynasi, bakterial ilmoq, bo'yoqlar, suvli idish, bakteriya koloniyasi bor Petri likopchasi.

Laboratoriya ishini bajarish usuli: 1. Quyuq ozuqa muhitli Petri likobchasida o'stirilgan bakteriyalar koloniyasini o'rganish va ta'rif berish; natijalarni 1-jadvalga yozib qo'yish.

Bakteriyalarning qattiq muhitda o'sishi. Mikroorganizmlarni tasniflash maqsadida Petri likopchasidagi quyuq muhitga va probirkadagi qiya agarga toza

kultura ekiladi. Petri likopchasida bakteriyalar yuzada, chuqurda va tubida o‘sayotgani farq qilinadi.

3-jadval

Bakteriyalar koloniyasining kultural belgilari

Aniqlanadigan koloniya belgilari	Koloniyalar tartib raqami				
	1	2	3	4	5
Kattaligi					
Rangi					
Tuzilishi					
Qirg‘oqlari					
YUzasi					
Tiniqligi					
Strukturasi					
YOnidan ko‘rinishi					
Konsistensiyasi					

Yuzada bir-biridan nari o‘sayotgan koloniyalar o‘rganiladi, ta’riflanadi va quyidagi belgilari aniqlanadi:

kattaligi (diametr) – millimetrli lineykalarda o‘lchanadi: maydalari – 1...2 mm; o‘rtanchasi - 2...4mm; yiriklari – 4mm va undan katta; juda maydalari, nuqtalari, katta nuqtalari – 1 mm dan kichik;

koloniya va koloniya osti substratining rangi (oqdan qoragacha) - oq, sariq, limon rang, to‘q sariq, qizil;

shakli – dumaloq, oval va h.zo. bo‘ladi (1-rasm);

koloniyalar qirg‘og‘i – kerak bo‘lsa lupa yordamida ko‘riladi (2-rasm);

yuzasi – silliq, donador, bujmaygan, do‘ngli, xira, yaltiroq, nam, quruq va b.q.bo‘ladi;

tiniqligi – shaffof, yarim shaffof, shaffof emas bo‘ladi;

koloniya strukturasi – bir tekis, mayda donador, tolali bo‘ladi;

yonidan ko‘rinishi – bukilgan, tomchisimon, tekis, do‘ngli, botiq bo‘ladi (3-rasm);

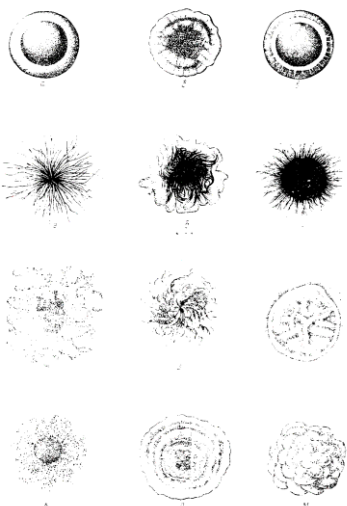
konsistensiyasi (uni bakterial ilmoq yordamida aniqlanadi) – quyuoq, yumshoq, shilmshiq, cho‘ziluvchan, xamirsimon va b.q. bo‘ladi.

Tashqi ko‘rinishidan bitta belgisi bilan ham ajralib turadigan koloniyalarni har xil deb qarash kerak. Har bir turdagi bakteriya o‘ziga xos belgilarga ega koloniyalardan iborat bo‘ladi, shuning uchun Petri likopchasidagi koloniyalar soniga qarab tekshirilayotgan oziq-ovqat mahsulotini qandayligiga baho berish mumkin.

2. Bakteriyalar shaklini va spora hosil qilishini aniqlash. Buning uchun bakteriya preparati tayyorlanadi, oddiy bo‘yaladi va uni mikroskop ostida ko‘riladi. Natijalarni 2- jadvalga yozib qo‘yiladi va sxematik rasmi chiziladi.

Bakteriya hujayrasining shakli va spora hosil bo'lishi

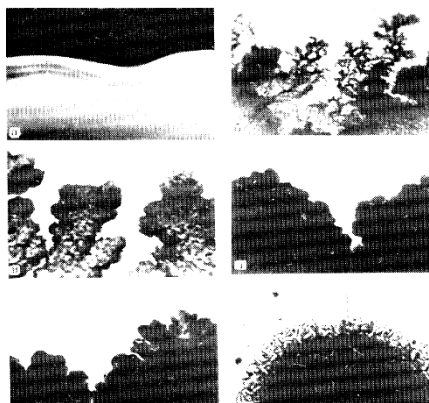
Koloniya tartib raqami	Hujayraning shakli	Hujayraning o'zaro joylashishi	Spora hosil bo'lishi



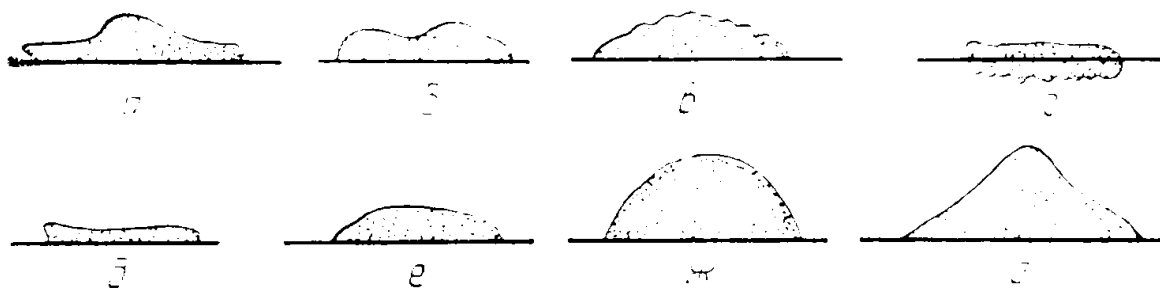
7-rasm. Bakteriya koloniyalarining shakli:

a - yumaloq; *b* - yumaloq, qirg'oqlari festonli; *v* - yumaloq, qirg'oqlari dolg'achali; *g* va *d* - rizoidli; *e* - yumaloq, qirg'oqlari rizoidli; *j* - amyobasimon; *z* - ipsimon; *i* - burmali; *k* - noto'g'ri; *l* - konsentrik; *m* - murakkab

8-rasm Mikroblar qirg'og'i



koloniyalarining



9-rasm Koloniyalarning yon tomonidan ko'rinishi:

a - bukiq, qayrilgan; *b* - kratersimon; *v* - g'adir-budir; *g* - agarga o'sib kirgan; *d* - tekis; *e* - bo'rtma; *j* - tomchisimon; *z* - konussimon

Nazorat savollari

1. Bakteriyalar hujayrasining shakli qanday bo'ladi?
2. Bakteriyalar o'lchami qanday?
3. Qanday bakteriyalar spora hosil qiladi?

4. Bakteriyaning spora hosil qilishi va ularni bo'yash usullari qanday?
5. Bakteriyada spora nima uchun hosil bo'ladi?
6. Bakteriyalar qanday harakatlanadi?
7. Bakteriyalarning harakatchanligini qanday usulda o'rganiladi?
8. Har xil sondagi xivchinli bakteriyalar qanday nomlandi?
9. Kapsulalar qanday bo'yaladi?

8-Laboratoriya mashguloti

Mavzu: Bakteriyalarni Gram usulida bo'yash.

Mikrobiologiya amaliyotida bakteriya hujayralarini Gram bo'yicha differensial bo'yash usuli keng tarqalgandir.

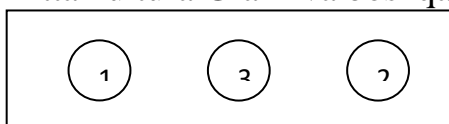
Bu usulda bo'yash 1884 yili daniyalik olim X.Gram tomonidan kiritilgan va o'sha davrdan boshlab diagnostika belgisi sifatida ishlatiladi. Bakteriyalar grammusbat (Gram +) grammanfiy (Gram -) deb farqlanadi. Grammusbat bakteriyalarni gensianviolet bo'yog'i bilan bo'yab, ba'zi moddalar bilan ishlov berib (protravlivanie), so'ngra 96^o etanol bilan ishlov berilsa binafsha rang saqlanib qoladi. Grammanfiy bakteriyalarda esa, gensianviolet bilan bo'yalsa ham, etanol ta'sir etganda rangsizlanib qoladi. Ularni qo'shimcha birorta bo'yoq masalan, fuksin bilan bo'yash mumkin. SHunday qilib, Gram usulida bo'yashning bosqichlarini amalga oshirgandan so'ng, grammusbat bakteriyalar binafsha rangga, grammanfiy esa-qizil rangga bo'yaladi.

Qator mualliflarning tadqiqotlari shuni ko'rsatadiki, Gram⁺ va Gram⁻ bakteriyalar faqatgina bo'yashda farqlanmasdan, ba'zi antibiotiklarni (pensillinga) ta'siriga, sulfamid preparatlarini, lizotsimni, proteolitik fermentlarni va boshqalarni ta'sirlariga bo'lgan sezgirliklariga qarab ham farqlanadi. Yana aniqlanishicha Gram⁺ bakteriyalar 1% NaOH da erimaydi. Gram⁻ lar esa to'la erib ketadi.

Hozirgi vaqtda ko'pgina mualliflar Gram bo'yicha bo'yalgan bakteriyalarni bu hususiyatlarini hujayra devorini molekulyar qurilishi va kimyoviy tuzilishiga bog'lashmoqda.

Odatda Gram usulida bo'yaladigan hujayralar yosh, ko'pincha bir sutkalik kulturalar bo'ladi, chunki bo'yoqni tutib qolish ma'lum darajada bakteriyani fiziologiya holatiga ham bog'liq bo'ladi.

Gram usulida bo'yash quyidagicha bo'ladi. Moysizlantirilgan buyum oynasida 3 ta surtma tayyorlanadi-markazda tekshiriladigan kultura, chapda va o'ngda-nazorat kulturalar. Bitta kultura Gram⁺ va boshqasi Gram⁻ bo'lishi kerak.



