

**O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY VA O‘RTA MAXSUS
TA‘LIM VAZIRLIGI**

**ISLOM KARIMOV NOMIDAGI TOSHKENT DAVLAT TEXNIKA
UNIVERSITETI**

MIKROBIOLOGIYA

fanidan laboratoriya ishlarini bajarish uchun

USLUBIY QO‘LLANMA

Toshkent 2019

Mikrobiologiya fanidan laboratoriya ishlarini bajarish uchun uslubiy qo‘llanma / Sattarov M.E., Parpiyev Z.T. – Toshkent.: ToshDTU, 2019.
– 66 b.

Mikrobiologiya fanidan laboratoriya ishlarini bajarish uchun tayyorlangan ushbu uslubiy qo‘llanma 5320500 –biotexnologiya (oziq-ovqat, ozuqa, kimyo va qishloq xo‘jaligi) yo‘nalishida tahsil olayotgan bakalavriat talabalari uchun mo‘ljallangan.

Islom Karimov nomidagi Toshkent davlat texnika universiteti ilmiy-uslubiy kengashi qaroriga asosan chop etildi

Taqrizchilar:

Bekmuxamedova N.K. – O‘zR FA Mikrobiologiya instituti ilmiy kotibi, biologiya fanlari nomzodi, katta ilmiy xodim.

Nazarov K.K. – ToshDTU “Biotexnologiya” kafedrası mudiri, biologiya fanlari nomzodi, dotsent.

1-laboratoriya ishi

Mikrobiologiya laboratoriyasida ishlash tartibi, laboratoriyaga qo'yiladigan talablar va maxsus laboratoriya jihozlari bilan tanishish

Ishdan maqsad. Mikrobiologiya laboratoriyasining joylashishi, maxsus xonalarda qanday ishlar bajarilishi va jihozlanishini o'rganish. Mikrobiologiya laboratoriyasida ishlash qoidalari bilan tanishish.

1. Laboratoriyaning joylashishi va jihozlanishi

Belgilangan maqsadga qarab (o'quv, ilmiy-tadqiqot, ishlab chiqarish) mikrobiologiya laboratoriyasi bir necha xonalardan tashkil topadi: mikroskopda ko'rish ishlari uchun mo'ljallangan xonalar, biokimyo laboratoriyasi, sterillash xonasi, yuvish xonasi, oziq moddali muhitlarni pishirish xonasi va termostat xonasi. Barcha xonalar quruq, yorug', yaxshi shamollatilgan, gaz, sovuq va issiq suv hamda ularni chetga chiqarish qurilmasi bilan ta'minlangan bo'lishi kerak.

Mikrobiologiya laboratoriyasida talabalar o'quv va ilmiy-tadqiqot ishlarni amalga oshiradilar. Stollar deraza yaqinida, imkon qadar ko'proq yorug'lik tushishiga mo'ljallab joylashtiriladi. Mikroskopda ko'rish ishlari uchun yorug'lik bir tekisda taqsimlangan bo'lishi kerak. To'g'ri tushayotgan quyosh nurlari ko'zni charchatadi, ko'rish qobiliyatiga, optik asboblarga va mikroorganizmlarga zarar yetkazadi. Xona devorlari och rangli moyli buyoqlar bilan bo'yaladi. Pol esa lenolium yoki oson yuviladigan plitalar bilan qoplanadi. Stollarning balandligi 0,7 m dan oshmasligi kerak. Stollarning yuza qismi yuvish va dezinfeksiya qilish oson bo'lishi uchun plastik yoki lenolium bilan qoplanishi lozim. Ish jarayonida foydalaniladigan stul va taburetkalar vintli bo'lishi kerak.

Mikrobiologiya laboratoriyasi xonasi bir kunda ikki marta nam latta bilan artib chiqiladi. Pol, devorlar va mebel vaqti-vaqti bilan changyutkich bilan ishlanadi va 2-3% li soda aralashmasi (natriy bikarbonat), 3-5% li fenol yoki lizol aralashmasi (yashil sovun qo'shilgan fenol preparati), 0,5-3% li xloramin aralashmasi bilan artib chiqiladi. Bundan tashqari, bir oyda iki-uch marta, ayniqsa mitselial zamburug'lar bilan ishlagandan keyin, laboratoriya xonalarida havodagi va turli yuzalardagi mikroorganizmlarni yo'q qilish uchun ultrabinafsha nurlanishli bakteriotsid chiroqlar bilan 30 minutdan bir necha soatgacha

ishlov beriladi. Shuni unutmaslik kerakki, ultrabinafsha nurlar ko‘z shox pardasining o‘tkir yallig‘lanishiga olib kelishi mumkin. Bunda, nur ta’sir qilgandan so‘ng, ko‘p o‘tmasdan ko‘zdan yosh kelishi va yorug‘likdan qo‘rqish kabi belgilar yuzaga keladi. Shu boisdan ham himoya ko‘zoynaklaridan foydalanish lozim. Bakteriotsid chiroq yoqilgan kichik xonalarda o‘tirish mumkin emas.

Mutloq sterillikni talab etuvchi ba’zi ishlar (toza kulturalarni qayta ekish, mikroorganizm kulturalarini ajratish, ekish, ilmiy-tadqiqot ishlari) izolyatsiya qilingan maxsus xonalar – bokslarda amalga oshiriladi. Boks oldida maxsus dahliz (tambur) bo‘lib, tashqaridan havo va u bilan birga mikroorganizmlar kirmaydigan qilib oynalangan bo‘lishi kerak. Boks devorlari plitalar bilan qoplanishi yoki moyli oq bo‘yoq bilan bo‘yalishi, poli esa lenolium bilan qoplanishi kerak. Boksdan stol, stullar, gaz gorelkalari joylashtiriladi, bakteriotsid chiroqlar osib qo‘yiladi yoki qo‘zg‘aluvchan kronshteynga mahkamlanadi. Boks xonalari vaqti-vaqti bilan yuvib turiladi va dizenfeksiya qilinadi. Xona yig‘ishtirilgandan keyin, ish boshlashdan oldin, poldan 2 m balandlikda joylashtirilgan bakteriotsid chiroqlar bilan nurlantiriladi.

Biokimyo laboratoriyasi kimyo stollari, havosi almashinadigan shkaflar, idish va reaktivlar uchun shkaflar, shuningdek zaruriy asboblari – fotoelektrokolorimetrlar (FEK), spektrofotometr, pH-metr, texnik va analitik tarozilar, sovutgichlar, vakuum-nasoslar va shu kabilar bilan jihozlanadi.

Preparatlar xonasida ish stollari, turli asboblari, idishlar va reaktivlar joylashtiriladigan shkaflar, sentrifuga va boshqa vibratsiya apparatlari, preparat va toza to‘plamlarni saqlash uchun sovutgichlar, termostatlar joylashtiriladi.

Sterillash xonasida oziq muhitini va idishlarni sterillash uchun avtoklavlar, ishlatilgan laboratoriya idishlariga (tirik mikroorganizmlar qolgan kolbalar, probirkalar, pipetkalar) issiqlik bilan ishlov berish uchun alohida avtoklav, Kox qaynatgichi, quritish shkaflari, asboblari sterilizatori va stol joylashtirilishi kerak. Sterillash xonasi sterilizatorni ochgandan keyin chiqadigan bug‘ qoldiqlarini chiqarib yuborish uchun yaxshi ventilyatsiya moslamasi bilan jihozlangan bo‘lishi lozim. Sterilizatordan chiqayotgan bug‘, bosim ko‘tarilmasdan avval rezina naycha bilan tashqariga yoki suvli chelakka yo‘naltiriladi. Eshik (oynalanmagan) va deraza tashqariga ochilishi kerak.

Yuvish xonasi issiq va sovuq suv o‘tkazilgan qulay rakovina yoki vannalar, idishlarni quritish uchun stellajlar, gaz yoki elektr plitalari,

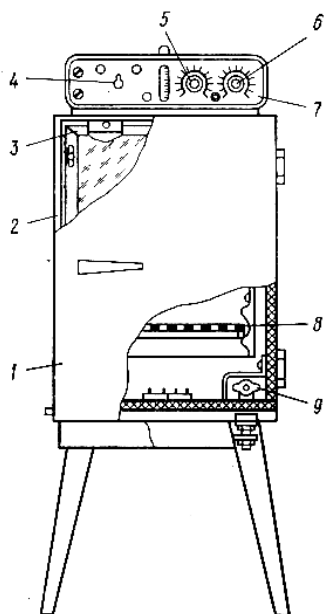
oziq muhitlarini qaynatish uchun idishlar, tarozilar, suv distillyatorlari bilan jihozlanadi. Yuqori xonasida havosi almashiladigan, quritish va boshqa shkaf bo'lishi kerak. Havosi almashiladigan shkaf suv bug'lari hamda shisha va idishlarni yuvishda ishlatiladigan ba'zi reaktivlarni chiqarib yuborishda kerak bo'ladi. Pol va devorlar plita bilan qoplangan bo'lishi kerak.

Termostat xonasida kolba va probirkalar uchun stellajlar qo'yiladi, maxsus fundamentda rotatsion tebratgichlar o'rnatiladi. Termostat xonasidagi harorat 30-45°C atrofida bo'lishi kerak.

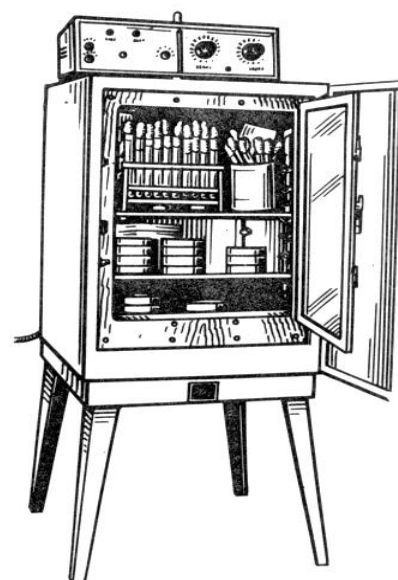
O'quv laboratoriyasida har qaysi talabaga doimiy ish joyi va asboblarni biriktirib qo'yiladi. Laboratoriya stolida mikroskop uchun yoritgich, spirt yoki gaz gorelkasi, buyoqlar to'plami, bakteriologik ilmoq va ignalar, probirkalar uchun shtativ, pipetkalar, shisha shpatellar, oddiy va chuqurchali buyum shishalar, qopqoq shishalar, shisha ko'prikcha va preparatlarni bo'yash uchun vannacha, doka salftka, shishaga chizadigan qalam, immersion yog', qum soat, buyum shisha o'lchamida kesilgan filtr qog'oz, gugurt, dezinfeksiya qilish uchun suyuqlik, paxtali banka bo'lishi kerak. Mikroskop stolga joylashtiriladi va shisha qalpoq yoki polietilen yopqich bilan berkitib qo'yiladi. Ish joyi juda toza holda saqlanishi kerak. Stolning usti lizol, 70% li (hajmi bo'yicha) etanolli xloramin shimdirilgan paxtali tampon bilan artiladi.

Apparat va asboblarni. Termostatlar (1, 2-rasm – havoli, suvli) berilgan doimiy haroratda oziq muhitida mikroorganizmlarni o'stirish uchun mo'ljallangan. Laboratoriyada alohida guruh mikroorganizmlarni rivojlantirish uchun talab etiladigan turli haroratli bir nechta termostat: mezofillar uchun – 28-30°C, termofillar uchun – 43-55°C, patogen turdofillar uchun – 37°C li termostatlar o'rnatiladi. Termostatlar har xil shaklda, o'lchamda va tuzilmali bo'ladi. Ular unchalik katta bo'lmagan shkaf ko'rinishidan bir nechta bo'limlardan tashkil topgan politermostat yoki alohida termostat xonasigacha bo'lishi mumkin.

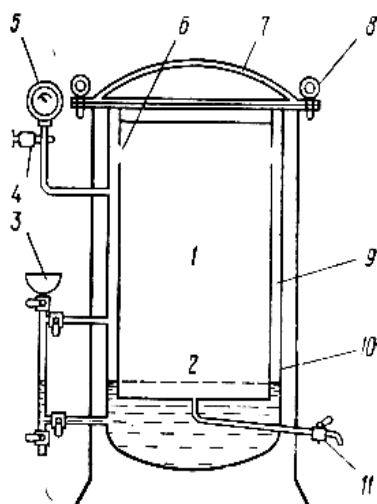
Termoregulyatorli quritish shkafi (4-rasm) laboratoriya idishlarini quritish va sterillash, turli materiallarni doimiy massasigacha quritish uchun mo'ljallangan. Quritish shkafi issiqlikka chidamli materiallardan (metall va asbest) tayyorlanadi va ishchi kamerasi 200°C gacha bo'lgan haroratga mo'ljallanadi. Shkafning ichi teshikli metall listlardan tayyorlangan polkalar bilan jixozlangan bo'lib, ularning ustiga quritiladigan idishlar yoki materiallar joylashtiriladi.



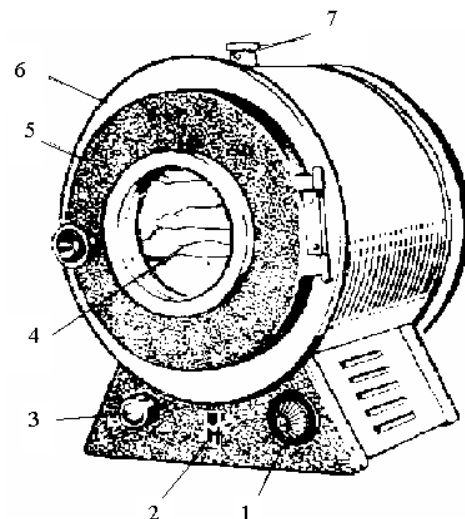
1-rasm. Quruq havoli elektr termostat:
1 – tashqi eshik; 2 – korpus; 3 – ichki eshik;
4 – termostatni elektr tarmog‘iga ulaydigan
tumbalar; 5 – haroratni aniq o‘rnatish uchun
potensiometr; 6 – haroratni taxminiy
o‘rnatish uchun potensiometr; 7 – boshqarish
bloki; 8 – tokchalar; 9 – isituvchi element.



2-rasm. Termostat.
Tokchalarda mikroorganizmlar
ekilgan probirkalar va Petri
likopchalari.



3-rasm. Avtoklavning tuzilish sxemasi:
1 – sterilizatsiyalash kamerasi; 2 –
sterilizatsiya qilinadigan materiallarni
qo‘yadigan taglik; 3 – avtoklavga suv quyish
uchun voronka; 4 – saqllovchi klapan; 5 –
manometr; 6 – sterilizatsiyalash kamerasiga
bug‘ o‘tadigan teshik; 7 – qopqoq; 8 – vintli
qisqich; 9 – suv-bug‘li kamera; 10 – qozon;
11 – suvni tushirib yuboradigan kran.



4-rasm. Quritish shkafi:
1 – shkalali termoregulyatorni
dastasi; 2 – asbobni o‘chiruvchi
murtat; 3 – signal beruvchi lampa;
4 – taglik; 5 – eshikcha; 6 –
korpus; 7 – termometr uchun
teshik va ventilyasiya qalpoqchasi.

Sovutkichlar ishlatiladigan yoki muzeyga oid mikroorganizmlar kulturasini, oziq muhitlari, ba'zi bir reaktivlar va aralashmalarni $+4^{\circ}\text{C}$ atrofidagi haroratda saqlash uchun ishlatiladi.

Sentrifuga suspenziya va aralashmalarining suyuq va qattiq fazalarini ajratish uchun xizmat qiladi. Sentrifuga ikkita rotor bilan jihozlangan bo'lib, ular elektr dvigatelining valiga ketma-ket o'rnatiladi: to'rtta stakanli rotor-prestavina va shisha yoki polietilen probirkalar uchun uyachalari bo'lgan burchakli rotordan iborat. Rotorlarning aylanish tezligi – 2000 dan 6000 gacha aylanish/ minutga teng bo'ladi.

Laboratoriya pH-metri vodorod ionlarining (pH) faolligi va oksidlanish-qaytarilish potensialini o'lchash uchun mo'ljallangan.

Refraktomer quruq moddalar, shakar, spirt, aminokislotalar, vitaminlar va ekstrativ moddalar miqdorini aniqlash uchun ishlatiladi. Shkala sindirish ko'rsatgichni va quruq moddalar miqdorining massasi foizini ko'rsatadi.

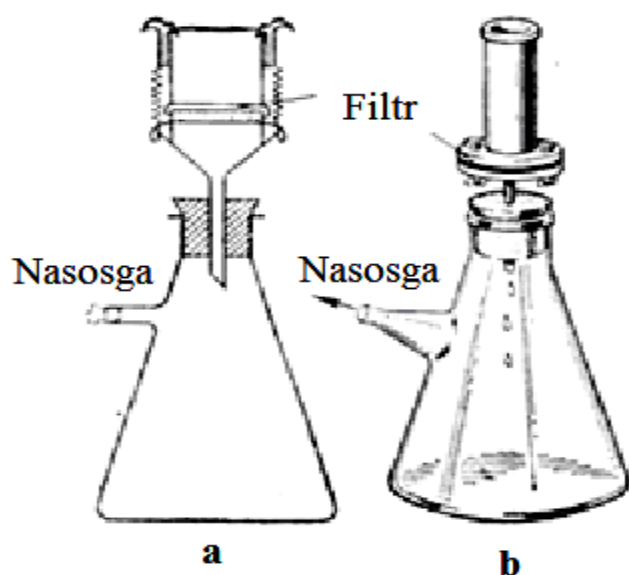
Fotoelektrokolorimetr bo'yalgan va kaloid aralashmalarining optik zichligi hamda o'tkazuvchanlik ko'effitsiyentlarini o'lchash uchun qo'llaniladi. Asbob 315-630 nm spektr doirasida ensiz tasmali yorug'lik filtrlari to'plami bilan jihozlanadi. Kolorimetr – nefelometr aralashmalarining loyqalanish darajasi bo'yicha mikroorganizm hujayralari konsentratsiyasini baholash imkonini beradi.

Spektrofotometr optik zichligini hamda suyuq va qattiq moddalarining o'tkazuvchanlik koefitsientlarini o'lchash uchun ishlatiladi.

Zeys filtrlari asbest va sellyuloza aralashmasidan tayyorlangan, qalinligi 3-5 mm va diametri 33-140 mm bo'lgan disklardan tashkil topgan bo'lib, sellyuloza miqdori ortib borgan sari filtrning g'ovakligi oshadi. Filtrlar, odatda nikellangan metall dan tayyorlangan voronkaga (5-rasm) o'rnatiladi. Voronka ikki qismdan iborat: yuqori qismi silindr ko'rinishida va pastki qismi esa konus ko'rinishida bo'ladi. Ularning o'rtasiga metall to'rga asbest filtr qo'yiladi. Shundan keyin voronka burab qo'yiladi yoki maxsus vintlar yordamida zich qilib tortiladi. Ensiz tubus esa bunzen kolbasining rezina tiqiniga o'rnatiladi.

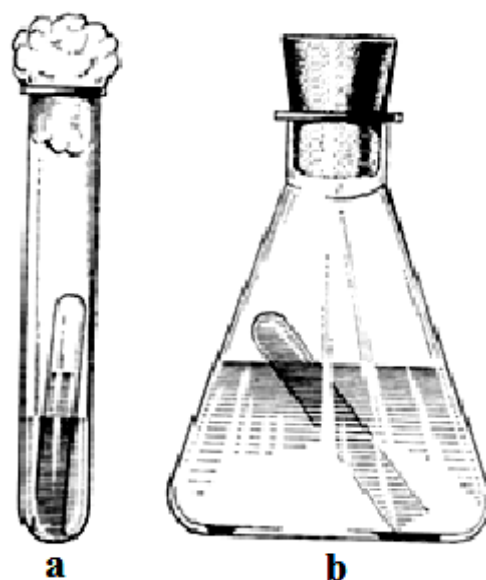
Idishlar. Mikrobiologik tadqiqotlar uchun har xil shisha idishlar talab etiladi. Petri likobchasi (diametri 10 sm, balandligi 1,5 sm) qattiq oziq muhitda mikroorganizmlarni o'stirish uchun, tebratgichga o'rnatiladigan kolbalar aerob mikroorganizmlarni o'stirish uchun, probirkalar va naychali kolbalar bijg'ish jarayonlarini o'rganish uchun qo'llaniladi. Shuningdek, oddiy kimyoviy idishlardan ham keng

foydalaniladi. Bular jumlasiga tubi yassi, konussimon, Erlenmeyer kolbasi, tubi dumaloq, o'lchov kolbalari; darajalangan (1, 2, 5, 10 ml li) pipetkalar, mor pipetkalari (1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100 ml li), kapillyarli Paster pipetkalari, 18x2,0, 18x1,5, 15x1,5 sm li agronomik probirkalari (rangsiz), byuretkalar, tomizg'ichlar, voronkalar, menzurka, silindr, byuksva boshqalar kiradi.



5-rasm. Zey's filtrari:

a – shisha tutqichli; *b* – metall tutqichli



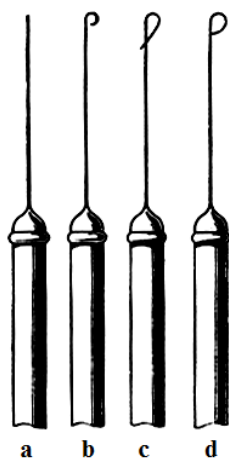
6-rasm. Paxta tiqinlarni tayyorlash:

a – to'g'ri; *b* – noto'g'ri

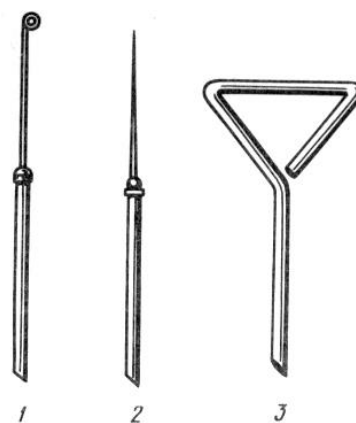
Paxtali tiqinlarni tayyorlash. Oziq muhitlarini tayyorlash va sterillash hamda mikroorganizmlar to'plamini o'stirish uchun ishlatiladigan kolba va probirkalar paxtali tiqinlar (6-rasm) bilan berkitiladi. Tiqinlar qo'lda yoki maxsus mashina yordamida tayyorlanadi. To'g'ri tayyorlangan tiqin 3-5 sm uzunlikda, probirkaga zich kiradigan, mahkam va ko'p marta ishlatilganda o'z shaklini o'zgartirmaydigan bo'lishi kerak. Agar paxtali tiqimni doka bilan o'rab, yuqori qismi ip bilan mahkam bog'lab qo'yilsa, u yaxshi saqlanadi.

Jihoz. Mikrobiologiya amaliyotida ilmoqlar, ninalar, shpatellar (7, 8-rasm), pinset, qaychi, tiqimlar uchun parma, pipetkalar uchun metall silindr probirkalarni sterillash uchun teshikchali sim yoki metall savatchalar, probirkalar uchun plastmassa yoki metall shtativlar va shu kabi boshqa jihoz qo'llaniladi.

Ilmoq va ninalar uzunligi 8 sm va diametri 0,4-0,5 mm bo'lgan platina, nikel yoki xromli nikel simlardan tayyorlanadi, hamda shisha yoki metall ushlagichlarga payvandlanadi. Ekish uchun shpatellar 4-5 mm qalinligdagi shisha tayoqchalardan tayyorlanadi.



7-rasm. Mikroblarni ekishda qo'llanadigan igna (a) va ilmoq:
b va *c* – ilmoq noto'g'ri bajarilgan;
d – ilmoq to'g'ri bajarilgan.



8-rasm. Mikroorganizmlarni ekishda qo'llanadigan asboblari:
 1 – mikrobiologik ilmoq; 2 – mikrobiologik igna; 3 – shpatel.

2. Texnik mikrobiologiya laboratoriyasida ishlash qoidalarini

Texnik mikrobiologiya laboratoriyasida ishlayotganda havfsizlik texnikasi va qoidalariga rioya qilinishi lozim. Texnik mikrobiologiya laboratoriyasida faqat oq xalat, shapkacha yoki durrachada ishlash talab etiladi.

Laboratoriyaga begona buyumlarni olib kelishga ruxsat etilmaydi. Ish joyida ortiqcha narsa bo'lmasligi kerak. Faqat bitta joyda ishlash, o'ziga birkirilgan asbob uskunalaridan foydalanish va barcha narsalarni belgilangan joylarga qo'yish lozim. Ichida mikroorganizmlar kulturasi bo'lgan kolba va probirkaga siyoh bilan aniq qilib yozilishi, reaktivlar va aralashmalar solingan idishlarga esa yorliqlar yopishtirilishi kerak. Spirtovkalar bilan ishlayotganda spirt bug'larining alanganib ketishidan ehtiyot bo'lish lozim. Spirtovkani yonib turgan boshqa spirtovkadan yondirish mumkin emas. Spirtovkani faqat maxsus qalpoqchalar bilan o'chirish kerak. Paxtali tiqinlar yona boshlaganda ularni puflab o'chirishga harakat qilmaslik kerak. Bu yonishni kuchaytiradi xolos. Yonayotgan tiqinni probirkaga, kolbaga tiqish yoki ustiga mato yopish kerak.

Ishni boshlashdan oldin va ish tugagach, tadqiqot o'tkazilayotgan stol usti yuviladi hamda dezinfeksiya qilinadi. Mikroorganizmlar biomassasi qo'l, stol va atrofdagi narsalarni ifloslantirmasligi zarur. Ilmoqlar, ninalar va pinsetlarni mikroorganizmlarga tekkandan so'ng spirtovka yoki gaz gorelka bilan kuydirish va mahsus shpatelga qo'yish kerak. To'kilib ketgan mikroorganizmlar suspenziyasini dezinfeksiya vositalari yordamida zararsizlantiriladi.

Ish tugagandan keyin mikroblar bilan ifloslangan idishlarni qaynatish yoki avtoklav yo‘li bilan sterillab, tirik hujayralarni o‘ldirish kerak. Shundan keyingina idishlarni yuvish mumkin. Mikroblar qattiq muhitning yuzasiga dezinfeksiya eritmasi quyiladi. Bir sutka o‘tgandan so‘ng muhitni tashlab yuborish, idishni yuvish mumkin. Ishlatilgan pipetkalar 3% li xloramin eritmasiga solib qo‘yiladi va shundan keyingina ular yuviladi va sterillanadi.

Buyum va qoplama shishalar ham ish tugagandan so‘ng dezinfeksiya aralashmasiga solib qo‘yiladi va keyin oqar suvda yaxshilab yuviladi. Idishlarni faqat rezina qo‘lqoplar yordamida yuvish lozim. Mikroorganizmlar bilan pala-partish ishlash natijasida havoda mikrob aerosoli hosil bo‘lishi mumkin.

Bakteriotsid chiroqlar bilan ishlayotganda oddiy himoya ko‘zoynagini taqib olish kerak. Chiroq nuriga himoyasiz ko‘z bilan qarash mumkin emas. Bu ko‘rish qobiliyatining yo‘qolishiga olib kelishi mumkin.

Yuqori bosim kuchlanish ostida yoki yuqori haroratda ishlaydigan apparatlar bilan ishlayotganda xavfsizlik qoidalariga qat’iy rioya qilinishi talab etiladi.

Laboratoriyada chekish, ovqatlanish, suv ichish, ko‘p yurish ruxsat etilmaydi.

Mikrob kulturalarini laboratoriya xonasidan chetga olib chiqish qat’iyan man etiladi.

Mashg‘ulot tugagandan so‘ng ish joyi va uskunalarni tartibga keltirish lozim. Kimyoviy reaktivlar bilan ishlash qoidalariga rioya qilish kerak. Shaxsiy gigiena qoidalariga ham qat’iy rioya qilish lozim.

Ish tugagandan so‘ng va ovqatlanishdan oldin qo‘llarni dezinfeksiya qilish va sovun bilan yaxshilab yuvish kerak.

Talabalar va laboratoriya xodimlari instruktaj o‘tkazilganligi va laboratoriyada ishlash tartibi bilan tanishtirilganligi to‘g‘risida maxsus jurnalda qayd qilinadi.

Sinov savollari:

1. Termostatlar nima maqsadda ishlatiladi?
2. Termoregulyatorli quritish shkafi nima uchun mo‘ljallangan?
3. Mikrobiologik tadqiqotlar uchun qanday shisha idishlar talab etiladi?
4. Bakteriotsid chiroqlar bilan ishlayotganda nimalarga ahamiyat berish kerak?