Gram usulida bo'yash sxemasi

1. Achitqilar- *Saccharomyces cerevisiae* (Grammusbat);
2. *Pseudomonas melochlora* (Grammanfiy) ;
3. Tadqiqot qilinadigan kultura (Gram X)

Tadqiqot qilinadigan kultura sifatida Petri likopchalarida o‘stirilgan havo mikroorganizmlarni ishlatish mumkin. Surtmalarni juda ham yupqa qilib tayyorlash kerakki, ular oyna yuzasida bir tekis tarqalgan bo‘lsinlar. Preparat havoda quritiladi, alangada fiksirlanadi va sovitiladi. So‘ngra ikki minut davomida gensianviolet bilan bo‘yaladi. Buning uchun surtmaga gensianviolet bo‘yog‘i shimdirilgan qog‘oz yopiladi. Buning uchun surtmaga gensianviolet bo‘yog‘i shimdirilgan qog‘oz yopiladi. Bo‘yash vaqti tugagandan so‘ng bo‘yoqli qog‘oz olib tashlanadi va suv bilan yuvmasdan yodni kaliy yodli suvdagi eritmasi bilan Lyugol eritmasi bilan ikki minut davomida ishlov beriladi. Lyugol eritmasi tashlanib, surtma suv bilan yuviladi va filtr qog‘ozi bilan quritiladi. So‘ngra esa ma’suliyatli ish qilinadi: preparat qisqa muddat 96 gradusli etanol bilan 30 sekunddan to 1 minutgacha rangsizlantiriladi. Tezda suv bilan yuviladi va qaytadan 2 minut davomida fuksin bo‘yog‘i bilan bo‘yaladi, suv bilan yuvib tashlangandan so‘ng filtr qog‘ozi bilan quritiladi va immersiya tizimida mikroskopda ko‘rinadi. Agar preparat to‘g‘ri bo‘yalgan bo‘lsa grammusbat bakteriyalar(Gram +) binafsha, grammanfiylar(Gram -) qizil rangda bo‘yaladi.

Bakteriyalarni 1% ga nisbatan munosabatlarini buyum oynasida tekshirsa ham bo‘ladi. Buyum oynasiga uchta ishqor tomchisi tomiziladi. Har bir tomchiga ilmoq bilan kontrol va tekshirilayotgan bakteriya biomassasidan ayrim-ayrim solinadi. Gram + bakteriyalar biomassasi emulsiyalanmasdan parcha-parcha bo‘lib qolsa, Gram – larniki esa to‘liq erib ketadi, eritma tiniqlashadi.

Nazorat savollari

1. Bakteriyalar hujayra devori qanday moddadan tashkil topgan.
2. Bakteriyalar grammusbat (Gram +) grammanfiy (Gram -) deb farqlanish sababini tushuntiring.
3. Gram usulida bo‘yash qanday bosqichlarda amalga oshiriladi.
4. Bakteriyalar bo‘yalganda grammusbat bakteriyalar binafsha rangga, grammanfiy esa-qizil rangga bo‘yalish sababini tushuntiring.

9-Laboratoriya mashg‘uloti

Mavzu: MOG‘OR ZAMBURUG‘LARI MORFOLOGIYASINI O‘RGANISH

Mashg‘ulot o‘tkazishdan maqsad. Agarli muhitda o‘sgan mog‘or zamburug‘larini ko‘rinishini o‘rganish va kultural belgilariga ta’rif berish; mog‘or zamburug‘i preparatini tayyorlash. Ularning qaysi turkumga taaluqligini aniqlash.

Nazariy qism

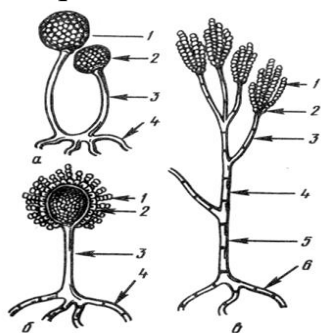
Zamburug‘lar (mikromitsetlar) eukariot organizmlarning katta gruppasini o‘z ichiga oladi. Eng sodda zamburug‘larning vegetativ tanasi qobiqsiz bitta hujayradan iborat bo‘ladi. Mitseliyli turlarining ko‘pchiligida bu hujayra shoxlanuvchi ingichka ipchalar - *gifalar* chigalidan iborat bo‘lib, *mitseliy* hosil qiladi.

Mog‘or zamburug‘lari xlorofilsiz mikroorganizmlardir. SHuning uchun ular faqat organik birikmalar uglerodidan foydalanib oziqlanadi, ya’ni ular

geterotroflardir. Aerob zamburug‘lar turli substratlar yuzasida, faqat kislorod mavjudligida yashaydi. Hujayralarida differensiyalangan yadrosi bor. Mog‘or zamburug‘lari oziqa muhitiga talabchan emas, ya‘ni muhit tanlamaydi, past temperaturaga yaxshi chidaydi, muzlatkich kameralarda ham yashab, ko‘paya oladi. Ular orasida saprofitlar ham, parazitlar ham uchraydi. Zamburug‘lar olti sinfga bo‘linadi: xitridiylar (*Chytridiomycetes*), oomitsetlar (*Oomycetes*), zigomitsetlar (*Zygomycetes*) - bular tuban zamburug‘lardir; askomitsetlar (*Ascomycetes*), bazidiomitsetlar (*Bazidiomycetes*) va deyteromitsetlar - takomillashmagan zamburug‘lar (*Deuteromycetes, Fungi imperfecti*)dir; bular - yuksak zamburug‘lardir.

Morfologik belgilari. Mitseliy gifalarning haddan tashqari shoxlangan yopiq sistemasi bo‘lib, ichida ko‘p yadroli sitoplazmasi bor. Mog‘or hujayrasi septalar (to‘siqlar) bilan bo‘lishi mumkin va hujayra septalanmagan bo‘lishi mumkin. Biroq septalar gifalarni alohida hujayralarga bo‘lib yubormaydi, chunki markaziy teshigi bo‘lib, sitoplazma bilan yadro shu teshik orqali erkin o‘tib turadi. SHuning uchun zamburug‘larning barchasi senotsit (bir hujayrali) organizmlar hisoblanadi. Mitseliysida septalar bo‘lmagan zamburug‘lar tuban, septalar borlari yuksak zamburug‘larga kiradi (1-rasm).

Vegetativ mitseliy hosil qiluvchi gifalarining diametri 5 dan 50 mkm gacha va undan katta bo‘ladi. Gifalari juda uzun bo‘lib, ko‘pincha ko‘zga ko‘ri-nadi. Mitseliysi ozuq muhitida o‘sganda yuzada (ochiq) va substratga botib o‘sgan holda, uning ichida o‘sadigan bo‘ladi. Ba‘zan mitseliy ildizga o‘xshash o‘simtalar-rizoidlar hosil qiladi. U ana shu o‘simtalari yordamida substratga yopishib olib, undan oziq moddalarni so‘rib oladi. Mitseliy gifalari uchi hisobiga o‘sadi. Ular uzunlashgan sari eski (qarigan) qismlarida vakuolalar hosil bo‘ladi, aktiv ravishda ozuq moddalar shimmaydi va asta-sekin o‘z-o‘zidan erib ketadi.



1-rasm. Tuziliش схемаси:

a - мукор (зигомицетлар синфи):

1 - эндоспоралар; 2 - спорангий (мевали тана);
3 - спорангий ташувчи; 4 - мицелий;

б - аспергилл (дейтеромицетлар синфи):

1 - конидиялар (экзоспоралар); 2 - стеригмалар;
3 - конидия ташувчи; 4 - мицелий;

в - пеницилл (дейтеромицетлар синфи):

1 - конидиялар; 2 - фиалидлар;
3 - метула; 4 - шох;

5 - конидия ташувчи; 6 - мицелий.

Asbob va uskunalar: biologik mikroskop, spirt lampasi yoki gaz gorelkası, buyum oynasi, yopqich oyna, ignalar, bo‘yoqlar, suvli idish, mog‘or zamburug‘i bor Petri likopchasi, lupa.

Ishning borishi:

Petri likopchasidagi quyuq oziqa muxitiga zamburug‘ mitseliysi yoki sporasi (konidiyasi) shtrix usulda yoki sanchib ekiladi. 15-25 kun davomida har 2-3 kunda ko‘z bilan chamalab kuzatib boriladi. chamalab kuzatib boriladi. Har gal kuzatilganda: koloniyaning o‘lchami (yirik-maydaligi), shakli, zich yoki siyrakligi, tashqi chetining tuzilishi, o‘rtasining tuzilishi, yuzasi, koloniyalarning,

mitseliyning va ko'paytish organlarining rangi, substratning va koloniya tubining rangi, tomchi suyuqlik ajralishi aniqlanadi. Mitseliy hosil qiluvchi zamburug'lar quyuc muhitda yumaloq yoki yuzada keng tarqalgan, substrat ichiga o'sib kirmaydigan, pahmoq, ipsimon, o'rgimchak to'risimon, paxtaga o'xshagan yoki unli koloniyalar hosil qiladi. Ko'pchilik turlarining vegetativ mitseliysi bo'yalmagan. Faqat meva hosil qiluvchi mitse-liysi pigmentli bo'ladi. SHuning uchun yosh koloniyalari oq yoki och kulrang bo'ladi. Meva hosil qiluvchi organlari rivojlana borgan sari koloniyalar sariq, pushti, qizil, yashil, qora va hokazo rangga kiradi.

SHundan keyin mog'orning mitseliysi va ko'paytish organlari mikroskopda o'rganiladi. Bunda stereoskopik yoki oddiy mikroskopda o'rganish va koloniyalarni bevosita Petri likopchasining o'zidan ko'rish mumkin. Mikroskopda 80-200 marta kattalashtirib qarab, ochiq mitseliylar borligi, ularning xarakteri, xlamidosporalar va sklerotsiyalar hosil bo'lishi, sporangiyaband va konidiyabandlarning, boshchalari sporalar va konidiyalarning joylashuvi aniqlanadi. Koloniyaning cheti, pigmentlangan va bo'yalmagan qismlari chegarasi va o'rtasi kuzatiladi.

Mikroskopda ko'riladigan preparatlar qizdirib, so'ngra sovutilgan ikkita preparat oval ignada tayyorlanadi. Ignalarda mitseliyni meva hosil qiluvchi gifalari va yupqa oziqa muhiti bilan birga kichik bo'lakcha shaklida olib, yaxshilab yog'sizlantirilgan buyum oynasidagi 1:1 nisbatda olingan bir tomchi glitserin va etanol aralashmasiga qo'yiladi. Ehtiyotlik bilan, mitseliyning strukturasi buzib yubormasdan, gifalarni ninada to'g'rilab (tekislab), ustiga qoplagich oyna yopiladi va sekin bosiladi. Preparat dastlab 8x yoki 10x, keyin 40x ob'ektivda qaraladi. Meva hosil qiluvchi gifalarning tuzilishi, sporalar (konidiyalar)ning o'lchami, shakli va tuzilishi 600-800 marta kattalashtirib o'rganiladi. Zamburug'lar tirikligida har xil buyoqlar bilan bo'yaladi, biroq ularning konsentratsiyasi 0,5-1 foizdan oshmasligi kerak. Zamburug'lar hujayrasini kimyoviy o'rganish, hujayralari strukturasi, turli qo'shilmalarni aniqlash, yosh xususiyatlarini aniqlash, yadrolarni topishda achitqilarni o'rganishdagi usullar qo'llanadi.