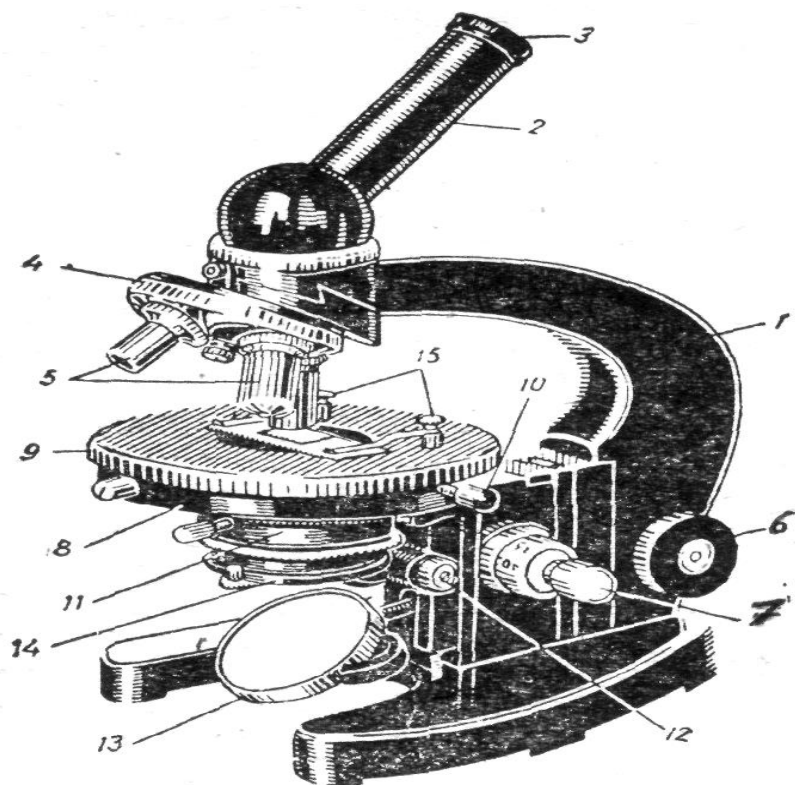
2-laboratoriya ishi

Mikroskopiya usullari. Yorug'lik mikroskopining tuzilishi

Ishdan maqsad: Yorug'lik mikroskopining tuzilishini va uning ishlash prinsipini o'rganish.

Mikroorganizmlarni o'rganish uchun har xil tuzilgan mikroskoplar ishlatiladi. Hozir oddiy yorug'lik mikroskopidan tashqari, elektron mikroskop ham ko'p ishlatiladi. U bakteriyalar hujayrasini 100-200 ming marta kattalashtirib ko'rsatadi.

Deyarli hamma o'rta maktablar laboratoriyasida Yorug'lik mikroskopi ishlatilishi sababli uning tuzilishi ustida qisqacha to'xtalib o'tamiz (9-rasm). Shtativ (1) mikroskopning ayrim qismlarini o'rnatish uchun ishlatiladi. Tubus (2) ga tekshiriladigan obyektни turli kattalikda ko'rsatadigan okulyar (3) o'rnatilgan. Okulyarning ko'rsatish darajasi uning halqasidagi 7x, 10x va 15x belgilar bilan ifodalanadi. Tubusning pastki uchiga revolver (4) vositasida obyektiv (5) o'rnatilgan. Obyektivlar ustiga 8x, 40x, 90x va 120x ishoralar yozilgan bo'lib, ular obyektivlarning kuchini, ya'ni tekshirilayotgan obyektни necha marta katta qilib ko'rsatayotganligini ifodalaydi. Mikroskopning necha marta katta qilib ko'rsatayotganligini aniqlash uchun, obyektivdagi raqam okulyardagi raqamga ko'paytiriladi.



9-rasm. Yorug'lik mikroskopi (MBI - 1).

Masalan, obyektiv 8x, okulyar 15x ga teng bo'lsa, obyektivning kattaligi shu sonlarni bir-biriga ko'paytirish natijasi ($8 \times 15 = 120$)ga teng keladi. Demak, kuzatilayotgan obyekt 120 marta katta bo'lib ko'rinadi. Kuzatilayotgan obyekt mikroskopdagi makrovint (6) yordamida topiladi. Tekshirilayotgan obyektning aniqroq ko'rish uchun mikrovint (7) ishlatiladi. U juda nozik ishlangan mexanizm bilan bog'liq bo'lganidan uni ortiqcha burash yaramaydi. Ikki qavatli stolcha (8) ning ostki qavatida shtativga mahkam biriktrilgan bo'lib, u stolchani ustki qavatida (9) ni tutib turadi. Stolchani ustki qavatida harakatchan bo'lib, uni o'ngga, chapga, orqaga va oldinga surish mumkin. Buning uchun stolchani ikki tomonidagi vintlar (10) dan foydalaniladi. Buyum oynasi qo'l bilan oldinga yoki bir chekkaga surilganida tekshirilayotgan obyekt ko'zga chalinmay qolishi mumkin. Shu sababli uni qo'l bilan emas, balki stolchani harakatga keltiradigan vintlar bilan surib, mikroskop doirasining markaziga keltirish kerak. Abbe kondensori (11) maxsus oynalardan tuzilgan bo'lib, mikroskopga yorug'lik to'plash maqsadida ishlatiladi. Kondensor yuqoriga ko'tarilsa, tubusga tushadigan yorug'lik nurining kuchi ortadi. Kondensorni harakatga keltirish uchun mikroskop stolchasi ostiga o'rnatilgan vint (12) buraladi. Mikroskopdagi oyna (13) yorug'likni o'lchash maqsadida qo'llaniladi. Yorug'lik kuchayib ketsa, u holda kondensor ostidagi halqacha (14) ga oq yoki havo rang va boshqa tushadigan shisha filtrlar o'rnatiladi. Buyum oynasini siljitmay bir o'rinda saqlash maqsadida oynani mahkamlovchi qisqich (15) lar ishlatiladi.

Mikroorganizmlarni tekshirganda, asosan, 90x yoki 120x li obyektivlar qo'llaniladi. Bu obyektivlar **immersion** yoki **moyli obyektiv** deyiladi. 90x va 120x li obyektivlarni ishlatish vaqtida tayyorlangan va kuzatilayotgan obyektga kedr yoki kastorka moyi tomiziladi. So'ngra moy tomchisiga immersion obyektivning uchi botiriladi. Kondensor yuqoriga surilib oxirigacha ko'tariladi. Bu paytda kondensorda to'plangan yorug'likning hammasi moy tomchisi orqali o'tib, muhitda tarqalmasdan immersion obyektivga boradi. Tekshirilayotgan obyekt esa juda aniq va ravshan ko'rinadi. **Quruq sistemada**, ya'ni 8x yoki 40x obyektivlarda qaralganda moy ishlatilmaydi. Obyektiv bilan obyekt o'rtasida havo bo'shlig'i bo'ladi. Havo bo'shlig'i orqali o'tgan yorug'likning bir qismi obyektivga bormasdan yo'qoladi. Chunki havoning yorug'lik sindirish koeffitsiyenti ($n=1,0$), buyum oynasining yorug'lik sindirish koeffitsiyenti ($n=1,52$) dan pastroq bo'ladi. Bunda yorug'likning bir qismi yo'qolishi natijasida obyekt ham yaxshi ko'rinmaydi. Shu sababli immersion sistema

qo'llaniladi. Bunda moyning yorug'lik sindirish koeffitsiyenti ($n=1,515$) bilan buyum oynasining yorug'lik sindirish koeffitsiyenti ($n=1,52$) bir-biriga yaqin bo'lishi yorug'likning chetga tarqalishiga yo'l qo'ymaydi. Yorug'likning hammasi obyektiv ichiga o'tib ketadi. 8x li obyektiv ishlatilganda kondensor oxirigacha pastga tushirilgan holda bo'ladi, 40x li obyektiv ishlatilganda esa bir oz yuqoriga ko'tariladi.

Tekshirish tugallangandan so'ng 90x yoki 120x li obyektiv ustidagi kedr moyini avval filtr qog'oz, so'ngra benzin shimdirilgan mayin latta bilan artib olish zarur. Immersion obyektivlarni ehtiyotlik bilan ishlatish kerak.

Sinov savollari:

1. Mikroskopning qanday turlari bor?
2. Mikroskop qanday qismlardan iborat?
3. Mikroskopning necha marta kattalashtirilishi qanday aniqlanadi?
4. Tekshirish tugallangandan so'ng obyektiv ustidagi kedr moyi nima yordamida artiladi?

3-laboratoriya ishi

Mikroorganizmlarni fiksatsiyalangan va bo'yalgan holda tekshirish

Ishdan maqsad: Mikroorganizmlar hujayralarini fiksatsiyalangan va bo'yalgan holda tekshirish va ularning shaklini aniqlash.

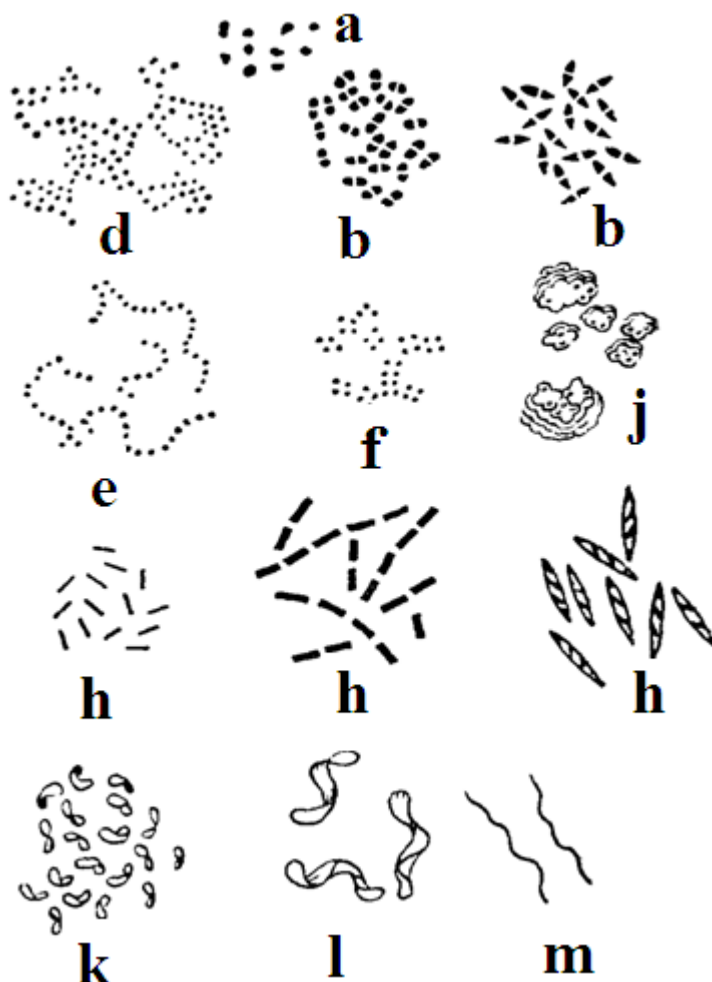
Kerakli jihozlar: mikroskop, buyum oynasi, bakterial ilmoq, spirt lampa, to'xtab qolgan suv yoki tish kiri, filtr qog'oz, lyoffler sinkasi yoki fuksin bo'yog'i.

Nazariy tushuncha: Bakteriyalarning shakli va o'lchami xilma-xil bo'ladi. Sharsimon bakteriyalarning diametri 1-2 mkm dan katta bo'lmaydi, biroq ba'zi bakteriyalarning diametri 18 mkm ga etadi. Sharsimon bakteriyalar eng oddiy tuzilgan mikroorganizmlardir.

Yakka-yakka joylashgan bakteriyalar **kokk**, ikkitadan joylashganlari **diplokokk**, to'rttadan joylashganlari **tetrakokk**, sakkiztadan joylashganlari **sarsina** va bo'linish natijasida zanjir hosil qilganlari **streptokokk**, uzum shingili shaklidagilari **stafilokokk** deb ataladi.

Tayoqchasimon bakteriyalarning uzunligi 1-4 mkm, ko'ndalang kesimi 0,5-1 mkm dan oshmaydi. Lekin oltin gugurt bakteriyasi *Beggiato mirabilis*ning ko'ndalang kesimi 50 mkm ga etadi. Yirik bakteriyalar unchalik ko'p uchramaydi. Tayoqchasimon bakteriyalar asosan spora hosil qiladigan hamda spora hosil qilmaydigan ikki katta

gruruhga bo'linadi. Spora hosil qiluvchi bakteriyalar **batsillalar** deyiladi. Hujayrasi bir oz bukilib turgan bakteriyalar **vibrion**, bir necha marta oddiy bukilib spiral shaklida bo'lganlari **spirilla** va oddiy spiral shaklidagilari **spiroxeta** deyiladi (10-rasm).



10-rasm. Mikroorganizmlarning shakllari:

a – kokklar; b – diplokokklar; d – stafilokokklar; e – streptokokklar; f – tetrakokklar; j – sarsinalar; h – tayoqchasimon bakteriyalar va batsillalar; k – vibrionlar; l – spirillalar; m – spiroxetalar.

Bulardan tashqari, oddiy mikroskopda ko'rinmaydigan 0,02-0,03 mkm yoki 20-30 nm kattalikdagi tirik organizmlar ham bor. Ular maxsus filtr orqali o'tib ketganligi sababli **filtrlanuvchi viruslar** deb ataladi. Filtrlanuvchi viruslar yoki ultramikroblar qatoriga **bakteriofaglar** ham kiradi. Bakteriofaglar lizin moddasi ajratadi. Lizin ta'sirida zararli mikroblar nobud bo'ladi, ya'ni erib ketadi.

Mikrobiologiyaga oid mashg'ulotlar vaqtida yuqumli kasalliklar

bilan zararlanmaslik uchun, ehtiyotlik bilan ishlash, jumladan, mashg'ulot boshlashdan oldin va uni tugatgandan so'ng qo'lni sovunlab yuvish hamda boshqa sanitariya-gigiyena qoidalarini bajarish zarur, aks holda ko'ngilsiz oqibatlar yuz berishi mumkin.

Mikroorganizmlarning shakli quyidagi mashg'ulotlar vaqtida o'rganiladi.

Ishning borishi: Bu mashg'ulotda 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 ilmoq yordamida bir tomchi olib, buyum oynasiga surkaladi, ya'ni surtma tayyorlanadi. Surtma quritiladi. So'ngra bakteriyalarni oyna ustida fiksatsiyalash maqsadida, oyna spirt lampa alangasi ustidan 2-3 marta o'tkaziladi. Tayyorlangan preparat ustiga 2-3 tomchi lyuffler sinkasi yoki fuksin bo'yog'i tomiziladi. Oradan 1-2 minut o'tgach, bo'yoq yuviladi. Preparat ustidagi suv tomchilari filtr qog'ozga shimdirib quritiladi. So'ngra surtma ustiga bir tomchi kedr yoki kastorka moyidan tomizib, u avval quruq (moyga botirilmagan, 8x li) va keyin immersion obyektiv orqali tekshiriladi. Preparatda sharsimon, tayoqchasimon, spiralsimon va boshqa shakldagi mikroblar borligi aniqlanadi.

Oddiy va differensial bo'yash va ularga tavsif.

Mikroblarni bo'yashning oddiy va murakkab usullari bor.

Oddiy bo'yash usulida bo'yoqlardan faqat birontasi suyultirilgan fuksin (2-3 minut davomida bo'yaladi), metilen sinkasining suvli eritmasi, ishqorli sinka (3-5 minut davomida bo'yaladi) qo'llaniladi.