O'rganilayotgan zamburug'ning avlodini va turini aniqlash uchun N.M.Pidoplichkoning "Griby-parazity kulturnyx rasteniy" (I va II tomi, Kiev: Naukova dumka, 1977), «Opredelitel gribov Ukrainy» (1-5 t., Kiev: Naukova dumka, 1972), «Opredelitel nizshix rasteniy» (L.I.Kursanov taxriri ostida, M., Nauka, 1954, 1956) aniqlagichlaridan foydalaniladi.

Nazorat savollari

1. Zamburug'larning tana tuzilishi qanday?
2. Zamburug'larning qaysi belgilari kultural belgi deyiladi?
3. Mog'or zamburug'i preparati qanday tayyorlanadi?
4. Zamburug'larda qanday turdagi sporalar bo'ladi?

10-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Mavzu: ACHITQILARNING MORFOLOGIYASINI O'RGANISH

Mashg'ulot o'tkazishdan maqsad. Agarli muhitda o'sgan achitqilarni ko'rinishini o'rganish va kultural belgilariga ta'rif berish; achitqi zamburug'i preparatini tayyorlash. Ularning qaysi turkumga taaluqligini aniqlash.

Nazariy qism

Achitqilar askomitsetlar - xaltali zamburug'lar (*ask-xalta*) sinfiga kiradi. Achitqilar bir hujayrali harakatsiz organizmlar bo'lib, tabiatda keng tarqalgan. Hozirda ularning taxminan 1500 turi mavjud. Ular tuproqda, o'simliklarda va tarkibida qand bor turli substratlarda uchraydilar.

Achitqilar qishloq xo'jaligi va sanoatda keng qo'llanadi. Ularning asosiy xususiyati spirtli bijg'ishni keltirish bo'lib, bunda qand etil spirti va karbonat angidridga aylanadi. Ozuqa achitqilaridan parranda va hayvonlar uchun vitamin va oqsilga boy em tayyorlanadi. Ayniqsa ular nonvoychilik va pivo sanoatida katta amaliy ahamiyatga ega.

Achitqilar zarar ham keltiradi, oziq-ovqatlarda rivojlanib, ularni aynitib, ta'mi va hidini buzadi.

Achitqi hujayralarining shakli va tuzilishi. *Ko'pchilik achitqilarning shakli yumaloq, tuxumsimon uzunchoq yoki ellipsga o'xshash bo'ladi. Silindrsimon va limonsimon shakldagilari kamroq uchraydi. Boshqacharoq shakldagi achitqilar ham bo'ladi: o'roqsimon, nayzasimon va uchburchak. Achitqi hujayralarining kattaligi 10-15 mkm ga, diametri esa 3-7 mkm ga teng. Ba'zilari 40 mkm gacha ham kattalashib ketishi mumkin. Achitqilarning shakli va kattaligi, o'sish sharoiti va yoshiga qarab o'zgarib turadi. YOsh hujayralarda doimiy shakl bo'lib, qarilarida shakl o'zgarib turadi.*

Achitqilar eukariot organizmlar tarkibiga kiradi (yadrosi ajralib chiqqan). Ularning hujayrasini tuzilishi mog'or zamburug'larinikiga o'xshaydi. Achitqilarning yadrosi ikki qatlamli membrana bilan qoplangan bo'lib, sitoplazmadan ajralib turadi.

Achitqi hujayrasining qobig'i asosan gemitsellyuloza va kam miqdorda oqsillar, lipidlar va xitindan tashkil topgan. Ba'zi achitqilarning qobig'i shilliqlanadi va natijada hujayralar bir-biri bilan yopishib qoladi. Ular suyuq muhitda rivojlanganda idishning tagiga pag'a-pag'a cho'kma bo'lib tushadi. Bunday achitqilar pag'a-pag'asimon, cho'kmaga tushmaydigan muallaq holda bo'ladigan achitqilar esa changsimon deb nomlanadilar. CHangsimon achitqilarning qobig'lari shilliqlanmaydi.

Asbob va uskunalar: biologik mikroskop, spirt lampasi yoki gaz gorelkasi, buyum oynasi, yopqich oyna, ignalar, bo'yoqlar, suvli idish, achitqi zamburug'i bor Petri likopchasi, lupa.

Ishning borishi:

Petri likopchasidagi quyuq oziqa muxitiga achitqi sporasi shtrix usulda ekiladi. 5-8 kun davomida har 8-10 soatda ko'z bilan chamalab kuzatib boriladi. chamalab kuzatib boriladi. Har gal kuzatilganda: koloniyaning o'lchami (yirik-maydaligi), shakli, zich yoki siyrakligi, tashqi chetining tuzilishi, o'rtasining tuzilishi, yuzasi, koloniyalarning, substratning va koloniya tubining rangi, tomchi suyuqlik ajralishi aniqlanadi.

SHundan keyin achitqilar mikroskopda o'rganiladi. Bunda stereoskopik yoki oddiy mikroskopda o'rganish va koloniyalarni bevosita Petri likopchasining o'zidan ko'rish mumkin. Mikroskopda 80-200 marta kattalashtirib qarab, vegetativ ko'payish organlari, ya'ni kurtaklari borligi, ularning hosil bo'lishi xarakteri va joylashuvi aniqlanadi.

Mikroskopda ko'riladigan preparatlar qizdirib, so'ngra sovutilgan ikkita preparat oval ignada tayyorlanadi. Ignalarda mitseliyni meva hosil qiluvchi gifalari va yupqa oziqa muhiti bilan birga kichik bo'lakcha shaklida olib, yaxshilab yog'sizlantirilgan buyum oynasidagi 1:1 nisbatda olingan bir tomchi glitserin va etanol aralashmasiga qo'yiladi. Ehtiyotlik bilan, ustiga qoplagich oyna yopiladi va sekin bosiladi. Preparat dastlab 8x yoki 10x, keyin 40x ob'ektivda qaraladi. Achitqilar tirikligida har xil buyoqlar bilan bo'yaladi, biroq ularning konsentratsiyasi 0,5-1 foizdan oshmasligi kerak. Achitqilar hujayrasini kimyoviy o'rganish, hujayralari strukturasi, turli qo'shilmalarni aniqlash, yosh xususiyatlarini aniqlash, yadrolarni topishda achitqilarni o'rganishdagi usullar qo'llanadi.

O'rganilayotgan achitqilarning avlodini va turini aniqlash uchun N.M.Pidoplichkoning "Грибы-паразиты культурных растений" (I va II tomi, Kiev: Naukova dumka, 1977), «Определитель грибов Украины» (1-5 t., Kiev: Naukova dumka, 1972), «Определитель низших растений» (L.I.Kursanov taxriri ostida, M., Nauka, 1954, 1956) aniqlagichlaridan foydalaniladi.

Nazorat savollari

1. Achitqilarning umumiy tavsifi va achitqi hujayrasining tuzilishi.
2. Pag'a-pag'asimon achitqilar va chansimonlarining farqini ko'rsating.
3. Achitqilarning ko'payish usullari qanday?
4. Qaysi achitqilar oqsil-karotinoidli preparatlar olishda qo'llaniladi?

11- LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Mavzu: ACHITQILARNING MORFOLOGIYASINI O'RGANISH

Mashg'ulot o'tkazishdan maqsad. Agarli muhitda o'sgan achitqilarni ko'rinishini o'rganish va kultural belgilariga ta'rif berish; achitqi zamburug'i preparatini tayyorlash. Ularning qaysi turkumga taaluqligini aniqlash.

Nazariy qism

Achitqilar askomitsetlar - xaltali zamburug'lar (*ask-xalta*) sinfiga kiradi. Achitqilar bir hujayrali harakatsiz organizmlar bo'lib, tabiatda keng tarqalgan. Hozirda ularning taxminan 1500 turi mavjud. Ular tuproqda, o'simliklarda va tarkibida qand bor turli substratlarda uchraydilar.

Achitqilar qishloq xo'jaligi va sanoatda keng qo'llanadi. Ularning asosiy xususiyati spirtli bijg'ishni keltirish bo'lib, bunda qand etil spirti va karbonat anhidridga aylanadi. Ozuqa achitqilaridan parranda va hayvonlar uchun vitamin va

oqsilga boy em tayyorlanadi. Ayniqsa ular nonvoychilik va pivo sanoatida katta amaliy ahamiyatga ega.

Achitqilar zarar ham keltiradi, oziq-ovqatlarda rivojlanib, ularni aynitib, ta'mi va hidini buzadi.

Achitqi hujayralarining shakli va tuzilishi. *Ko'pchilik achitqilarning shakli yumaloq, tuxumsimon uzunchoq yoki ellipsga o'xshash bo'ladi. Silindrsimon va limonsimon shakldagilari kamroq uchraydi. Boshqacharoq shakldagi achitqilar ham bo'ladi: o'roqsimon, nayzasimon va uchburchak. Achitqi hujayralarining kattaligi 10-15 mkm ga, diametri esa 3-7 mkm ga teng. Ba'zilari 40 mkm gacha ham kattalashib ketishi mumkin. Achitqilarning shakli va kattaligi, o'sish sharoiti va yoshiga qarab o'zgarib turadi. YOsh hujayralarda doimiy shakl bo'lib, qarilarida shakl o'zgarib turadi.*

Achitqilar eukariot organizmlar tarkibiga kiradi (yadrosi ajralib chiqqan). Ularning hujayrasini tuzilishi mog'or zamburug'larinikiga o'xshaydi. Achitqilarning yadrosi ikki qatlamli membrana bilan qoplangan bo'lib, sitoplazmadan ajralib turadi.

Achitqi hujayrasining qobig'i asosan gemitsellyuloza va kam miqdorda oqsillar, lipidlar va xitindan tashkil topgan. Ba'zi achitqilarning qobig'i shilliqlanadi va natijada hujayralar bir-biri bilan yopishib qoladi. Ular suyuq muhitda rivojlanganda idishning tagiga pag'a-pag'a cho'kma bo'lib tushadi. Bunday achitqilar pag'a-pag'asimon, cho'kmaga tushmaydigan muallaq holda bo'ladigan achitqilar esa changsimon deb nomlanadilar. CHangsimon achitqilarning qobig'lari shilliqlanmaydi.

Asbob va uskunalar: biologik mikroskop, spirt lampasi yoki gaz gorelkasi, buyum oynasi, yopqich oyna, ignalar, bo'yoqlar, suvli idish, achitqi zamburug'i bor Petri likopchasi, lupa.

Ishning borishi:

Petri likopchasidagi quyuq oziqa muxitiga achitqi sporasi shtrix usulda ekiladi. 5-8 kun davomida har 8-10 soatda ko'z bilan chamalab kuzatib boriladi. chamalab kuzatib boriladi. Har gal kuzatilganda: koloniyaning o'lchami (yirik-maydaligi), shakli, zich yoki siyrakligi, tashqi chetining tuzilishi, o'rtasining tuzilishi, yuzasi, koloniyalarning, substratning va koloniya tubining rangi, tomchi suyuqlik ajralishi aniqlanadi.