Murakkab (yoki differensial) bo'yash usullarida 2-3 bo'yoq ishlatiladi. Bu usullar mikroblarning turli bo'yoq va reaktivlarga turlicha munosabatda bo'lishiga asoslangan. Shuning uchun murakkab bo'yash usullari mikroblar hujayralarning tuzilishini mukammal o'rganish va mikroblarning ayrim turlarini bir-biridan ajratish uchun qo'llaniladi.

Mikroblarni murakkab bo'yashdagi universal usul – Gram usulida bo'yashdir.

Gram usulida bo'yash mikroblarni differensial bo'yashdagi asosiy usuldir. Bunda hamma bakteriyalar ikki guruhga bo'linadi. **Gram usulida bo'yaladigan** – Grammusbat mikroblar (Gram+) deb ataladigan mikroblar va **Gram usulida bo'yalmaydigan** – Grammanfiy (Gram-) mikroblarga bo'linadi. Mikroblarning Gram usulida bo'yalish-bo'yalmasligi ularning xususiyatlarida albatta ko'rinadi. **Gram usulida**

bo'yashning mohiyati shundan iboratki, Grammusbat mikroblar binafsha bo'yoqlar (gensianviolet, metilviolet, kristalviolet) va yod bilan mustahkam birikma hosil qiladi. Bu birikma spirt ta'sirida bakteriya va zamburug'larning tanasidan ajralib chiqmaydi. Boshqa, Grammanfiy mikroblar esa bo'sh birikma hosil qiladi, bu birikma spirt ta'sirida ajralib chiqadi, natijada mikroblar rangini yo'qotadi.

Grammanfiy bakteriyalarni aniqlash uchun preparat kontrast bo'yoq bilan qo'shimcha bo'yaladi, buning uchun eng yaxshi bo'yoq-suyultirilgan fuksindir.

Mikroblarning Gram usulida bo'yalish-bo'yalmasligi kimyoviy tarkibining xususiyatlari bilan izohlanadi. Grammusbat mikroorganizmlar protoplazmasining yuza qavatlarida ribonuklein kislotaning magniyli tuzi bor, u gensianviolet bilan birikib, spirtida erimaydigan birikma hosil qiladi.

Gram usulida bo'yash uchun quyidagi bo'yoq eritmaları va reaktivlar bo'lishi kerak: 1) karbolli gensianviolet (yoki metilviolet, yoki kristalviolet);

1. Lyugol eritmasi;
2. spirt;
3. suyultirilgan fuksin.

Lyugol eritmasi quyidagi tarkibga muvofiq tayyorlanadi:

Kristall yod-1 g.

Kaliy yodid-2 g.

Distillangan suv-300 ml.

Avval kaliy yodid 5-10 ml suvda eritiladi, so'ngra yod eritiladi, shundan keyin distillangan suv 300 ml gacha qo'shiladi.

Gram usulida bo'yash texnikasi. 1. Fiksatsiya qilingan preparatga bir parcha filtr qog'ozi yopilib, ustiga gensianviolet eritmasi quyiladi. Preparat 1-2 minut ichida bo'yaladi.

2. Bo'yoq to'qiladi va preparatni suv bilan yuvmasdan, tamomila qorayguncha, yani bir minut Lyugol eritmasi quyiladi.

3. Lyugol eritmasi to'kib tashlanadi, preparatni yuvmasdan bir necha (20-30) sekund 96°C li spirt quyilgan stakanchaga botiriladi yoki preparatga 96°C li spirtidan quyiladi. Binafsha bo'yoq oqimlari chiqib ketguncha preparatning rangi ketkaziladi.

4. Spirt suv bilan obdon yuvib tushiriladi.

5. Preparat suyultirilgan fuksin bilan 30-60 sekund ichida batamom bo'yaladi. Bo'yoq suv bilan yuvib tushiriladi, preparat quritiladi va mikroskopda ko'riladi. Grammusbat mikroblar to'q binafsha rangga,

Grammanfiy mikroblar esa qizil (pushti) rangga bo'yaladi.

Gram usulida bo'yash uchun Sinev modifikatsiyasini tatbiq etish, ya'ni gensianviolet eritmasi quyish o'rniga oldindan shu bo'yoq shimdirilgan filtr qog'ozdan foydalanish ham mumkin. Buning uchun gensianviolet eritmasi shimdirilgan filtr qog'oz parchasi buyum oynasidagi fiksatsiya qilingan preparat ustiga yopiladi va uning ustidan (1-2 minutgacha) bir necha tomchi suv quyiladi, so'ngra qog'oz parchasi tashlanadi va bo'yash yuqorida tasvir etilgandek davom ettiriladi.

Stafilokokklar, streptokokklar, ba'zi bir tayoqchalar: difteriya tayoqchasi, hamma sporali bakteriyalar (kuydirgi, qoqshol tayoqchalari va hokazo), achitqilar (drojji), nursimon zamburug'lar **Gram usulida bo'yaladi (Grammusbat mikroblar)**. Gonokokklar, meningokokklar, ko'pchilik tayoqchalar, vibriionlar, spirillalar, spiroxetalar, rikketsiyalar **Gram usulida bo'yalmaydi (Grammanfiy mikroblar)**.

Sporalarni bo'yash uchun maxsus murakkab bo'yash usullari qo'llaniladi, chunki sporalar zich qobig'i borligidan oddiy usulda bo'yalmaydi. Sporani bo'yamoq uchun (Ojeshko usuli) qobig'ini yumshatish kerak, buning uchun karbol kislota, xlorid kislota yoki boshqa moddalar bilan yuqori haroratda dorilanadi. So'ngra sporalar Sil-Nilsen usulida bo'yaladi. Bo'yalgan sporalar kislota ta'sirida rangini yuqotmaydi.

Bakteriyalar kapsulasini ko'rish. Preparat odatdagi usullar bilan bo'yalganda mikroblar kapsulasi ko'rinmaydi, chunki ular bo'yalmaydi. Kapsulalarni negativ preparatlarda qorong'i fonda ko'rish osonroq, buning uchun buyum oynasidagi surtmani suvli fuksin bilan (5-10 minut) yoki boshqa bo'yoqlar bilan qo'shimcha bo'yash kerak (Gins usuli). Mikroskopda quyidagi manzara kurinadi: to'q qizil fonda rangsiz kapsula, qizil tayoqchalar ko'zga tashlanadi.

Zamburug'lar va achitqilarni mikroskopda tekshirish uchun bo'yalmagan preparatlar – ezilgan yoki osilgan tomchidan foydalaniladi.

Spiroxetalar asosan qorong'ilatilgan ko'rish maydonida yoki negativ preparatlarda tekshiriladi. Ba'zi spiroxetalarni bo'yalgan preparatlarda tekshirish mumkin, buning uchun maxsus bo'yash usullari (Romanovski-Gimza usulida bo'yash) tatbiq etiladi.

Sodda jonivorlarni tekshirishda turli usullar tatbiq etiladi. Sodda jonivorlar ba'zan tiriklayin tekshirilsa, ba'zan murakkab bo'yash usullari qo'llaniladi. Bu usul sodda jonivorlar hujayrasining struktura elementlarini (yadro, protoplazma va shunga o'xshashlarni) differensiallashga imkon beradi (Romanovski usuli).

Sinov savollari:

1. Stafilokokklar qanday ko‘rinishda bo‘ladi?
2. Bakteriofaglar nima?
3. Filtrlovchi viruslar nima?
4. Mikroorganizmlarni aniqlashni qanday usullarini bilasiz?
5. Gram usulida bo‘yash uchun qanday bo‘yoqlardan foydalaniladi?

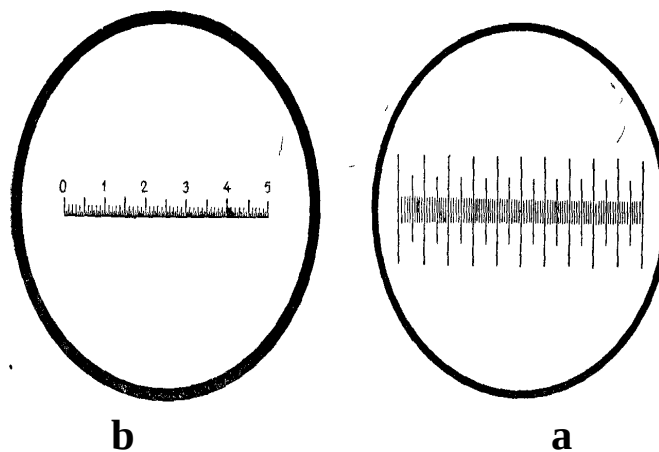
4-laboratoriya ishi

Mikroorganizmlarning o‘lchamini aniqlash

Ishdan maqsad: mikroorganizmlarni mikroskop, obyektiv mikrometr, okulyar mikrometr yordamida o‘lchamini aniqlash.

Kerakli jihozlar: mikroskop, obyektiv mikrometr, okulyar mikrometr.

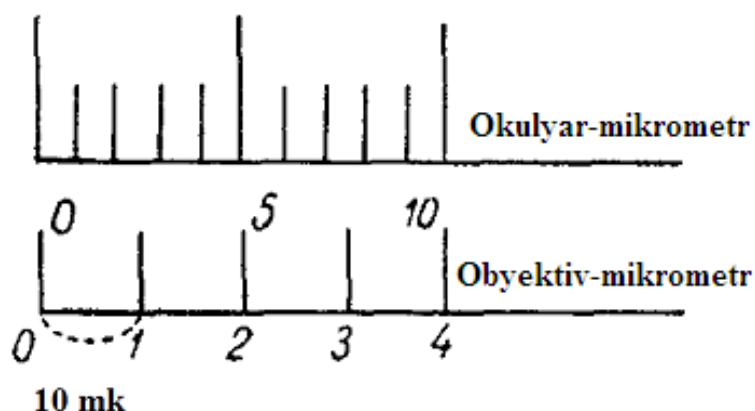
Ishning borishi: Bu mashg‘ulotda okulyar va obyektiv mikrometrlar (11-rasm) qo‘llaniladi. Okulyar mikrometr shishadan tayyorlangan doiradan iborat. Doiraning diametri mikroskop okulyarining diametridan bir oz kichikroq bo‘ladi. Okulyar mikrometr doirasining markazida 5 mm uzunlikdagi 50 ta chiziq bor. Chiziqlarning orasi 0,1 mm ga teng keladi (11-rasm, a).



11-rasm. a – obyektiv; b – okulyar mikrometrlar.

Mashg‘ulotni boshlashdan oldin okulyar mikrometr mikroskop okulyarining ichiga joylanadi. Mikroskopda qaragan vaqtda okulyar mikrometrning chiziqlari aniq ko‘rinadi, lekin chiziqlar o‘rtasidagi oraliqlar yuqorida ko‘rsatilgan darajaga teng bo‘lmaydi. Mikroskopning okulyar mikrometr chiziqlari o‘rtasidagi oraliqni aniq belgilash maqsadida obyektiv mikrometrdan foydalanishga to‘g‘ri keladi.

Obyektiv mikrometr buyum oynasiga ishlangan, ya'ni oynaning markaziga uzunligi 1 mm keladigan masofada 100 ta chiziq chizilgan. Bu chiziqlar orasi 0,01 mm, ya'ni 10 mkm, ga teng keladi.



12-rasm. Okulyar mikrometr chiziqlari o'rtasidagi oraliqlarni belgilash.

Obyektiv mikrometr yordamida okulyar mikrometr chiziqlari o'rtasidagi oraliqlar necha mikrometrga tengligi aniqlanadi. Buning uchun obyektiv mikrometr mikroskop stolchasiga joylanib, so'ngra okulyar mikrometr chiziqlari obyektiv mikrometr chiziqlari bilan taqqoslab ko'riladi. Agar obyektiv va okulyar mikrometr chiziqlari bir-biriga to'g'ri kelsa, okulyar mikrometr chiziqlari o'rtasidagi oraliqlar 10 mkm ga tengligini ko'rsatadi. Bordi-yu, okulyar chiziq oralig'ining beshtasi obyektivdagi 2 ta chiziq oralig'iga to'g'ri kelsa, u holda okulyardagi chiziq oralig'i 4 mkm ga teng bo'lib qoladi. Okulyar mikrometrdagi 5 ta chiziq orasi obyektiv mikrometrdagi chiziqlarning 10 bo'lagiga to'g'ri kelsa, u holda okulyar mikrometr chiziqlarining oraliqlari 2 mkm ga teng bo'ladi.

Obyekt yoki buyumni tekshirish vaqtida ishlatilayotgan okulyar yoki obyektiv o'zgartirilsa, okulyar mikrometrda ko'ringan chiziq oraliqlarining qiymati ham o'zgarishini hisobga olish lozim. Masalan, 8x li obyektivda ko'ringan chiziq oraliqlari 40x li obyektiv ishlatilganda boshqa songa tenglashib qoladi. Demak, bu sonni aniqlash uchun mikroskop stolchasiga obyektiv mikrometrni qo'yib, okulyarda ko'ringan chiziq oraliqlarining qiymatini qaytadan aniqlab olish lozim.

Okulyar mikrometr chiziqlari oraliqlarining qiymati aniqlangandan so'ng mikroskopda ko'ringan har qanday obyektning o'lchamini bimalol aniqlab olish mumkin.

Sinov savollari:

1. Mikroorganizmlarning o'lchamlari qanday aniqlanadi?
2. Okulyar mikrometr nima?
3. Obyektiv mikrometr nima?
4. Mikroskopning okulyar mikrometr chiziqlari o'rtasidagi oraliqni aniq belgilash maqsadida nimadan foydalanishga to'g'ri keladi?

5-laboratoriya ishi

Toza mikroorganizmlar kulturasini hisoblash usullari.

Mikroorganizmlar sonini aniqlash

Ishdan maqsad: Hisoblash kameralarida, fiksirlab bo'yalgan surtmalarda 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.

1. Mikroorganizmlar hujayrasini bevosita sanash

Hujayralarni hisoblash kamerasida sanash. Goryaev, Tom-Seys, Byuker va boshqalar kamerasida yirik mikrob hujayralarini – achitqilarni, bir hujayrali suv o'tlari, sporalar, zamburug'lar, ayrim bakteriyalarni sanash mumkin. Goryaevning 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 qoplag'ich oyna zich yopiladi.

Goryaev kamerasining to'ri 225 ta yirik kvadratga bo'lingan (15 ta qatorning har qatorida 15 tadan kvadrat bor). Yirik kvadratning maydoni $1/25 \text{ mm}^2$ ga teng bo'lib, har qaysisining maydoni $1/400 \text{ mm}^2$ bo'lgan 16 ta mayda kvadratga bo'lingan. Kameraning chuqurligi 0,1 mm ga teng. Kichik (mayda) kvadratning hajmi $1/4000 \text{ mm}^3$ yoki $1/4000000 \text{ ml}$, katta kvadratniki $16/4000=1/250 \text{ mm}^3$ yoki $1/250000 \text{ ml}$ ga teng. Katta kvadratlarning bir qismi vertikal, gorizontaal 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 konsntrasyalidan 1-2 ml qo'shiladi.

Non pishirish sanoati yarim fabrikatlar namunasini tayyorlashda G.M. Smirnova ishlab chiqqan usulga asoslanish mumkin: bunda 1 g namunani hovonchada 3-5 ml spirt bilan ezib (spirt oz-ozdan qo'shiladi), keyin 100 ml hajmli kolbachaga solinadi va 40-50 ml ga yetguncha suv qo'shiladi; to'xtovsiz chayqatib turib 1 ml 30% li natriy gidroksid (yoki kaliy gidroksid) eritmasi qo'shiladi. Keyin kolbacha 10 minut 70°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 siliqqangan qoplagich oynani yaxshilab yuvib quritiladi. Setkalar yuzasiga tayyorlangan kultura 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'kish va bir tekisda (bir sathda) ko'rinishi uchun kamera to'ldirilgandan 3-5 minutdan keyin hisoblash boshlanadi. Mikroorganizmlarning harakatchan formalarini 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, lekin ko'proq qismi muayyan kvadrat ichida bo'lgan hujayralar 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 $x = a \cdot 25 \cdot 10^4$ 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 hujayralarni hisobga olishda suyultirishni hisobga olish kerak.

Fiksirlab keyin bo'yalgan surtmalardagi 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. Surtmani 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'lib qolguncha 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 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:

$$\sigma_x = \pm \frac{\sqrt{\Sigma x}}{n}$$

95% ga teng darajali ko'rsatgichda ($R_{0,95}$) to'ring kvadratidagi (ko'rish maydonidagi) ehtimolga yaqin bo'lgan hujayralar soni ushbu formuladan foydalanib hisoblanadi: $x \pm 2 \sigma_x$

$R_{0,99}$ da ishonchli interval $\pm 2,7 \sigma_x$ ga muvofiqdir.

O'rganilayotgan substratning 1 g (1 ml) dagi hujayralarning ehtimolga eng yaqin sonini aniqlash uchun suyultirilganligini, suspenziyaning hajmini, surtmadagi okulyar setkasi kvadrati maydonini (ko'rish maydonini) hisobga olish zarur.

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

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

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

bu yerda: S – to'r kvadratining maydoni (mkm²), 0,05 – olingan suspenziyaning miqdori, $6 * 10^8$ – surtmaning maydoni, K – suspenziyaning suyultirilganligi.

2. Qattiq oziq moddali muhitga ekish usuli bilan mikroorganizmlar miqdorini aniqlash (Kox usuli)

Tabiiy va ishlab chiqarishdagi substratlardagi (suv, tuproq, xomashyo, yarim tayyorlangan mahsulotlar va tayyor mahsulotlardagi) mikroorganizmlar miqdorini aniqlashda mazkur usul keng qo'llaniladi. Har qanday tirik hujayra qattiq muhitga ekilganda koloniya hosil qiladi, deb hisoblaymiz.

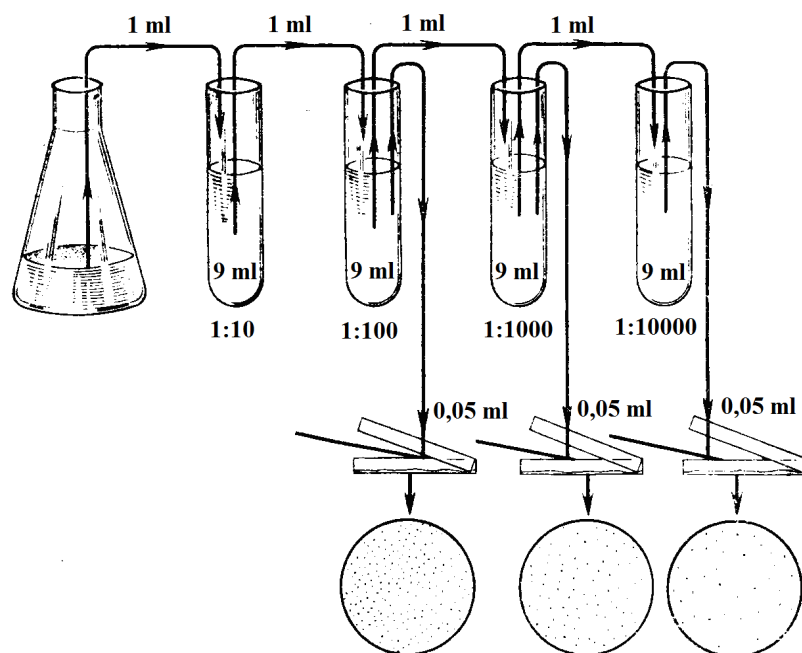
Buni tahlil qilish uch bosqichda bajariladi: namunali suyultirish, Petri likopchasidagi qattiq muhitga ekish va o'sib chiqqan koloniyalarni hisobga olish (sanash).

Namunali aralashtirib suyultirish. Alohida-alohida koloniyalar hosil qilish uchun o'rganilayotgan materialning namunasi oldin o'n karra suyultiriladi. Buning uchun sterillangan vodoprovod suvidan yoki fiziologik eritmadan (natriy xloridning 0,5% li eritmasidan) sterillangan quruq probirkalarga 9 ml dan quyiladi. Keyin dastlabki namunadan 1 ml (yoki 1 g) olib, aseptik ravishda birinchi probirkaga qo'shiladi va paxta tiqin bilan og'zini berkitib, yaxshilab aralashtiriladi. Natijada birinchi aralashma – 1:10 olinadi (13-rasm).

Birinchi suyultirishda hosil qilingan suspenziya sterillangan pipetka bilan yaxshilab aralashtiriladi. Buning uchun suspenziya bir necha marta pipetkaga tortib, yana chiqarilaveradi. So'ngra shu pipetkada 1 ml

suspenziya olib, ichiga 9 ml suv quyilgan ikkinchi probirkaga qo‘shiladi – bu ikkinchi suyultirish – $1:10^2$. Yana boshqa pipetka olib, xuddi yuqoridagi usulda uchinchi marta suyultiriladi – $1:10^3$, so‘ngra dastlabki (boshlang‘ich) materialdagi mikroorganizmlar miqdoriga qarab, 10 martagacha suyultirilaveradi.

Qattiq muhitga ekish. Suyultirilgan har qaysi suspenziyadan kamida ikki-to‘rtta parallel Petri likopchasiga yuza yoki chuqur qilib ekiladi. Yuza ekishda dastlab sterillangan Petri likopchasiga 15-20 ml dan eritilgan agarli muhit quyiladi. Keyin muhit sovishi uchun likopchalar gorizontal yuzada saqlanadi, so‘ngra muhitning quriganligini va sterillanganligini tekshirish uchun qopqog‘ini pastga qilib, 2-3 kun 30°C issiq termostatda saqlash tavsiya etiladi. Muhit bilan qopqoqlar yuzasidagi kondensatsion suv tomchilari yo‘qolguncha quritish davom etadi. Agar o‘ta nam sharoitda o‘sadigan mikroorganizmlar hisobga olinadigan bo‘lsa, agar sovishi bilanoq kultura ekiladi.



13-rasm. Aralashtirib suyultirishlarni tayyorlash sxemasi va ularni Petri likopchalariga ekish

Ekish uchun sterillangan o‘lchov pipetkasidan foydalaniladi. Unda suyultirilgan tegishli suspenziyadan ma’lum hajmda: 0,05; 0,1 yoki 0,2 ml (0,5 ml dan oshmasligi kerak) olib, likopchalardagi muhitga qo‘shiladi. Keyin sterillangan shpatel bilan qattiq muhit yuzasiga bir tekis yoyiladi. Agar suyultirilgan suspenziyada mikroorganizmlar konsntrasyasi yuqori bo‘lsa, shu shpatel bilan ikkinchi, ba’zan uchinchi

likopchadagi oziq muhitning yuzasiga ham surkaladi. Agar konsentratsiyasi past bo'lsa (ya'ni hujayralar kam bo'lsa), faqat bitta likopchaga shpatelda suyultirilgan suyuqlik yuqtiriladi. Ketma-ket suyultirilgan kamida uchta suspenziyadan olib ekiladi. Parallel ekishda bitta pipetkadan foydalanilaveradi. Boshqa suyultirilgan suspenziyadan foydalanishda sterillangan yangi pipetka ishlatiladi. Har xil darajada suyultirilgan suspenziyalardan olib ekishda bitta pipetkadan foydalanish mumkin, lekin ekishni eng ko'p suyultirilgan suspenziyadan boshlash kerak. Har qaysi suyultirilgan suspenziya uchun albatta sterillangan yangi shpatel olinadi.

Chuqur qilib ekishda sterillangan pipetkada tegishli suspenziyadan 1 ml dan olib, sterillangan 2-4 ta parallel Petri likopchasidagi muhitga quyiladi. So'ngra eritib, 46-48°C gacha sovitilgan agarli muhitdan 15-20 ml olib, ehtiyotlik bilan likopchaga qo'shiladi. Keyin qopqog'ini yopib, tezda likopchani sekin-sekin aylantirib, ichidagi oziq muhiti bilan ekilgan material yaxshilab aralashtiriladi. Shundan so'ng muhit sovishi uchun gorizontol holatda saqlanadi. Ekilgan va tegishli yozuvlar yozilgan likopchaning tubini yuqoriga qaratib termostatga qo'yiladi; bunda harorat mikroorganizmlarning o'sishi uchun qulay bo'lishi kerak. Anaeroblar hujayrasini hisoblash uchun ichida tekshiriladigan material bo'lgan likopchalar anaerostatga joylashtiriladi.

Koloniyalarni sanash. Mikroorganizmlarning turli guruhlari bir xil tezlikda o'smaydi. Ba'zilar tez, boshqalari sekin o'sadi. Shuning uchun bakteriyalar koloniyasi 2-3, zamburug'lar bilan achitqilar koloniyasi 5-7, aktinomisetlarniki 7-15 kundan keyin sanaladi. Koloniyalarni sanash uchun bir-biridan narida o'sgan va kamida 50-300 ta koloniya bo'lgan likopchalar tanlab olinadi. Likopchalarni qora fonga to'ngarib qo'yib, 8-10 marta kattalashtirib ko'rsatadigan lupada koloniyalar sanaladi. Har gal koloniyani sanab bo'lib, likopchaning ustiga siyohda yoki qalam bilan belgi qo'yiladi. O'sib chiqqan koloniyalar nihoyatda ko'p bo'lsa, Petri likopchasining tubi 4, 8 yoki 16 ta bir xil (teng) qismga bo'linib, har bir qismdagi koloniyalar sanaladi va natijasi umumlashtiriladi. Bir nechta qismdagi (lekin likopchadagi muhit maydonining kamida 1/3 qismidagi) koloniyalarni sanab, o'rtacha arifmetik qiymatini topish va butun likopchadagi qismlarning umumiy soniga ko'paytirish mumkin.

Sinov savollari:

1. Mikroob hujayralari qanday kameralarda hisoblanadi?
2. Qattiq muhitga ekish qanday amalga oshiriladi?

3. Non pishirish sanoati yarim fabrikatlar namunasini tayyorlashda qanday usuldan foydalaniladi?
4. Vinogradskiy-Shulgina-Brid usulini tushuntirib bering.
5. Mikroorganizmlar koloniyasi qanday sanaladi?

6-laboratoriya ishi

Mikrob biomassasini aniqlash

Ishdan maqsad: Mikroorganizmlar biomassasini turli usullar yordamida aniqlash.

Biomassani tortib ko'rish yo'li bilan aniqlash. Bu usul ishlab chiqarish va tadqiqot laboratoriyalarida quruq yoki nam biomassa holdagi mikroorganizmlar sonini bilvosita aniqlash maqsadida qo'llanadi. Odatda, biomassa miqdori 1 litr muhitga nisbatan gramm yoki milligrammlarda ifodalanadi.

Sentrifugalash, probirkalarini (byukslarni) va filtrlarni doimiy vazngacha quritish. Qopqog'i ochiq Petri likopchalariga joylangan filtrlar, sentrifugalash probirkalari va byukslarni quritish shkafiga qo'yib, 100-105°C haroratda 1 soat saqlanadi. So'ngra ular suvsiz kalsiy xloridli yoki konsentrlangan sulfat kislotali eksikatorlarga qo'yiladi. Bunda filtrli likopchalar qopqog'i berk bo'ladi. Sentrifugalash probirkalari (byukslar, filtrlar) eksikatorida 30 minut davomida sovutilgandan keyin analitik tarozida 0,0001 g aniqlikkacha tortiladi. Probirka (byuks)ning yoki filtrning massasi (vazni) doimiy bo'lguncha va qayta tortib ko'rishdagi farqi $\pm 0,0001$ g dan oshmaydigan vaznga kelguncha quritish shkafida bir necha marta quritib, eksikatorida sovutiladi.

Mikroorganizmlar hujayrasini sentrifugalash. Kultural suyuqlikdagi bakteriyalar va achitqilar hujayrasi sentrifugalash yo'li bilan ajratib olinadi. Buning uchun yaxshilab aralashtirilgan kulturadan pipetkada aniq miqdorda olib, quritilgan sentrifugalash probirkalariga solinadi. Sentrifugalash vaqti (qancha davom etishi) va aylanish soni hujayralarning yirik-maydaligiga bog'liq. Bakteriyalar minutiga 5-7 ming aylanishda (oborotda) 15-20 minut, achitqilar 3,5-4,0 ming aylanishda 5-10 minut sentrifugalanadi. Cho'kma yuzasidagi suyuqlikni ehtiyotlik bilan quyib olib, cho'kma fiziologik eritma yoki kuchsiz kislotali distillangan suv (1 l suvga 1 ml konsentrlangan HCl hisobidan) bilan yuviladi va yuqorida aytilgan aylanishda yana sentrifugalanadi. Yuvib bo'lgandan keyin suvni to'kib, cho'kma probirkada qoldiriladi

(agar u shishadan yasalgan bo'lsa). Agar probirkalar polietilendan yasalgan bo'lsa, cho'kma miqdoriy ravishda distillangan suv bilan oldindan quritilgan shisha byukslarga quyib olinadi.

Mitseliyli zamburug'lar va aktinomisetlarning, shuningdek, achitqichlar va bakteriyalarning hujayralarini kultural suyuqlikdan ajratib olishda kulsizlantirilgan qog'oz filtrlardan va membrana filtrlardan foydalanish mumkin. Buning uchun shisha voronkaga yoki Byuxner voronkasiga ikki qavat qog'oz filtr qo'yib, aniq miqdorda olingan kultura filtrlanadi. Jarayonni tezlashtirish maqsadida vakuum ostida filtrlash mumkin. Filtrda qolgan cho'kma bir oz kislotalangan distillangan suv bilan yuviladi. Bakteriyalar hujayrasini ajratib olishda membranali filtrlardan foydalaniladi; filtrlarni shunday tanlash kerakki, ularning teshiklari bakteriya hujayrasidan mayda bo'lishi kerak.