SHundan keyin achitqilar mikroskopda o'rganiladi. Bunda stereoskopik yoki oddiy mikroskopda o'rganish va koloniyalarni bevosita Petri likopchasining o'zidan ko'rish mumkin. Mikroskopda 80-200 marta kattalashtirib qarab, vegetativ ko'payish organlari, ya'ni kurtaklari borligi, ularning hosil bo'lishi xarakteri va joylashuvi aniqlanadi.

Mikroskopda ko'riladigan preparatlar qizdirib, so'ngra sovitilgan ikkita preparat oval ignada tayyorlanadi. Ignalarda mitseliyni meva hosil qiluvchi gifalari va yupqa oziqa muhiti bilan birga kichik bo'lakcha shaklida olib, yaxshilab yog'sizlantirilgan buyum oynasidagi 1:1 nisbatda olingan bir tomchi glitserin va etanol aralashmasiga qo'yiladi. Ehtiyotlik bilan, ustiga qoplagich oyna yopiladi va sekin bosiladi. Preparat dastlab 8x yoki 10x, keyin 40x ob'ektivda qaraladi.

Achitqilar tirikligida har xil buyoqlar bilan bo'yaladi, biroq ularning konsentratsiyasi 0,5-1 foizdan oshmasligi kerak. Achitqilar hujayrasini kimyoviy o'rganish, hujayralari strukturasi, turli qo'shilmalarni aniqlash, yosh xususiyatlarini aniqlash, yadrolarni topishda achitqilarni o'rganishdagi usullar qo'llanadi.

O'rganilayotgan achitqilarning avlodini va turini aniqlash uchun N.M.Pidoplichkoning "Грибы-паразиты культурных растений" (I va II tomi, Kiev: Naukova dumka, 1977), «Определитель грибов Украины» (1-5 t., Kiev: Naukova dumka, 1972), « Определитель низших растений» (L.I.Kursanov taxriri ostida, M., Nauka, 1954, 1956) aniqlagichlaridan foydalaniladi.

Nazorat savollari

1. Achitqilarning umumiy tavsifi va achitqi hujayrasining tuzilishi.
2. Pag'a-pag'asimon achitqilar va chansimonlarining farqini ko'rsating.
3. Achitqilarning ko'payish usullari qanday?
4. Qaysi achitqilar oqsil-karotinoidli preparatlar olishda qo'llaniladi?

12-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Mavzu: OZIQ-OVQAT MAHSULOTLARIDA ICHAK TAYOQCHALARI GURUHI BAKTERIYALARINI ANIQLASH

Ish uchun zarur bo'lgan jihoz va reaktivlar: termostat, Petri likopchasi, paxtali tampon va marlili salftokalar, pipetka, go'sht-peptonli agar, NaCl ning izotonik eritmasi.

Ishning bajarilishi

Umumiy mikroblar sonini aniqlash. Steril probirkalardagi 2 ml ning tamponni namlash uchun ishlatiladigan izotonik eritmasi ustiga yana 8 ml shu eritmada qo'shamiz. CHayindili tamponni shu eritma ichiga solib, probirkani chayqatib, chayib olamiz. SHu chayindidan 1 ml dan olib Petri likopchalariga yuqurib, ustidan 45 S li g'sht-peptonli agardan solamiz. Keyin Petri likopchalari termostatga 37 S ga 48 soatga yuquriladi. Bu vaqt ichigach ichib chiqilgan kolonniyalari soni sanaladi.

Stafilokokklarni aniqlash. Buning uchun sut-tuzli agarga to'g'ridan-to'g'ri tampondan mikroorganizmlar ekiladi. Agar chayindi marlili tamponda olingan bo'lsa, oldin chayindili eritma tayyorlanadi. Keyin bu eritmada 0,1 ml olib, agarli muhit ustiga quyiladi va shpatel yordamida bir tekis qilib qilib yoyiladi. Petri likopchalarini termostatga fqorida keltirilgan haroratga va muddatga qo'yib, o'sib chiqqan stafilokokk kolonniyalari sanab chiqamiz.

Ichak tayoqchasi guruhi bakteriyalarni aniqlash. Buning uchun chayindi solingan tampon yoki marlili salftokani probirkalarga 5-10 ml dan solingan Kessler muhitiga solamiz va termostatga yuqorida qayd etilgan sharoitga qo'yamiz.

Tekshirilayotgan ob'ektlarda stafilokokklar va ichak tayoqchalari bo'lmasligi kerak. SHundagina ular sanitar-gigienik talablarga mos keladi.

13-Laboratoriya mashg'uloti

Mavzu: Mezofil aerob va fakultativ anaerob mikroorganizmlar miqdorini aniqlash.

Sut pasterizatsiya qilinganidan keyin xam unda ITGB, sut achitqilimezofil streptokokklar, issiqqa chidamli tayoqchalar, drojjalar urug'lanishi mumkin. SHuning uchun 5 kunda 1 martadan kam bo'lmagan, 1-2 partiya ichimlik sutida umumiy bakterial urug'lanish (MAFAnMS) va ITGB lari tekshiriladi. Mikrobiologik ko'rsatkichlari bo'yicha sut va qaymoq quyidagi talablarga javob berishi kerak: Tablitsa 1.

Maxsulot nomi	MAFAnMS, KOE / sm ³	ITGB ning bo'lishi (sm ³ da) yul qo'yilmaydigan miqdor	S.aureus ni bo'lishi (sm ³ da) yo'l qo'yilmaydigan miqdor
Pasterlangan sut: butылka va paketlarda;	5*10 ⁴	1,0	1,0
A grupp	1*10 ⁵	0,1	0,1
B grupp	2*10 ⁵	0,1	-
Flyaga va sisternalarda			
Pasterlangan qaymoq: butылka va paketlarda; A grupp	1*10 ⁵	1,0	1,0
B grupp	2*10 ⁵	0,1	0,1
Flyagalarda	3*10 ⁵	0,1	-

Mikrobiologik tekshiruvni olib borish

Mahsulot aralashmalarini tayyorlash uchun 9 sm³ steril suvli probirka ishlatiladi. Ayrim xollarda, aralashma tayyorlash uchun fosfat buferli steril aralashma, natriy xloridning izotonik eritmasi, pepton suvi ishlatiladi. Birinchi probirkaga steril pipetka yordamida 1sm³ sut tomizamiz va aralashmani (1:10) yaxshilab aralashtiramiz. So'ngra shu pipetka bilan 1:10 li aralashmadan 1sm suyuqlik olib 1:100 aralashmali 2 probirkaga solamiz. Pasterlangan sutni o'rganishda 1, 2, 3 aralashma tayyorlash kerak bo'ladi.

Natijalarni hisoblash. Petri chashkasida unib chiqqan koloniyalarni sanaymiz, Buning uchun chashkalarni qorong'i fonga qo'yamiz va tag kismini tepaga o'girgan holda, 4 dan 10 gacha kattalashtiruvchi lupadan foydalanamiz. Koloniyalarning o'rta arifmetik xisobini topib, aralashmalar soniga ko'paytiramiz. Misol. Mahsulot 1:10 aralashmaga ekildi. Petri chashkasida 194 koloniya unib chiqdi, natijani 200 qilib yaxlitlaymiz. Demak, maxsulotdagi mikroorganizmlar soni: $200 \cdot 10 = 2,0 \cdot 10^3$ KOE/g.

Quyidagi mikrobiologik ko'rsatkichlar chashka usulida aniqlanadi: MAFAnMS (KMAFAnM), zamburug' va droja sporalari miqdori, chirituvchi bakteriya va koagulazomusbat stafilakokklar.

1. Mezofil aerob va fakultativ anaerob mikroorganizmlarni aniklash (MAFAnMS).

Ekishdan avval chashkalar markirovka kilinadi. Petri chashkasiga 1sm*dan (3 va 2 sut aralashmasi) aralashma solamiz. Ekilayotgan material solingan pipetkani 45*S burchak ostida ushlab chashka tubiga pipetkani ikki uchini tekizgan holda ushlaymiz. Sung har bir chashkaga 12-15sm*gusht-pepton agar (GPA) muxitini solamiz (45*S li). Agarni solishimiz bilan ekmani yaxshilab aralashiramiz. Muhitimiz qotishi bilan chashkalarni o'girib, termostatga joylaymiz (30*S,72 soat).

2. Zamburug' va drojalarni aniqlash.

Xuddi yuqoridagi usulda aniqlanadi, faqatgina suslo-agar yoki Saburo muxitidan foydalanamiz. Ekmalarni 24*S da 3 sutka termostatda inkubatsiyalaymiz.

Nazorat savollari:

1. Xom sutning gigienik xolatini aniqlovchi faktorlarni ko'rsating.
2. Pasterizatsiyaning sifatini kanday aniqlash mumkin.
3. Ichimlik sutining sifatini aniqlab beradigan mikrobiologik ko'rsatkichlarni ayting.
4. Mikrobiologik tekshiruvlarni olib borish uchun sut aralashmalari qanday tayyorlanadi.

13-Laboratoriya mashg'uloti

Mavzu: Mezofil aerob va fakultativ anaerob mikroorganizmlar miqdorini aniqlash.

Sut pasterizatsiya qilinganidan keyin xam unda ITGB, sut achitqilimezofil streptokokklar, issiqqa chidamli tayoqchalar, drojjalar urug'lanishi mumkin. SHuning uchun 5 kunda 1 martadan kam bo'lmagan, 1-2 partiya ichimlik sutida umumiy bakterial urug'lanish (MAFAnMS) va ITGB lari tekshiriladi. Mikrobiologik ko'rsatkichlari bo'yicha sut va qaymoq quyidagi talablarga javob berishi kerak: Tablitsa 1.

Maxsulot nomi	MAFAnMS, KOE / sm ³	ITGB ning bo'lishi (sm ³ da) yul qo'yilmaydigan miqdor	S.aureus ni bo'lishi (sm ³ da) yo'l qo'yilmaydigan miqdor
Pasterlangan sut:			
butылka va paketlarda;	5*10 ⁴	1,0	1,0
A gruppа	1*10 ⁵	0,1	0,1
B gruppа	2*10 ⁵	0,1	-
Flyaga va sisternalarda			

Pasterlangan qaymoq: butылka va paketlarda; A gruppа B gruppа Flyagalarda	1*105 2*105 3*105	1,0 0,1 0,1	1,0 0,1 -
--	-------------------------	-------------------	-----------------

Mikrobiologik tekshiruvni olib borish

Mahsulot aralashmalarini tayyorlash uchun 9 sm³ steril suvli probirka ishlatiladi. Ayrim xollarda, aralashma tayyorlash uchun fosfat buferli steril aralashma, natriy xloridning izotonik eritmasi, pepton suvi ishlatiladi. Birinchi probirkaga steril pipetka yordamida 1sm³ sut tomizamiz va aralashmani (1:10) yaxshilab aralashtiramiz. So'ngra shu pipetka bilan 1:10 li aralashmadan 1sm suyuqlik olib 1:100 aralashmali 2 probirkaga solamiz. Pasterlangan sutni o'rganishda 1, 2, 3 aralashma tayyorlash kerak bo'ladi.

Natijalarni hisoblash. Petri chashkasida unib chiqqan koloniyalarni sanaymiz, Buning uchun chashkalarni qorong'i fonga qo'yamiz va tag kismini tepaga o'giran holda, 4 dan 10 gacha kattalashtiruvchi lupadan foydalanamiz. Koloniyalarning o'rta arifmetik xisobini topib, aralashmalar soniga ko'paytiramiz. Misol. Mahsulot 1:10 aralashmaga ekildi. Petri chashkasida 194 koloniya unib chiqdi, natijani 200 qilib yaxlitlaymiz. Demak, mahsulotdagi mikroorganizmlar soni: $200 \cdot 10 = 2,0 \cdot 10^3$ KOE/g.

Quyidagi mikrobiologik ko'rsatkichlar chashka usulida aniqlanadi: MAFAnMS (KMAFAnM), zamburug' va droja sporalari miqdori, chirituvchi bakteriya va koagulazomusbat stafilakokklar.

1. Mezofil aerob va fakultativ anaerob mikroorganizmlarni aniklash (MAFAnMS).

Ekishdan avval chashkalar markirovka kilinadi. Petri chashkasiga 1sm³ dan (3 va 2 sut aralashmasi) aralashma solamiz. Ekilayotgan material solingan pipetkani 45*S burchak ostida ushlab chashka tubiga pipetkani ikki uchini tekizgan holda ushlaymiz. Sung har bir chashkaga 12-15sm³ gusht-pepton agar (GPA) muxitini solamiz (45*S li). Agarni solishimiz bilan ekmani yaxshilab aralashtiramiz. Muhitimiz qotishi bilan chashkalarni o'girib, termostatga joylaymiz (30*S, 72 soat).

2. Zamburug' va drojalarni aniqlash.

Xuddi yuqoridagi usulda aniqlanadi, faqatgina suslo-agar yoki Saburo muxitidan foydalanamiz. Ekmalarni 24*S da 3 sutka termostatda inkubatsiyalaymiz.

Nazorat savollari:

1. Xom sutning gigienik xolatini aniqlovchi faktorlarni ko'rsating.
2. Pasterizatsiyaning sifatini kandy aniqlash mumkin.
3. Ichimlik sutining sifatini aniqlab beradigan mikrobiologik ko'rsatkichlarni ayting.
4. Mikrobiologik tekshiruvlarni olib borish uchun sut aralashmalari qandy tayyorlanadi.

Mavzu: HAVONING MIKROFLORASINI TEKSHIRISH

Ishdan maqsad: Havoni tarkibidagi mikroorganizmlar sonini turli xil usullar bilan aniqlashni o'rganish.

Reaktiv va asboblari: 1. Agarli oziqa muhiti; 2. Petri likopchalari; 3. Spirt lampa; 4. 20 litrli 2 ta shisha idish; 5. Mikel naychasi; 6. Sterillangan paxta; 7. natriy sulfat yoki shakar kukuni; 8. Suv hammomi; 9. Spirt lampa.

Havoni tekshirishning bir nechta mikrobiologik usullari bor, eng oddiyi mikroblarni cho'ktirish yoki Kox usulidir.

Ishning borishi:

Kox usuli (sedimentatsion usul). Buning uchun agarli oziqa muhiti quyilgan Petri likopchasi tekshirilayotgan bino ichida 5 daqiqa ochib qo'yiladi. Bundan keyin Petri likopchasi yopilib, yozib belgilanadi va 30-35°S li termostatga 2-3 sutka qo'yiladi. Termostatda turishning uzoq muddati 5 sutka. Chunki har xil mikroblar turli xil vaqtda unib chiqadi. Petri likopchasidagi oziqa muhiti yuzasiga tushgan har bir mikrobdan bittadan koloniya hosil bo'ladi. Taxminiy hisobga ko'ra 5 daqiqa davomida Petri likopchasi yuzasiga o'tirgan 10 litr (0,01 m³) havoda qancha mikroblar bo'lsa, 100 sm² maydonga shuncha mikroblar cho'kadi. Petri likopchasi yuzasini hisoblab, 1 m³ havodagi mikroblar soni aniqlanadi. Bunda V.A.Omelyanskiy taklif etgan formuladan foydalanish mumkin. Masalan, 10 sm diametrlilik Petri likopchasi yuzasida 15 ta koloniya unib chiqqan. Petri likopchasi maydoni $3,14 \cdot 25 = 78,5 \text{ sm}^2$ (25 – Petri likopchasi radiusi (5) ning kvadrati).

$$x = \frac{100 \cdot 15}{78,5} = 19$$

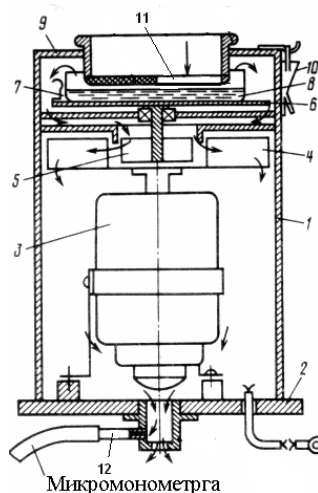
Proporsiya bilan chiqarsak 10 l havoda 19 ta koloniya. 1m³ havoda esa bundan yuz barobar ko'p, ya'ni 1900 dona mikroblar 1 m³ havoda mavjud.

Mikel naychasi orqali hisoblash usuli. Buning uchun 2 ta 20 litrli shisha idish va Mikel naychasi kerak. Birinchi 20 litrli idishga suv to'ldirib, Mikel naychasi shishaning og'ziga probka bilan berkitiladi. Mikel naychasining bir uchiga yaqin toraytirilgan joydan naychani ichiga sterillangan natriy sulfat yoki shakar kukuni solinadi. Kukun katta shishaning ichiga o'tib ketmasligi uchun naychani toraygan joyiga paxta tiqin tiqiladi. SHunda kukun toraygan joydan o'tmasdan naychada saqlanib qoladi. Mikel naychadan o'tgan havoni aniqlash uchun yuqoridagi (birinchi 20 litrli) shisha idishning jo'mragi ochilib, suv ikkinchi 20 litrli idishga boshqa shisha naycha orqali o'tkaziladi. Birinchi idishdan ikkinchi idishga suv o'tishi bilan, birinchi shishada bo'shliq hosil bo'ladi va bu bo'shliqqa havoni Mikel naychadan o'tadi. Havodagi mikroblar natriy sulfat yoki shakar kukuniga o'tirib qoladi va havoni filtrlanadi.

So'ng Mikel naychadagi kukun 10 ml sterillangan suvda suyultirib, suyuq go'sht-pepton agarga aralashtirib Petri likopchalariga quyiladi. 22-25°S li

termostatda 3-5 sutka saqlanadi. So'ng qattiq oziqa muhiti yuzasida unib chiqqan mikroob koloniyalari sanalib, 20 litrdagi havoning mikroblar soni hisoblab chiqiladi

Aspiratsion usul. YU. A. Krotov konstruksiyasidagi teshikli apparatdan foydalanishga asoslangan (1-rasm). Ventilyatori 4000-5000 ay/min. aylanadi, apparatning ponasimon tirqishi (teshigi) dan kirayotgan havoni tez so'rib olib, Petri likopchasidagi ozuq muxiti yuzasiga uriladi. Havо elektrodvigatelni aylanib o'tib, l/min ga rostlangan asbobdan rotometr orqali chiqadi. Mikroorganizmlar muhit yuzasiga bir tekis taqsimlanishi uchun Petri likopchasi qo'yilgan disk ham 60-100 ay/min da aylantiriladi. 1 minutda apparatdan 25-50 l havо o'tadi.



1-rasm. Krotov asbobining tuzilish sxemasi:

1-silindr; 2-silindr asosi; 3-elektromotor; 4-markazdan qochma ventilyator; 5 - kuyilchatka; 6 - disk; 7 - prujinalar; 8 - Petri chashkasi; 9 - asbobning qopqog'i; 10 - yopib berkitadigan ilgaklar; 11 - ponasimon tirqish; 12- chiqarish trubkasi.

Havoda mikroorganizmlar umumiy tarqalganligini aniqlash uchun apparat 1-3 minut, sanitariya holatini va patogen mikroorganizmlar bor-yo'qligini aniqlash uchun 3-15 minut ishga tushiriladi. So'ngra apparatning qopqog'ini ochib, mikroorganizmlar ekilgan likopchalar olinadi va kulturalar o'sishi uchun 37°S haroratli termostatga 24 soatga qo'yiladi. SHundan keyin ular 48 soat xona temperaturasida qoldiriladi va o'sib chiqqan koloniyalar hisobga olinadi. Havoning so'rilishi tezligi va davomiyligiga qarab, umumiy hajm hisoblanadi va 1 m³ havodagi mikroorganizmlar miqdori hisoblanadi.

A.F. Voytkevich ma'lumotlariga ko'ra 1 m³ havoda Arktikada 1 ta dan 10 ta gacha, dengiz havosida 1-2 dona, shahar parki havosida 200 ta gacha, shahar ko'chasida 5000 ta gacha, aholi yashash binolarida 20 000 ta gacha va molxonalarda 1-2 mln. ta gacha mikroblar uchraydi.

Ishlab chiqarish binolari havosining 1 m³ da ko'pi bilan 500 ta mikroorganizm bo'lsa, havosi toza hisoblanadi.

Nazorat savollari

1. Havо mikroflorasi asosan qaysi mikroorganizmlardan tashkil topgan.

2. Havo mikroorganizmlari qanday usul bilan ekish mumkin.
3. *Kox usuli*.
4. *Mikel naychasi orqali hisoblash usuli*.
5. *Aspiratsion usul*.

15-LABORATORIYA ISHI

Mavzu: SUVNING MIKROFLORASINI TEKSHIRISH

Ishdan maqsad: Suvning tarkibidagi mikroorganizmlar sonini turli xil usullar bilan aniqlashni o'rganish, koli tirtri va koli indeksini aniqlash

Reaktiv va asboblari: 1. Endo muhiti; 2. Petri likopchalari; 3. Spirt lampa; 4. Zeyts asbobi; 5. Membranali filtr; 6. Suv hammomi; 7. Distellangan suv; 8. Elektr plitka; 9. Filtr qog'oz. 10. Elektr nasos; 11. Pinset; 12. Lupa; 13. Voronka.