Hujayralar massasini aniqlash. Ichida mikroorganizmlar hujayrasining cho'kmasi bo'lgan sentrifugalash probirkalari (byukslar) yoki filtrlar quritish shkafiga qo'yib, 30°C da, so'ngra 100-105°C da 2 soat quritiladi. 4 soatdan keyin birinchi marta, so'ngra har 1 soatda tortib ko'riladi. Har gal tortishdan oldin probirkalar, byukslar va filtrlar eksikatorida sovutiladi. Qurish protsessini tezlashtirish maqsadida majburiy ventilyatsiyali vakuum-quritish shkaflaridan, infraqizil nurli lampalardan foydalaniladi. Filtrlardagi biomassani K.N. Chijova asbobida tez quritish mumkin. U tekshirilayotgan namunani isitilgan qoramtir jismdan tarqalayotgan infraqizil nurlar bilan 5-7 minut davomida 160°C gacha isitib, suvsizlantirish prinsipiga asoslanagan.

Quruq biomassa miqdori (g/l hisobida).

$$x=(A-B) * 1000/V$$

bu yerda A va B – sentrifugalash probirkalari (byuks, filtrlar)ning cho'kmali va cho'kmasiz massasi (g); V-sentrifugalash yoki filtrlash uchun olingan kultural suyuqlikning hajmi (ml).

Biomassani tortish usulida aniqlashda ikkita parallel namuna olinadi.

Biomassani nefelometrik usulda aniqlash. Nefelometriya loyqa eritma orqali o'tgan yorug'lik intensivligi o'lchamiga asoslangan. Mikroorganizmlar suspenziyasi tarqatadigan yorug'lik miqdori yo ularning massa birligida yoki hujayralar soni bilan ifodalangan konsentratsiyasiga yo bo'lmasa ularning o'rtacha o'lchamiga proporsionaldir. Bir tekis loyqalantiruvchi o'sayotgan kulturalarga tarqatayotgan yorug'lik nuri bilan 1 ml kultural muhitdagi ($\pm 7\%$ aniqlikda) hujayralar sonini aniq bog'liqligi xosdir. Mikroorganizmlar

parda, mitseliy, to'p-to'p yoki donador cho'kma hosil qilganda bu usulga rioya etilmaydi.

Yorug'likni tarqalishi miqdori fotoelektrokolorimetrlarda, nefelometrlarda (FEKN-57, FEKN-56M va boshqalarda) o'lchanadi.

Ularning ishlash prinsipi va yorug'likning tarqalishini o'lchash tartibi fizik-kimyoviy usullarga doir qo'llanmalarda va instruksiyalarda (priborlarga ilova etilgan) ta'riflangan bo'lib, eritmalarining optik zichligini o'lchashdan farq qilmaydi. GPBda yoki solod sharbatida suspenziya hosil qilingan bakteriya va achitqilar hujayrasini tekshirishda qizil filtrda o'lchash, ko'k-yashil suvo'tlarni yashil filtrda o'lchash eng qulaydir. Kultural muhitda hujayralar konsentratsiyasi yuqori (hujayralar nihoyatda ko'p) bo'lsa, yorug'lik tarqalishi kuchayadi, bu esa past natija olinishiga sabab bo'ladi. Shuning uchun hujayralar nihoyatda ko'p bo'lgan bunday suspenziyani oziq muhiti yoki suv bilan suyultirish kerak. Bitta kulturaning namunasini har xil suyuqliklar bilan suyultirish mumkin emas, chunki hujayralarning bo'rtib qolishi va qisilishi yorug'lik tarqalishi darajasiga ta'sir etadi.

Hujayralar soni (biomassa) yo bevosita nefelometrning ko'rsatishi bo'yicha yoki yorug'lik tarqalishi miqdori bilan hujayralar soni yoki hajm birligidagi quruq biomassa orasidagi o'zaro bog'liqlik egri chizig'i bilan ifodalanadi.

O'lchov egri chizig'i quyidagicha tuziladi: har xil quyuqlikdagi bir nechta mikrob suspenziyasi tayyorlanadi. Sanash kamerasi yordamida yoki quruq biomasasini tortish yo'li bilan 1 ml suspenziyadagi hujayralar soni aniqlanadi. Keyin fotoelektrokolorimetr yordamida yorug'lik tarqalishi o'lchanadi. Olingan kattaliklarning bog'liqligi grafik tarzda ifodalanadi. Bunda ordinatalar o'qiga fotoelektrokolorimetr ko'rsatkichi, absissalar o'qiga 1 ml muhitdagi hujayralar soni (yoki g/l hisobidagi quruq biomassa hajmi) yoziladi. Har qaysi o'lchov chizig'iga yorug'lik filtrining raqami (nomeri), kyuvetaning ish masofasi, grafik tuzilgan muddat va mikroorganizmning nomi yozib qo'yiladi.

O'lchov egri chizig'i bo'yicha hujayralar soni quyidagicha aniqlanadi. Tahlil qilinayotgan namunaning yorug'lik tarqatishi o'lchanadi, ordinatalar o'qidan olingan songa mos nuqta topiladi. Ana shu nuqta orqali o'lchash egri chizig'i bilan kesishguncha absissalar o'qiga parallel chiziq o'tkaziladi.

Perpendikulyarning absissalar o'qi bilan kesishish nuqtasi tekshirilayotgan namunadagi hujayralar soniga (biomassasiga) mos keladi.

Sinov savollari:

1. Hujayralarning biomassasi nima?
2. Biomassani tortib ko'rish yo'li bilan qanday aniqlanadi?
3. Mitseliyli zamburug'lar va aktinomitsetlar, achitqichlar va bakteriyalarning hujayralarini kultural suyuqlikdan ajratib olishda qanday filtrlardan foydalanish mumkin?
4. Biomassani nefelometrik usulda aniqlash qanday olib boriladi?
5. O'lchov egri chizig'i qanday tuziladi?

7-laboratoriya ishi

Mikroorganizmlar kulturalari uchun oziq muhitlari tarkibi va ularni tayyorlash usullari.

Ishdan maqsad: Mikroorganizmlarni o'stirish va ularni tekshirishda ishlatiladigan turli oziq muhitlarini tayyorlash, sterillash usullarini o'rganish.

Kerakli jihozlar: go'sht, pepton, maxsus tunuka voronka, shisha voronka, filtr qog'oz, qizil lakmus qoroz, kristalik soda, avtoklav, probirka va kolbalar, jelatin va agar-agar, Kox qaynatgichi, tuxum.

Ishning borishi: Mikrobiologiya amalyotida mikroorganizmlarning morfologiyasini va fiziologik jarayonlarini o'rganish hamda ularni bir-biridan ajratib olish uchun quyidagi oziq muhitlari ishlatiladi:

1. Peptonli go'sht sho'rvasi (PGSH). Bu sho'rvani tayyorlash uchun avval 500 g go'sht suyak, chandir va yog'idan tozalanib maydalanadi. Maydalangan go'shtga 1 l suv qo'shib 15°C haroratda 24 soat tinch qoldiriladi. Shundan so'ng go'sht aralashtirilgan suv doka orqali kolbaga filtrlanadi. Bu filtrat 30 minut qaynatiladi, so'ngra issiqligida burmali filtrdan qayta o'tkaziladi. Sho'rvani qaynatish vaqtida kamaygan suv miqdori tiklanadi, ya'ni kolbadagi suvni 1 litrga etkazish uchun sho'rvaga toza suv qo'shiladi. Shu tartibda tayyorlangan eritma **go'sht sho'rvasi (bulon)** deb ataladi.

Bir litr go'sht sho'rvasiga 10 g pepton va 5 g osh tuzi qo'shiladi. Qo'shilgan pepton eriguncha sho'rva isitiladi. Peptonli sho'rvani neytral holga keltirish maqsadida unga kristallik soda qo'shiladi. Sho'rva neytral holga kelganligini aniqlash uchun undan bir necha tomchi olib, lakmus qog'ozga tomiziladi, qizil lakmus qog'oz endi ko'kara boshlagan bo'lsa, bu hodisa sho'rvaning kuchsiz ishqoriy yoki neytralga yaqinligini ko'rsatadi. Neytrallangan vaqtda eritma loyqalanadi, uni tindirish uchun avtoklavga qo'yib 120°C haroratda 30 minut qizdiriladi.

Keyin avtoklavdan olinib filtrlanadi va toza probirkalarga yoki kolbalarga taqsimlanadi. Probirka va kolbalarning og'zi paxtadan yasalgan tiqin bilan bekitiladi. Filtrat quyilgan va og'zi bekitilgan kolba yoki probirkalar qaytadan avtoklavga joylanib, 120°C issiqlikda 15 yoki 30 minut qizdiriladi. Sovigandan so'ng u oziq muhiti sifatida ishlatiladi.

Bakteriyalarning turini aniqlashda va ularni bir-biridan ajratishda suyuq oziq muhiti (go'sht-peptonli sho'rva) unchalik qulay bo'lmaganligidan, odatda, kam ishlatiladi. Buning o'rniga jelatina yoki agar-agar qo'shilgan qattiq oziq muhitidan foydalaniladi. Qattiq oziq muhiti sathida har qaysi bakteriya o'ziga xos koloniya hosil qiladi. Bu koloniyalar rangi va shakliga qarab bir-biridan farq qiladi.

Qattiq oziq muhiti tayyorlash uchun jelatina yoki agar-agar ishlatiladi. Bulardan tashqari, kremniy (suyuq oyna)dan tayyorlangan gel va boshqa moddalar qo'shish ham mumkin.

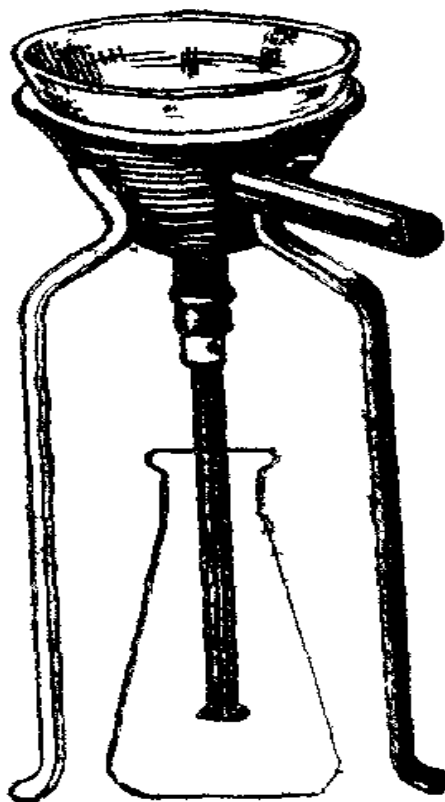
2. Go'sht-pepton-jelatin (GPJ). Bu oziq muhitini tayyorlash uchun 1 l peptonli go'sht sho'rvasiga 100-120 g maydalangan jelatina qo'shiladi. Sho'rvaga qo'shilgan jelatinani eritish uchun kolba Kox qaynatgichida yoki avtoklavda qizdiriladi. Avtoklavning harorati 100°C dan ortib ketmasligi uchun uning jumragi ochiq bo'lishi kerak, chunki jelatina yuqori haroratda o'z xususiyatini yo'qotadi. Go'sht-pepton-jelatina aralashmasi Kox qaynatgichidan yoki avtoklavdan olinib filtrlanadi. Buning uchun burmali filtr qo'yilgan shisha voronka, tunukadan yasalgan ikki qavatli maxsus voronkaga (14-rasm) joylashtiriladi va shu voronka ichiga quyilgan suv isitib turiladi. Bu filtrdan o'tadigan go'sht-pepton-jelatinning qotib qolishiga yo'l qo'ymaydi. Filtrat probirka yoki kolbalarga taqsimlanadi.

Probirka va kolbalarning og'zi paxtadan yasalgan tiqin bilan bekitilib, ular Kox qaynatgichiga joylanadi. GPJ eritmasidagi mikroorganizmlarni nobud qilish uchun u Kox qaynatgichida 100°C haroratda 15-30 minut sterillanadi. Oradan 24 soat o'tgach, qaynatgichdagi GPJ qaytadan qizdiriladi. Yana 24 soat vaqt o'tgach, 100°C haroratda 15 minut saqlanib qaytadan sterillanadi. Shunday qilib, bu oziq muhiti Kox qaynatgichida 3 sutka davomida 3 marta sterillanadi.

GPJ asosan sovuq sharoitda ishlatiladi, chunki harorat 24°C gacha isishi bilan jelatina suyulib qoladi. Shuning uchun mikrobiologiya amaliyotida ko'pincha agar-agardan tayyorlangan oziq muhitidan foydalaniladi.

3. Go'sht-pepton agar-agarli oziq muhiti (GPA). Bu oziq muhitini tayyorlash uchun kolbadagi 1 l peptonli go'sht sho'rvasiga 15-20 g

maydalangan agar-agar aralashtiriladi. Aralashmadagi agar-agarni eritish uchun kolba avtoklavga joylanib, 120°C haroratda 20 minut qizdiriladi. Agar-agar erigandan so'ng bir dona tuxum oqi suvda suyultirilib, avtoklav ichidagi eritmaga qo'shiladi. Avtoklavning qopqog'ini mahkam bekitib, kolba ichidagi eritma 120°C haroratda yana 15-20 minut qizdiriladi. Eritma ichidagi oqsil va boshqa moddalar tuxum oqi ta'sirida cho'kadi, tiniq eritma esa cho'kma ustiga yig'iladi.



14-rasm. Filtrlash uchun maxsus tunuka voronka

Shu tarzda tindirilgan GPA avtoklavdan olinib, issiq voronka orqali filtrlanadi va probirka yoki kolbalarga taqsimlanadi. GPA quyilgan idishlarning og'zi paxtadan yasalgan tiqin bilan bekitilib yana avtoklavga joylanadi va 120°C haroratda 20-30 minut sterillanadi.

Yuqorida aytib o'tilgan oziq muhitlaridan tashqari, sut, kartoshka, tuproq va boshqalardan ham fondalaniladi.

Sinov savollari:

1. Peptonli go'sht sho'rvasi qanday tayyorlanadi?
2. Go'sht-pepton-jelatina qanday tayyorlanadi?
3. Go'sht-pepton agar-agarli oziq muhiti qanday tayyorlanadi?
4. Ozuqa muhitlari nima maqsadda ishlatiladi?