Oziq-ovqat mahsulotlari va ichimlik suvi tarkibidagi turli xil patogen mikroorganizmlarni tezda aniqlash ancha qiyinchilik tug'diradi. SHuning uchun mahsulotlarni mikroblar bilan ifloslanganligi ichak tayyoqchasi bakteriyasi bor-yo'qligiga qarab aniqlanadi. Ichak tayyoqchasi asosiy patogen mikroorganizmlar hisoblanadi. Ular boshqa patogen mikroorganizmlarga qaraganda tashqi muhit ta'siriga ancha chidamlidir. SHu sababli mahsulotda ichak tayyoqchalari bo'lmasa, boshqa patogen mikroblar ham yo'q deb hisoblanadi. Boshqa mikroorganizmlarga ko'ra, ichak tayyoqchasi 43-46°S da ham rivojlanib ko'payaveradi. Bu mikroblar uglevodlarni parchalab gaz va kislota hosil qiladi. SHu xossalar ichak tayyoqchasini aniqlashda hisobga olinadi.

Ichak tayyoqchasi doimo odam va hayvonlar ichagida yashaydi. Bu mikroblar organizmga ovqat bilan kiradi. Ichak tayyoqchasi axlat bilan doimo tashqi muhitga chiqib turadi. SHunga ko'ra, suv va tuproq hamisha ichak tayyoqchasi bilan ifloslangan bo'ladi. Suv va oziq-ovqatdagi ichak tayyoqchasi miqdori shu ob'ektlarning sanitariya holatini bildiruvchi muhim ko'rsatkich hisoblanadi. Unga to'g'ri baho berish uchun suvning koli-titr va koli-indeksini aniqlash zarur.

Koli-titr – suvning ichak tayyoqchasi uchraydigan eng kichik hajmi. Masalan, koli-titr 200 deb qaralsa, 200 ml suv tarkibida bir dona ichak tayyoqchasi borligini bildiradi.

Koli-indeks – bir litr suvdagi ichak tayyoqchasining soni. Masalan, koli-indeks 5 deb qaralsa, 1 litr suv tarkibida besh dona ichak tayyoqchasi borligini bildiradi.

Suvni sanitariya tomonidan baholashda ikki tomoniga e'tibor qaratish zarur.

1. *Suvdagi umumiy mikroblar soniga*. Buning uchun tekshirilayotgan suv bir necha bor suyultirilib, Petri likopchasidagi peptonli oziqa muhitiga ekiladi (24 soat 35-37°S da termostatda saqlanadi) va unib chiqqan koloniyalar sanalib, 1 ml suvdagi mikroblarning umumiy soni hisoblanadi. SHundan so'ng quyidagilarga e'tibor qaratilgan holda suvga baho beriladi.

1 ml tekshirilayotgan suvda unib chiqqan mikroblar soni 100 dan oshmasa *toza suv*, 100 dan 500 ta gacha bo'lsa *shubhali suv*, 500 dan ortiq bo'lsa *iflos suv* deb hisoblanadi. 1 ml suvdagi mikroblarning umumiy soni 100 dan oshmasi bu suv ichishga yaroqli hisoblanadi.

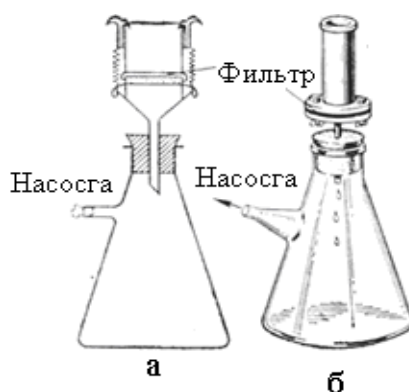
2. *Suvda ichak tayyoqchasining soniga.* Amaldagi GOST talablariga ko'ra, tozalangan ichimlik suvi uchun koli-titr 300 dan past bo'lmasligi, koli-indeks esa ko'pi bilan 3 bo'lishi kerak. Aholisi 1-2 mln. dan ortiq bo'lgan shaharlarda ichimlik suviga talab katta bo'lganligi uchun koli-titr – 500, koli-indeks esa 2 bo'lishi kerak. Ochiq suv omborlaridaga yaxshi suvlarning koli-titri 100 va koli-indeksi 10 hisoblanadi. Koli-titr yuqori bo'lsa suv toza, aksincha past bo'lsa iflos suv hisoblanadi.

Ishning borishi:

Membranali filtrlash usuli. Ushbu usul oziq-ovqat korxonalarida laboratoriyalarida keng tarqalgan. Boshqa usullarga qaraganda bir qancha afzalliklarga ega, chunki, analiz muddatini 24 soatgacha kamaytiradi va h.k.

Membrana filtrlar teshik-teshik selluloza plyonkadan iborat bo'lib, teshiklari diametri 0,35; 0,5; 0,7; 0,9; va 1,2 mkm bo'lgan (№1, №2, №3, №4, №5) turlari mavjud. Ichak tayyoqchasini hisobga olishda №3 filtrdan foydalaniladi. Suv avval diametri 3-5 mkm bo'lgan filtrlardan o'tkazilib dag'al zarrachalardan tozalanadi.

Filtrlash uchun Zeyts asbobidan foydalaniladi. U avtoklavda yoki spirtida sterillanadi. Membrana filtrlarni ishlatishdan oldin distillangan suvli stakanga tushiriladi va 20-30 minut saqlanadi. Stakandagi distillangan suv 50-60⁰S gacha issiq bo'lishi kerak. Keyin suvni to'kib tashlab, yangisi quyiladi va 2-3 marta takrorlanadi. So'ngra filtrlar 1 minut davomida qaynatiladi. Tayyor bo'lgan filtrni sterillangan chetlari tekis pinsetda olib, Zeyts asbobining metall to'ridagi asbest plastinkaga xira tomonini yuqoriga qaratib qo'yiladi. Filtr ehtiyotlik bilan voronkaga o'rnatilib, uni metall qisqich bilan yaxshilab mahkamlanadi. Voronkaga tekshiriladigan suvni solib, asbob suv oqimli elektr nasosga ulanadi.



16-rasm. Zeyts filtrlari:

a - shisha tutqichli; *b* - metall tutqichli

Filtrlash tugagandan keyin voronka olinadi va qizdirilgan pinsetda filtrni olib, xira tomonini yuqoriga qaratib, Petri likopchasidagi Endo muhiti yuzasiga qo'yiladi; bunda agar bilan filtr orasida havo pufakchalari hosil bo'lmasligi kerak. Filtrning pastki (orqa) tomonidagi suv tomchilari oldin sterillangan filtr qog'ozga

shimdirib olinadi. Tegishli yozuvlar yozilib likopchalar termostatda 37⁰S issiqda 18-24 soat o'stiriladi. SHundan keyin lupada qaralib, ichak tayoqchasiga xos koloniyalar sanab chiqiladi va 2-3 ta koloniyadan mazok tayyorlab, Gramm usulida bo'yaladi. Masalan, filtrda 5 ta koloniya o'sgan bo'lsa, filtrlangan suv miqdori 500 ml bo'lsa, 100 ml suvda bitta ichak tayoqchasi bo'lgan, ya'ni koli-titri 100 ga, koli-indeksi esa 10 ga teng bo'ladi.

SHarbatlar va alkogolsiz meva ichimliklari koli-titrini aniqlashda 100 ml dan 2 hajm va 10 ml dan 10 hajm olinadi. 10 ml pivoga 50 ml muhit, 1 ml pivoga 10 ml va 0,1 ml pivoga 5 ml dan muhit qo'shiladi.

Pivo va muhit solingan idishlar 43⁰S issiq termostatda 18-24 soat saqlanadi. Kolba va probirkalarni ko'rib chiqib, gaz hosil bo'lishi va loyqalanishiga qarab xulosa qilinadi.

Birinchi marta tekshiriladigan suvdan 1000, 500, 100, 10, 5 va 1 ml dan olish kerak. Juda ifloslangan suvni filtrlashdan oldin sterillangan suv qo'shiladi. Agar 1 ml va undan kam suyuqlik filtrlanadigan bo'lsa, asbobning voronkasiga 10 ml sterillangan suv quyib, keyin tekshiriladigan namunadan qo'shiladi. Agar vodoprovod suvi tekshirilganda mikroorganizmlar o'smagan bo'lsa, analiz tugatiladi va koli-titr 300 dan yuqori deb hisoblanadi.

SUVNING MIKROFLORASINI TEKSHIRISH

16-LABORATORIYA ISHI

Mavzu: SUT VA SUT MAHSULOTLARI MIKROFLORASINI O'RGANISH

Ishdan maqsad: Sut mikrobiologiyasi bilan tanishish va sutning mikroblar bilan ifloslanganligini aniqlashni o'rganish.

Reaktiv va asboblari: 1. YAngi sog'ilgan sut va eskirgan sut namunalari; 2. Metilen ko'kining shchi eritmasi; 3. Suv hammomi; 4. Probirkalar.

Sut mikroorganizmlar uchun qulay oziqa muhiti hisoblanadi. YAngi sog'ilgan sutning 1 ml da mingdan to millionlargacha mikroblarni uchratish mumkin. Sut tarkibida asosan sut kislota va yog' kislota hosil qiluvchi tayoqchalar, ichak tayoqchasi gruppasi, chirituvchi bakteriyalar, achitqilar va zamburug'larni uchratish mumkin.

YAngi sog'ilgan sut tarkibida *laktenin* degan modda borligi uchun mikroorganizmlar rivojlanmaydi, chunki bu modda mikroorganizmlarning rivojlanishiga to'sqinlik qiladi. Sutda bu moddaning faol turish muddati *bakteriotsid faza* deb ataladi. Sutni har xil haroratda turli muddatgacha (*bakteriotsid faza*) saqlash mumkin. Masalan, 25⁰S da 3 soat, 10⁰S da 6 soat, 5⁰S da 24 soat va 0⁰S da 36-48 soat. Sutning bakteriotsid fazasi qancha uzoq bo'lsa, sutni shuncha vaqt saqlash mumkin. SHuning uchun yangi sog'ilgan sutni tezda sovutish zarur. Birinchi bakteriotsid faza tugashi bilan sutda turli xil mikroblarning

rivojlanishi boshlanadi. Dastlab sut tarkibida sut kislota hosil qiluvchi streptokokklar rivojlanadi va sut kislota hosil qiladi. Sut kislota miqdorining ortishi bilan streptokokklar nobud bo'lib, o'rnini asta sekin tayyoqchasimon sut kislota hosil qiluvchi bakteriyalar egallaydi. Sutda kislota miqdori ortishi bilan rN ham pasayadi va sut kislotali tayyoqchasimon bakteriyalar ham nobud bo'lib, o'rnini achitqilar va mog'or zamburug'lar egallaydi. Sut kislotalarining kamayishi bilan sutda yana chiritivchi bakteriyalar rivojlanadi.

Sut kislota hosil qiladigan mikroorganizmlar ikki guruhga bo'linadi.

1. *Tipik (gomofermentativ) sut kislota hosil qiluvchi streptokokklar*. Asosiy vakili *Streptococcus lactis*. Asosan shakarni bijg'itib 85-95% gacha sut kislota va oz miqdorda uchuvchan kislotalar hosil qiladi.

2. *Atipik (geterofermentativ) sut kislota hosil qiluvchi streptokokklar*. Asosiy vakili *Streptococcus citrovorus*, *Streptococcus paracitrovorus*. Sut kislotadan tashqari, uchuvchan kislotalar, xushbo'y moddalar va SO₂ gazi hosil qiladi.

Tayyoqchasimon sut kislotali bakteriyalar ham ikkiga bo'linadi.

1. *Gomofermentativ sut kislotali bakteriyalar* (termofill va mezofillar) . Asosan shakarni bijg'itib, 3-3,5% gacha sut kislota hosil qiladi. Sutni 6-12 soatda ivitadi.

2. *Geterofermentativ sut kislotali bakteriyalar*. SHakarni bijg'itib, ko'p miqdorda spirt va SO₂ gazi hosil qiladi.

YOg' kislotali mikroblar. Asosan tuproq va o'simliklarda bo'lib, sutga tushganda anaerob sharoitda sut shakarini parchalab, yog' kislotalar va gaz hosil qiladi. Bunda sut badbo'y hidli va achchiq ta'mli bo'lib qoladi.

Achitqi va mog'or zamburug'lar. Sutning sirtida rivojlanadi va sut kislotalarining bir qismini istemol qiladi. SHuningdek, sut yog'larini parchalab, achchiq ta'm va dag'al xashak hidini paydo qiladi.

Ichak tayyoqchasi (E.coli). Sutga atrof-muhitdan tushadi va laktozani parchalab, kislota va gaz hosil qiladi. Sut tezda iviydi va suyuqlashib ketadi. Ichak tayyoqchasi bilan zararlangan sutdan pishloq va boshqa sut mahsulotlari tayyorlab bo'lmaydi.

Sut tarkibidagi mikroorganizmlar gruppasini aniqlash uchun quyidagi oziq muhitlardan foydalaniladi:

1. Go'sht-pepton agar - chirituvchi mikroorganizmlar gruppasini;
2. Suslo agar - mog'or zamburug'lar va achitqilarni;
3. Probirkadagi steril sut - sut kislota hosil qiluvchi mikroorganizmlar gruppasini;
4. Bo'r bilan suslo agar - sut kislota hosil qiluvchi streptokokklarni aniqlash uchun.

Sutni mikroblar bilan ifloslanganligini aniqlash.

Sutda turli xil fermentlar mavjud bo'ladi. SHu jumladan reduktaza fermenti ham. Mikroorganizmlar faoliyati natijasida sutda reduktaza fermenti to'planadi. Reduktaza ferment metilin ko'kini rangsizlantirish xususiyatiga. YAngi sog'ilgan sutda mikroblar va reduktaza fermenti kam bo'ladi va metilen ko'ki sekin rangsizlanadi. Agar sut eskirgan bo'lsa mikroblar va reduktaza fermenti ko'p

bo'ladi va metilen ko'ki tezda rangsizlanadi. Reduktaza namunasini qo'yish bilan sutning mikroblar bilan ifloslanaganligini taxminiy aniqlash mumkin.

Metilen ko'kning ishchi eritmasini tayyorlash. Avval spirtli to'yingan metilen ko'kini olib, unga 100 ml 96° li etil spirti aralashtiriladi va 1 sutkaga termostatda 37°S da qoldiriladi. So'ngra bu aralashma filtirlanadi va to'yingan metilen ko'ki eritmasidan ishchi eritma tayyorlanadi. Ishchi eritmani tayyorlash uchun 5 ml to'yingan metilen ko'ki eritmasiga 195 ml distellangan suv qo'shib aralashtiriladi.

Ishning borishi

Reduktaza namunasini qo'yish va metilen ko'ki bilan sinash. Buning uchun katta probirkalarga 1 ml metilen ko'kning ishchi eritmasi (*ishchi eritma murabbiy yoki laborant tomonidan ta'minlanadi*) va 20 ml sut solinadi. Probirkaning og'zini rezina probirka bilan berkitiladi. Sut va metilen ko'kini sekin (*silkitmasdan*) aralashtiradi va 38-40°S suv hammomida 20 minut qoldiriladi. 2 soat va 5,5 soatdan so'ng rangi o'zgarganligi aniqlanadi va rangining o'zgarishiga ko'ra 4 ta sinfga bo'linadi.

Sutni metilen ko'ki orqali tekshirishning tezlashtirilgan usuli. Buning uchun metilen ko'kning ishchi eritmasini tayyorlashda to'yingan eritma 10 marta suyultiriladi va tekshirilayotgan sut 2 marta kam olinadi. Toza probirkalarga 1 ml suyultirilgan metilen ko'ki eritmasi va 10 ml sut solib, probirkaning og'zi rezina probirka bilan berkitiladi. Probirka silkitmasdan aralashtiriladi va 38-40°S li suv hammomiga qo'yiladi. Metilen ko'kning rangsizlanishi 5-10-15 minutlar davomida tekshirib turiladi. SHu vaqt davomida metilen ko'kning rangsizlanishi tekshirilayotgan sutning 1 ml da gaz hosil qiladigan mikroorganizmlarning soni milliondan ko'proq ekanligini ko'rsatadi.

6-jadval.

Sinf	Sutning sifat bahosi	Sut rangining o'zgarishi	Sutning rangi	1 ml sutdagi mikroorganizmlar soni
I	YAxshi	1 soatdan so'ng	Ko'k-kul rang	500 mingdan ortiq
II	Qoniqarli	1 soatdan so'ng	Och binafsha yoki ko'k binafsha rang	500 mingdan 4 mln. gacha
III	YOmon	1 soatdan so'ng	Pushti yoki oq rang	4 mln. dan 20 mln. gacha
IV	Juda yomon	20 minutgacha	Oq rang	20 mln. dan ortiq

17-LABORATORIYA ISHI

Mavzu: GO'SHTNING YANGILIGINI BAKTERIOSKOPIK USULDA ANIQLASH

Ishdan maqsad: Go'shtning yangiligini bakterioskopik usulda aniqlashni o'rganish.

Reaktiv va asboblari: 1. Mikroskop; 2. Bo'yoqlar; 3. Buyum oynasi; 4. Go'sht namunalari; 5. Qaychi; 6. Skalpel; 7. SHpatel; 8. Pinset; 9. Spirt lampa.

Go'sht mikroorganizmlar uchun yaxshi oziqa hisoblanadi. Chunki go'sht tarkibida mikroorganizmlar uchun kerakli moddalar, oqsillar, uglevodlar, azot, vitaminlar, va mineral tuzlar ko'p. SHuning uchun go'sht mikroblar ta'sirida tez buziladi. YAngi go'shtning yuza qismida 1 sm² da bir necha ming saprofit mikroorganizmlar bo'ladi. SHu jumladan, kokksimonlar, tayyoqchasimonlar, achitqi va zamburug' sporalari mavjud bo'ladi. Bundan tashqari go'sht zaharli moddalar hosil qiladigan mikroblar (bats. *perfringens* va *salmonella*) bilan ham ifloslanishi mumkin.

Go'shtning sifatini aniqlashda mikroblarning tarqalishi va ularning turlarini bilish katta ahamiyatga ega.

Go'shtning chirishi. Go'sht yuza qatlamlaridan ichki qatlamlariga tomon chiriy boshlaydi. CHirishning boshlang'ich stadiyalarida kokksimon aeroblar, keyingi stadiyalarida esa tayyoqchasimon aeroblar ishtirok etadi. Go'shtning chirishida asosan anaeroblardan *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bac. subtilis* *Bac. mesentericum*; fakultativ anaeroblardan *Bac. bulgarys*; anaeroblardan *Clostridium sporagenum*, *Clostridium putrificym* va boshqa mikroblar aktiv ishtirok etadi.

Go'shtning mog'orlanishi. Bu buzilish go'shtning sirtiga tushgan mog'or zamburug'lari, *kladosporium* va *Penitsillum* zamburug'larining qulay sharoitda rivojlanishi bilan ifodalanadi.

Go'shtning kislotali bijg'ishi. Bunda go'shtdan achchiq hid keladi, yumshab qoladi va kul rang tusga kiradi. Bu jarayonda anaerob *Klostridium putrififatsiens* va ba'zan sut kislotali achitqilar ishtirok etadi.

Pigment hosil bo'lishi. Bu jarayonda pigment hosil qiluvchi aeroblar *Serratia marsessens* ishtirokida qizil dog', achitqilar ishtirokida esa oq rangli dog'lar hosil bo'ladi.

Go'shtning yuqimli kasallik qo'zg'atuvchi mikroorganizmlar va saprofit mikroorganizmlar bilan ifloslanganligi laboratoriyada tekshiriladi. Go'shtni dastlab organoleptik usul bilan tekshiriladi, so'ngra go'shtdan surtma-tamg'a tayyorlanib mikroskopda kuzatiladi. Ular go'sht pepton agarga va go'sht pepton bulonga ekilib mikroblarning soni va sifati aniqlanadi.

Ishning borishi

Go'shtdan 1- va 2- namunalar olish va surtma-tamg'a tayyorlash.

Go'shtdan birinchi namuna yuza qatlamdan, ikkinchi namuna esa chuqur qatlamdan olinadi. YUza qatlamdan namuna olish va surtma-tamg'a tayyorlash uchun yuqoridagi qatlamni pinset bilan ushlab turib, steril qaychi bilan bir parcha qirqib olib, buyum oynaga bosib, tamg'a qilib surtma tayyorlanadi.

Ichki qismlardan namuna olish uchun tekshirilayotgan go'shtning sirtini qizdirilgan shpatel bilan kuydiriladi. So'ng go'sht steril skalpel orqali kesilib,

ochilgan ichki qavatdan pinsetda ushlab, steril qaychi bilan bir parcha kesib olinadi va surtma-tamg'a tayyorlanadi. Tayyor surtma havoda quritiladi. Alangada fiksatsiya qilinadi va Gram usulida bo'yalib, mikroskopda kuzatiladi. Mikroskopning kamida 5 ta ko'rish maydonchasidagi mikroblar soni hisoblab chiqiladi. Bunda kokksimon va tayyoqchasimon bakteriyalarni alohida hisoblash kerak.

Agar go'sht yangi so'yilgan yoki to'g'ri sovutilgan bo'lsa surtma-tamg'a tayyorlab bo'lmaydi. Chunki oynada dog' qolmaydi va ko'zga tashlanmaydi.