8-laboratoriya ishi

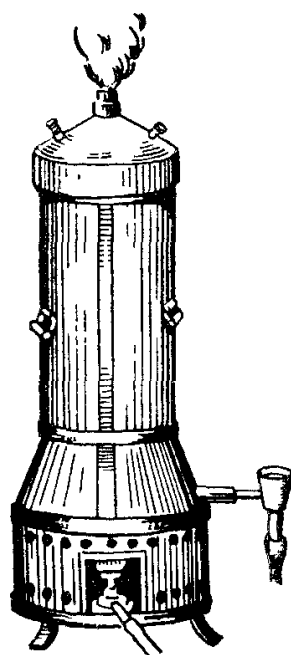
Sterilizatsiya va pasterizatsiya qilish usullari. Sterillash hamda mikroorganizmlarni parvarish qilish

Ishdan maqsad: Mikroorganizmlarni o‘stirish, ko‘paytirish uchun zarur idishlarni, jihozlarni va tayyorlangan oziq muhitlarini sterillash usullarini o‘rganish.

Kox qaynatgichida sterillash. Buning uchun qaynatgichga 5 sm qalinlikda suv quyiladi. So‘ngra sterillanadigan probirka va kolbalar sim savatga yoki tunuka chelakka joylanib, qaynatgich ichidagi tirgak ustiga qo‘yiladida, qaynatgichning qopqog‘i yopiladi (15-rasm). Ular 3 kun davomida 3 marta sterillanadi.

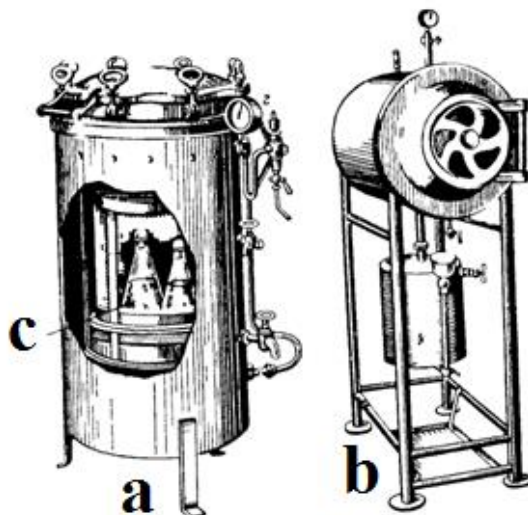
Birinchi kuni qaynatgich ichidagi probirka yoki kolbalar 100°C haroratda 30 minut qizdirilganda, spora hosil qilmaydigan hamda sporolari issiqqa chidamsiz bakteriyalar nobud bo‘ladi. Sterillanayotgan idishlar Kox qaynatgichida kelgusi kungacha qoldiriladi. **Ikkinchi kuni** qaynatgich qaytadan 100°C gacha qizdirilganda sporolari issiqqa chidamli bakteriyalar ham nobud bo‘ladi. Oziq muhitini butunlay sterillash maqsadida **uchinchi kuni** yana 30 minut qizdiriladi. Shunda oziq muhiti mikroorganizmlardan butunlay tozalanadi.

Avtoklavda sterillash. Avtoklavga avval 5-10 sm qalinlikda suv quyiladi. So‘ngra sterillanadigan buyumlar unga joylanib, qopqog‘i mahkam bekitiladi. Ichidagi havo chiqib ketguncha uning jumragi ochiq holda qoldiriladi.



15-rasm. Kox qaynatgichi

Suv bug‘i bir tekis chiqa boshlagandan keyin jumragi bekitiladi (16-rasm). Avtoklavga o‘rnatilgan manometr bir atmosferaga ko‘tarilganligi kuzatiladi. Manometr bosim bir atmosfera ko‘tarilganini ko‘rsatgan vaqtda avtoklavning ichidagi va probirka ichidagi oziq muhitining harorati 120°C ga yetadi. Bunday haroratda oziq muhitidagi mikroorganizmlarning hammasi nobud bo‘ladi.



16-rasm. Avtoklav turlari: *a – vertikal; b – gorizontall shakldagi avtoklavlar; c – strillash uchun qo‘yilgan buyumlarning o‘rnatilishi.*

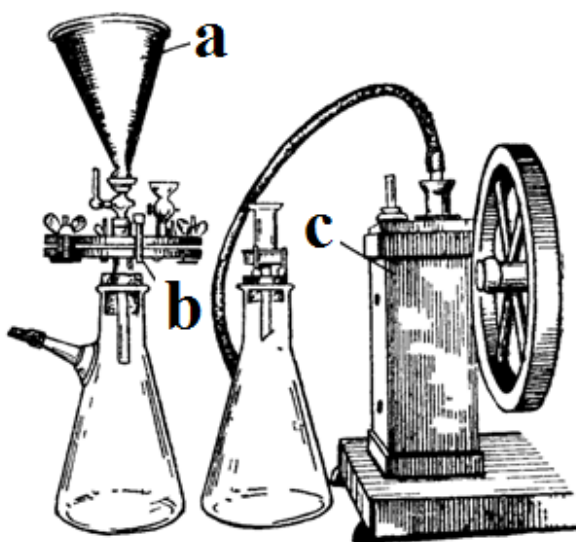
Sterillash 20 minut davom etadi. Shundan so‘ng manometr strelkasi nol darajaga kelguncha avtoklav sovitiladi, so‘ngra bug‘ chiqib bo‘lguncha jumragi ochiq qoldiriladi. Bug‘ chiqishi to‘xtagandan keyin qopqog‘i ochilib, undan sterillangan oziq muhiti olinadi.

Sut va issiqlik ta‘sirida buziladigan boshqa suyuqliklar ichidagi sporasiz bakteriyalarni nobud qilish maqsadida pasterlash usuli qo‘llaniladi. Bu usulda suyuqliklar $60-70^{\circ}\text{C}$ issiqda 15-30 minut yoki $70-80^{\circ}\text{C}$ issiqda 5-10 minut qizdiriladi.

Yuqoridagi usullardan tashqari, **sovuq sterillash usuli** ham qo‘llaniladi. Bu holda Paster-Shamberlen ishlab chiqargan sopol idishlardan foydalaniladi. Buning uchun sterillanadigan eritma mayda teshikchalari bo‘lgan sopol filtrdan o‘tkaziladi. Biroq bakteriofaglar va ultramikroblar sopol filtr orqali o‘tib keta oladi. Shuning uchun bunday filtratda mikroblar bo‘lmaydi deyish noto‘g‘ri. Keyingi yillarda asbestdan yasalgan Zeys filtri ham qo‘llanilmoqda (17-rasm).

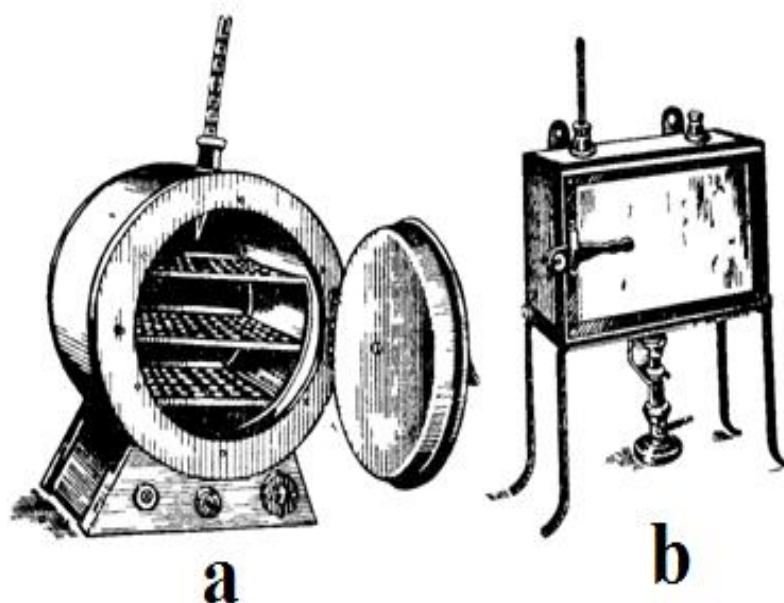
Sterillangan oziq muhitlarini sterillangan idishlarga solish kerak. Shu sababli idishlar ham quruq issiqda barvaqt sterillab qo‘yilishi kerak.

Buning uchun Paster pechkasi yoki quritgich shkaflar ishlatiladi (18-rasm). Petri va Kox idishlari, probirkalar va ishlatiladigan boshqa buyumlar qog'ozga o'ralib, quritish shkafiga joylanadi va harorat 150-160°C ga etguncha 2 soat davomida qizdiriladi. Tajribada foydalaniladigan mikroorganizmlarni parvarish qilish uchun turli sxemada ishlangan termostatlar qo'llaniladi. Termostatda mikroorganizm uchun zarur bo'lgan harorat muayyan nuqtada saqlab turiladi.



17-rasm. Zeys filtri:

a – filtrlanuvchi suyuqlikni quyish uchun voronka;
b – filtri; c – havoni tortib turish uchun Komovskiy nasosi.



18-rasm. Quritgich shkaflar:

a – zamonaviy shkaf; b – Paster pechkasi.

Sinov savollari:

1. Kox qaynatgichida sterillash usuli qanday amalga oshiriladi?
2. Avtoklavda sterillash vaqtida avtoklav ichidagi haroratni qanday aniqlaymiz?
3. Sovuq sterillash usulida nimalardan foydalaniladi?
4. Sterillash usullari afzalliklari va kamchiliklari bormi?
5. Sovuq sterillashda qanday filtrlardan foydalaniladi?

9-laboratoriya ishi

Mikroorganizmlarni yig‘ma kulturalari va toza kulturalarini olish usullari

Ishdan maqsad: oziq-ovqat sanoatida ishlatiladigan amalda muhim ahamiyatga ega bo‘lgan ayrim mikroorganizmlarning, shuningdek, oziq-ovqat mahsulotlarini buzadigan ko‘p tarqalgan qo‘zg‘atuvchilarning elektiv kulturasidan namunalar olish usullari bilan tanishish.

1. Mikroorganizmlarning yig‘ma (elektiv) kulturasini olish usullari

Tarkibida mikroorganizmlar yaqin turlarining yoki hatto bir turining vakillari ko‘pchilikni tashkil etgan kulturalar **yig‘ma** yoki **elektiv** deb ataladi (lotincha *eletus* – tanlangan degani). Oziq-ovqat mahsuloti (yoki boshqa obyekt)ning mikroflorasi tarkibini o‘rganishda yig‘ma kulturadan toza kultura ajratib olinadi. Yig‘ma kultura olish uchun tekshiruvchini qiziqtiruvchi mikroorganizmlar ko‘plab rivojlanishini ta‘minlovchi sharoit yaratiladi. Buning uchun eng avvalo o‘ziga xos tanlama muhitdan foydalaniladi; ular mikroorganizmlar muayyan guruhlarining oziq 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), harorat, kislorod bor-yo‘qligi, antibiotiklarga va boshqa birikmalarga chidamligi yig‘ma kultura olishga ta‘sir etadigan muhim omillardir. Masalan, muhitning kislotaliligini oshirib, bakteriyalarning rivojlanish imkoniyati yo‘qotiladi va achitqi hamda mitseliyli zamburug‘larning o‘sishi uchun qulay sharoit yaratiladi. Termofil organizmlarning yig‘ma kulturasini 45-65°C, ba‘zan hatto 70-75°C haroratda olinadi. Muhitga ma‘lum konsentratsiyada penitsillin qo‘shilsa, gram-manfiy bakteriyalarning yoki achitqilarning rivojlanishiga ta‘sir etadi. Neomitsin yoki penitsillin streptomitsin bilan birgalikda bakterial mikroflorani nobud qiladi va achitqilarning rivojlanishiga sharoit yaratadi. Nistatin esa aksincha, bakteriyalarga

ta'sir etmay, achitqilarning hayot faoliyatiga to'sqinlik qiladi. Aeroblarning yig'ma kulturasini olish uchun oziq 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 ekish va ma'lum turlar uchun qulay bo'lgan sharoit yaratilishi natijasida kultura asta-sekin kerakli xossaga ega bo'lgan mikroorganizmlar bilan boyib boradi, birga uchraydigan formalar kamayadi.

2. Toza kultura ajratib olish usullari

Tekshirilgan materilda, odatda, bitta emas, balki mikroorganizmlarning bir necha turi bo'ladi. Mikroorganizmlarning morfologik-kultural va fiziologik-biokimyoviy xossalarini o'rganishda, ulardan sanoatda foydalanishda albatta toza kultura bo'lishi shart. Toza kultura bitta hujayradan olingan nasldir. Toza kultura olishning bir qancha usullari bor. Bu usullarning barchasi mikroob populyatsiyasidan yagona-bitta hujayra ajratib olishga asoslangan. Toza kultura alohida koloniya yoki bitta hujayra shaklida yig'ma kulturadan ajratib olinadi.

Bitta koloniyadan toza kultura ajratib olish. Bu usulni mikrobiologiya laboratoriyasida amalga oshirish mumkin. Dastavval agarli oziq muhit suv hammomida eritiladi, so'ngra 45-50°C gacha sovutiladi va Petri likopchasiga quyiladi. Buning uchun muhitli idishni o'ng qo'lda qiya ushlab, paxta tiqini olinadi. Keyin idishning og'zi gorelka alangasida qizdirib olinadi, chap qo'lning bosh va ko'rsatkich barmoq bilan likopchaning qopqog'ini ochib, eritilgan muhit tezda quyiladi (15-20 ml); bunda likopchaning tubi to'liq qoplanishi kerak. Keyin likopcha qopqog'ini tezda berkitib, muhit soviguncha tinch qoldiriladi.

Aerob mikroorganizmlar yuza usulda ajratib olinadigan bo'lsa, bir tomchi yig'ma kultura yoki uning suyultirmasi ilmoqda yoki pipetkada sovigan muhit o'rtasiga tomiziladi (likopcha qopqog'ini qiya ochib turib). Keyin uni sterillangan shisha shpatelda likopchadagi muhit yuzasiga yoyiladi. Shundan so'ng material qoldig'i bo'lgan shu shpatel ikkinchi, uchinchi, kamdan-kam holda to'rtinchi Petri likopchasidagi muhit yuzasiga surkab chiqiladi. Bunda likopchalar qopqog'i faqat shpatel dezinfeksiyalovchi eritmaga botirib qo'yiladi. Sanoatda ishlab chiqarilgan achitqilardan, brajka, sut, suv, pivo, sharob, kvas, qimiz, xamir, tuproq, xomashyo yuvindi suvlari, jihozlar va hokazolardan ham ana shu yo'l bilan toza kultura olish mumkin. Buning uchun oldin

sterillangan suvda yoki fiziologik eritmada suyultirma tayyorlab olinadi.

Yig'ma kulturani qattiq oziq muhiti yuzasiga shtrix usulida ekish ham mumkin. Buning uchun ekish materialidan ilmiqda bir tomchi olib, 2-3 ta Petri likopchasidagi agar plastinkasi bo'ylab parallel yoki zigzagsimon shtrix bo'ylab ekiladi. Suyultirilgan yig'ma kultura bitta likopchaga shtrix usulida ekiladi.