Agar go'sht buzila boshlagan bo'lsa surtma-tamg'a yaxshi tayyorlanadi va yaxshi bo'yaladi. Chunki buzila boshlagan go'sht hujayralarining suvi chiqadi va oynaga go'sht bo'lakchalari yaxshi yopishadi. Agar go'sht buzilmagan bo'lsa yuza qatlamdan tayyorlangan surtmada bir necha kokksimon va tayyoqchasimon bakteriyalarni uchratish mumkin. Ichki qatlamlardan tayyorlangan surtmada esa mikroblar umuman bo'lmaydi.

Agar go'sht nihoyatda buzilgan bo'lsa, kokksimon mikroblar yo'qolib, o'rmini asosan tayyoqchasimon mikroblar egallagan bo'ladi.

18-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Mavzu: BUG'DOY MIKROFLORASINI ANIQLASH

Mashg'ulot o'tkazishdan maqsad. Don, mikroflorasining soni va sifatini aniqlash.

Don. Boshqali osimliklar o'tlar oilasining *Gramineae* turkumiga kiradi. Ularning doni parranda va hayvonlar uchun ozuqadir. Bug'doy, javdari bug'doy, sholi, makkajo'xori, arpa, tariq, suli eng muhim don turlari hisoblanadi. Don mikroorganizmlari saprofitlarga, fitopatogen va odam hamda hayvonlar uchun patogen bo'lgan turlarga bo'linadi. Saprofit guruhga tipik epifit mikroorganizmlar kiritiladi, ular o'simliklarga o'sishi va hosili pishishi davrida tushadi yoki hosilni yig'ishtirish va tashish davrida tuproqdan yoki havodan o'tadi. Yangi o'rib-yig'ib olingan sifatli donda (g'allada) *Pseudomonas* turkumiga mansub chirituvchi bakteriyalar son jihatidan ko'p bo'ladi. Buturkumning asosiy vakili *P.herbicola* bug'doy, javdar va boshqa g'allalar donidagi barchabakteriyalarning 70-95%ni tashkil etadi. Bakteriya donni buzmaydi (zararlamaydi), lekin juda ko'p aktivholatda bo'lib, intensiv ravishda issiqlik ajratadi va o'zidan-o'zi qizib ketish jarayoni boshlanishiga sabab bo'ladi. Boshqa mikroorganizmlar rivojlanganda esa (mitseliyli zamburug'lar, kokklar, spora hosil qiluvchi bakteriyalar) *P.herbicolanobud* bo'ladi, bu esa donning sifati pasayganidan dalolat beradi.

Pseudomonas fluorescens epifit bakteriyalarning son jihatidan ikkinchi vakili hisoblanadi. Juda chang donni saqlashda spora hosil qiluvchi *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *B.megaterium* va boshqa bakteriyalar soni anchagina ko'payadi. Zararlangan donda *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Proteus* turkumiga mansub bakteriyalar topiladi. Achitqi mikroflorasi donning saqlanishiga va sifatiga katta ta'sir ko'rsatmaydi, lekin namlik yuqori bo'lganda donning

o'zidan-o'zi qizib ketishiga va donda “ombor” hidi paydo bo'lishiga olib keladi. Yangi o'rib- yig'ilgan g'allada doim mitseliyli zamburug'lar bo'ladi. Donning saqlanishi va sifatiga asosan *Aspergillus*, *Penicillium Alternaria* turkumiga mansub zamburug'lar ta'sir etadi. Fitopatogen guruhga bakteriya va zamburug'larning parazit turlari kiradi. O'simliklar o'sishi va hosilpishishi davrida ular bakterioz va mikoz kasalligini qo'zg'atadi. Bug'doy, arpa, javdar, makkajo'xori, sholi bakteriozi keng tarqalgan bo'lib uni *Pseudomonas* turkumining ayrim vakillari qo'zg'atadi. Kasallik dog' paydo bo'lishi, boshqoq tangachalarining, boshqoq'qining va poyasi yuqori qismining qorayib qolishi bilan xarakterlanadi (“qorakasallik”). Kasallik kuchayib ketsa, don qorayib, burishib qoladi va 60-70% gacha vaznini yo'qotadi. Zamburug' kasalliklari, don mikroblari orasida tosh kuya(sporinya) va qorakuya (golovnaya) eng ko'p tarqalgan.

Toshkuyani *Ascomycetes* sinfiga mansub *Clauiceps purpurea* zamburug'i qo'zg'atadi. Buzamburug' asosan javdar, kamdan-kam bug'doy va arpani gullashi davrida zararlaydi. Boshqoqda tuguncha o'rnida to'q binafsha rangli yirik qattiq boshqoqchalar (sklerotsiyalar) hosil bo'ladi. Hosil o'rim-yig'imi davrida ular yerga to'kilib qolib, bahorda bo'rtib, unib chiqadi va ipsimon bandli boshcha shakldagi mevatana hosil qiladi. Boshcha ichida xaltachalar, har qaysi xaltachada 8 tadan ipsimon sporalar bo'ladi. Sporalar tugunchaga tushib, o'sadi va mitseliy hosil qiladi. Mitseliysida bir oz shirinroq suyuqlik bilan o'ralgan konidiyal konidiya bandlar shakllanadi. Suyuqlik hasharotlarni o'ziga jalb qiladi, ular esa konidiyalarni sog'lom o'simliklarga yuqtiradi. Zararlangan tugunchada javdar pishishi davrida mitseliy zichlashadi va don o'rnida shoxchalar (rojki) shakllanadi. Ularda zaharli moddalar-alkaloidlar (ergotin, ergotinin, ergotoksin, ergotin kislota va ularning stereo izomerlari) bo'ladi. Toshkuya alkaloidlari odamlar, hayvonlar va qushlar uchun zaharlidir. Tarkibida toshkuya shoxchalari bo'lgan undan pishirilgan non is'temol qilinsa, odam bo'shashadi, boshi aylanadi, tomiri tortishadi. Qorakuya barcha asosiy g'alla ekinlarini zararlaydi. *Basidiomycetes* sinfiga mansub parazit zamburug'lar bu kasallikni qo'zg'atuvchilardir. Bu zamburug'lar qop-qora sporalaridan ko'payadi. Zararlangan o'simlikda bunday sporalarning to'planishi natijasida u ko'mirga aylangan o'qqa o'xshaydi, uning “qorakuya” degan nomi shundan kelib chiqqan. Don yanchilganda qorakuya sporalari don massasining yuzasiga tushib qoladi. Bu sporalar tarkibida trimetilaminbo'lganidan dondan tuzlangan baliq hidi anqib turadi. Zararlangan donning uni qoramtir , hidi va ta'mi noxush bo'lib, undan pishirilgan non so'lakbezlarini qo'z g'atadi , ichakning funksiyasini buzadi.

Fuzarioz *Fusarium* turkumiga mansub zamburug'lar qo'zg'atadigan g'alla o'simliklari kasalligidir. *F. graminearum* bilan zararlangan donda glukozidlar bilan alkaloidlar tipidagi mikotoksinlar to'planadi. Fuzariozli don aralash tortilgan undan pishirilgan non “mastkasallik ” deb ataladigan zaharlanishga sabab bo'ladi (kuchsizlik, oyoq-qo'llarda og'irlik seziladi, bosh qattiq og'riydi, ich ketadi, ba'zan ko'rish qobiliyati ham buziladi). Bunday zaharlanishga hayvonlar ham *zgir*. *F. sporotrichioides* va *F. roseum* qishda qor ostida qishlovchi g'alla o'simliklari, ayniqsa grechixa bilan tariqda rivojlanib, juda zaharli modda- Fuzariogen sintezlaydi. Bu moddadan zaharlanganda (alimantar-toksik aleykiyada) odam

holsizlanadi, tomog'i va tanglayishshadi, yutinganda tomog'i, qizil o'ngachi va oshqozoni og'riydi.

Cladosporium turkumiga mansub ba'zi zamburug'lar ajratadigan kladosporiy kislotasi taham shunga o'xshash ta'sir qiladi.

Ko'pgina zamburug'lar donda rivojlanib, odam va hayvonlar uchun xavfli bo'lgan toksin (zaharli modda) lar, xususan, aflatoksinlar (*Asp.flavas*), umiga otoksinlar (*Asp.fumigatus*), oxra toksinlar (*Asp. ochracues*), viridika toksinlar (*Asp. viridicatum*), staxibotriotoksinlar (*Stachybotrys alternans*, *St. atra*, *St. lobulata*) va boshqalar hosil qiladi. Odam va hayvonlar uchun patogen bo'lgan mikroorganizmlar-zoonozlar tasodifiy mikrofloraga kiradi. Ular o'rim-yig'im davrida yoki o'simliklar o'sishi davrida donga qo'shiladi, kemiruvchilar va hayvonlar yordamida tarqaladi.

Dondagi mikroorganizmlarning umumiy miqdorini aniqlash.

O'rtacha namunani olish usuli

Don omboridagi yoki ishlov berish, qaynatish, solod tayyorlash uchun keltirilgan don partiyasidan o'rtacha namuna olinadi. Bo'lgich yordamida yoki qo'lda o'rtacha namunadan kvadratlar usulida naveska olinadi. 10 g dan tortib olingan ikkita parallel naveskani sterillangan likopchalarga (byuks yoki kolbachalarga) solib, og'zi tezda berkitiladi. Don omboridagi don ikki oyda bir marta analiz qilinadi. Agar sifatida o'zgarish sezilsa, tez-tez analiz qilinadi. Endi shu o'rtacha namunadan 10g tortib olib, 90ml sterillangan suvga aralashtiriladi va qo'lda yoki maxsus laboratoriya apparatida yaxshilab silkitib, undan yuvindi suv ajratib olinadi. Undan tayyorlangan 1:10² suyultirma mitseliyli zamburug'larni aniqlashda ishlatiladi. 1:10³ va 1:10⁴ suyultirmadan bakteriyalar aniqlanadi. So'ngra Petrilikopchasidagi elektiv muhitga chuqur (1ml dan) yoki yuza usulda ekiladi. Har bir suyultirmadan kamida 2 ta parallel likopchaga ekiladi. Bakteriyalar ekilgan likopchalar 25-30°Cda, zamburug' ekilganlari 22-25°Cda termostatda saqlanadi. 48 soatdan keyin o'sib chiqqan koloniyalar sanaladi. Agar koloniyalarni aniqlab ajratish zarur bo'lsa, likopchalar xona temperaturasida bir necha kun saqlanadi. Dondagi fitopatogen zamburug'larni aniqlash. Agar don ko'rib chiqilganda yoki ifloslanganligi analiz qilinganda qoramtir-binafsha rangli mayda shoxchalar topilsa, qo'shimcha ravishda 400 g don tortib olib, undagi toshkuyalar soni aniqlanadi va foizda ifodalanadi. Qorakuya zararlangan don yoki uning qismlari va to'zib ketgan sporalar shaklida bo'ladi.

Tashqi belgilariga qarab 50g namunadan ajratib olingan fuzariozli donni tortib, olingan namunaga nisbatan foizda ifodalanadi.