Sinov savollari:

1. Mikroorganizmlarning yig'ma (elektiv) kulturasini qanday usullar yordamida olish mumkin?
2. Yig'ma kultura olishga ta'sir etadigan muhim omillarga nimalar kiradi?
3. Yig'ma kulturani qattiq oziq muhiti yuzasiga qanday usulda ekish mumkin?
4. Toza kultura ajratib olish usullari nimalardan iborat?

10-laboratoriya ishi

Mikroorganizmlarning kislorodga munosabatini aniqlash

Ishdan maqsad: Mikroorganizmlarning turini aniqlashda ularning kislorodga bo'lgan munosabatini aniqlash.

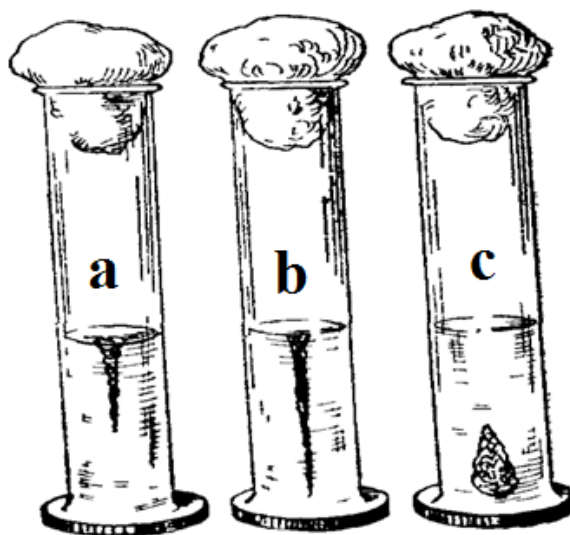
Kerakli jihozlar: Yarmigacha qattiq oziq muhiti quyilgan probirkalar yoki silindr.

Ishning borishi: Mikroorganizmlarning turini aniqlashda ularning kislorodga bo'lgan munosabatiga ham e'tibor berish zarur. Kislorodga bo'lgan munosabatiga qarab ular quyidagi uch guruhga bo'linadi:

a) aerob mikroorganizmlar-havo o'tib turadigan sharoitda normal rivojlana oladi, havosiz sharoitda rivojlanmaydi;

b) anaerob bakteriyalar-havosiz sharoitda normal o'sadi va rivojlanadi;

c) fakultativ anaerob bakteriyalar-kislorodli va kislorodsiz sharoitda ham bimalol o'sadi va rivojlanaveradi. Agar qattiq oziq muhitli silindr yoki probirkaga mikroorganizmlar, ukol vositasida yuqtirilsa, ularning kislorodga bo'lgan munosabati yaqqol ko'rinadi. Jumladan, aerob bakteriyalar oziq muhitining ustki tomonida, anaerob bakteriyalar pastki tomonida, fakultativ anaerob bakteriyalar esa har ikkala tomonida rivojlanganligi aniqlanadi (19-rasm).



19-rasm. Mikroorganizmlarning kislorodga bo‘lgan munosabati: a – aerob; b – fakultativ anaerob; c – haqiqiy anaerob sharoitda o‘sovchi formalari.

Sinov savollari:

1. Mikroorganizmlarning kislorodga bo‘lgan munosabati qanday aniqlanadi?
2. Qanday mikroorganizmlarga aerob mikroorganizmlar deyiladi?
3. Anaerob mikroorganizmlar deb qanday mikroorganizmlarga aytiladi?
4. Fakultativ mikroorganizmlar qanday aniqlanadi?

11-laboratoriya ishi

Havo mikroflorasini o‘rganish

Ishdan maqsad: Sedimentatsion va aspiratsion usullarda havodagi mikroorganizmlar miqdorini, mikroorganizmlarning umumiy miqdori va sonini aniqlash.

Havoni tahlil qilish. Ishlab chiqarish binolarining havosi homashyo, yarim tayyor mahsulotlar va tayyor oziq-ovqat mahsulotlari mikroblar bilan ifloslanadigan manba hisoblanadi. Bu esa ular sifatining pasayishiga, saqlash normativ muddatlari qisqarishiga sabab bo‘lishi, shuningdek, odamda turli kasalliklar keltirib chiqarishi mumkin. Havodagi mikroorganizmlar miqdorini aniqlashda turli usullardan foydalaniladi.

Sedimentatsion usul: mikroblarni Kox usulida cho‘ktirish eng oddiy usul bo‘lib, maxsus apparatura talab qilmaydi. Bu usul usti ochiq Petri

likopchasi yuzasiga mikroorganizmlar tushishiga asoslangan. Bu usuldan foydalanilganda ichida oziq muhiti bo'lgan likopchalar 5 minut (ekspozitsiya vaqti), ba'zan esa havoning ifloslanish darajasiga ko'ra undan uzoqroq vaqt usti ochiq qoldiriladi. Shundan keyin likopchalar qopqog'ini yopib, termostatga qo'yiladi va 30-35°C issiqda 2-3 kun qoldiriladi. Likopchaning butun yuzasi bo'ylab koloniyalar sanab chiqiladi. Har bir tirik hujayradan koloniya hosil bo'ladi deb hisoblanadi. Hisoblashda V.A. Omelyanskiy taklif etgan formuladan foydalaniladi. Bunga ko'ra, 5 minut davomida likopchaning 100 sm yuzasiga, 10 l havoda qancha bo'lsa, shuncha mikroorganizm tushadi. 1 m havodagi mikroorganizmlar soni (x) quyidagi formulaga muvofiq topiladi:

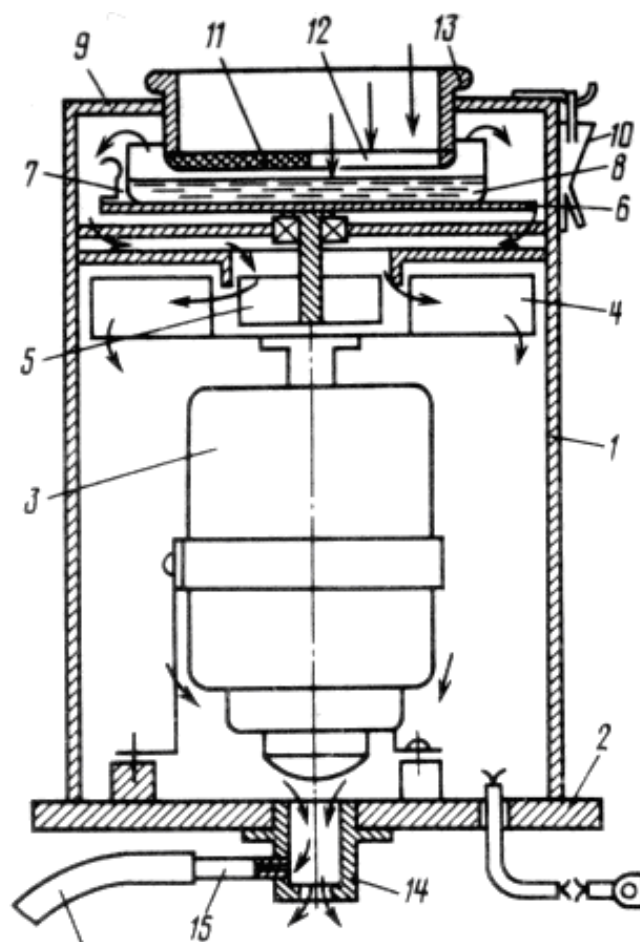
$$x = \frac{a \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100}{v \cdot t};$$

bu yerda: a – Petri likopchasida o'sgan koloniyalar soni (uchtadan o'rtachasi); v – Petri likopchasining yuzasi (maydoni, sm^2); t – ekspozitsiya vaqti (min); 100 – likopcha yuzasini 100 sm^2 ga aylantirib hisoblash; 5 – Omelyanskiy bo'yicha likopchaning ekspozitsiyasi vaqti (min); 100 – 1 m^3 ga aylantirib hisoblash.

Aspiratsion usul: Yu.A. Krotov konstruksiyasidagi teshikli apparatdan foydalanishga asoslangan. Apparatning sxemasi 20-rasmda ko'rsatilgan.

Ventilyatori 4000-5000 aylanish/minutda aylanadi, apparatning ponasimon tirqishi (teshigi)dan kirayotgan havoni tez so'rib olib, Petri likopchasidagi oziq muhiti yuzasiga uriladi. Havo 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 aylanish/min da aylantiriladi. 1 minutda apparatdan 25-50 l havo o'tadi.

Havoga 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°C issiqlik termostatga 24 soatga qo'yiladi. Shundan keyin ular 48 soat xona haroratsida qoldiriladi va o'sib chiqqan koloniyalar hisobga olinadi. Havoning so'rilishi tezligi va davomiyligiga qarab, umumiy hajm hisoblanadi va 1 m havodagi mikroorganizmlar miqdori hisoblanadi.



Mikromonometr

20-rasm. Yu.A. Krotov asbobining tuzilish sxemasi:

1 – silindr; 2 – silindr asosi; 3 – elektromotor; 4 – markazdan qochma ventilyator; 5 – krilchatka; 6 – disk; 7 – prujinalar; 8 – Petri likopchasi; 9 – asbobning qopqog'i; 10 – yopib berkitadigan ilgaklar; 11 – pleksiglasdan qilingan disk; 12 – panasimon tirqish; 13 – qirqilgan halqa; 14 – shtuser diafragma bilan; 15 – chiqarish trubkasi.

Ishlab chiqarish binolari havosining 1 m^2 da ko'pi bilan 500 ta mikroorganizm bo'lsa, havosi toza hisoblanadi.

Sinov savollari:

1. Havodagi mikroorganizmlar miqdorini aniqlashda qanday usullardan foydalaniladi?
2. Sedimentatsion usul nimaga asoslangan?
3. Aspiratsion usul qanday amalga oshiriladi?
4. Ishlab chiqarish binolari havosining tarkibida qancha mikroorganizm bo'lsa havosi toza hisoblanadi?

12-laboratoriya ishi

Havo tarkibidagi mikroorganizmlarni aniqlash va ularni bir-biridan ajratib olish

Ishdan maqsad: Kox usulidan foydalangan holda go'sht-pepton-agarli (GPA) yoki go'sht-pepton-jelatinli (GPJ) qattiq oziq muhitida havo tarkibidagi mikroorganizmlarni o'stirish, ularni aniqlash va bir-biridan ajratib olish.

Kerakli jihozlar: Petri idishlari, probirkada sterillangan GPA yoki GPJ oziq muhitlari, termostat, Volfgyugel kamerasi.

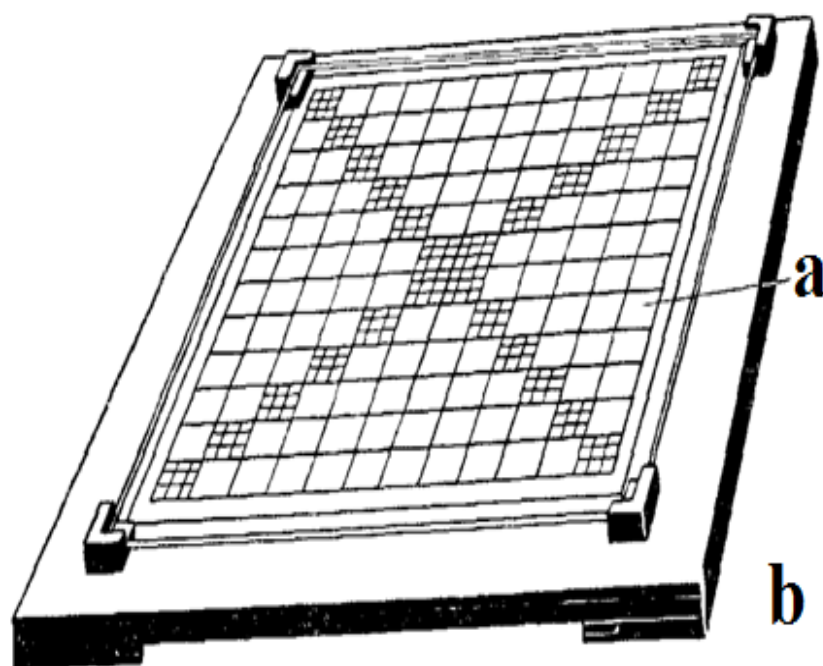
Nazariy tushuncha: Havo mikroflorasi. Tuproqdan ko'tariladigan chang o'zi bilan birga mikroorganizmlarni ham havoga tarqatib, havoni ifloslaydi. Havoning quruq bo'lishi va ultrabinafsha nurlarning ta'siri havodagi mikroorganizmlarning hayoti uchun xavflidir.

Havodagi mikroorganizmlar soni yil fasllariga qarab o'zgarib turadi. Bu mikroorganizmlar qish faslida oz, yozda ko'p, kuzda va bahorda o'rtacha bo'ladi. Havoning yuqori qatlamlariga ko'tarilgan sari mikroorganizmlar soni kamaya boradi.

Ishning borishi: Bu mashg'ulotni o'tkazishda Kox usulidan foydalanish mumkin. Bunda go'sht-pepton-agarli (GPA) yoki go'sht-pepton-jelatinli (GPJ) qattiq oziq muhiti ishlatiladi.

Mashg'ulot uchun kerakli oziq muhiti Petri idishiga solinib, plastinka shaklida qotiriladi, so'ngra idishning qopqog'i olinib, bir necha (5-10) minut ochiq qoldiriladi. Keyin qopqog'ini bekitib, 25-30°C li termostatga qo'yiladi.

Qattiq oziq muhitidagi har bir mikroorganizm hujayrasi ko'payib o'ziga xos koloniyalar hosil qiladi. Bu koloniyalar (to'dalar) mikroorganizmning turiga qarab har xil shaklda bo'ladi va turli rangda tovlanib turadi. Bir necha kun o'tgandan so'ng Petri idishidagi qattiq oziq muhitida paydo bo'lgan koloniyalarning soni havo tarkibida qancha mikroorganizm borligini aniqlashga imkon beradi. Petri idishidagi oziq muhitida bakteriyalar sonini Volfgyugel kamerasi yordamida aniqlash juda oson. Buning uchun kamera ichiga Petri idishi to'ntarib qo'yiladi. Kameraning yuqori tomonidagi oyna 1 sm² ga teng bo'lgan kataklarga bo'lingan. Petri idishining sathiga ro'parama-ro'para kelgan 10-20 katakchadagi koloniyalarning sonini sanab, 1 sm² sathga teng kelgan bakteriyalarning o'rtacha soni topiladi, so'ngra bu son idishdagi oziq muhitining umumiy sathiga ko'paytiriladi. Natija havoning mikroorganizm bilan ifloslanganlik darajasini ko'rsatadi (21-rasm).



21-rasm. Volyugel kamerasi.

a – kataklarga bo‘lingan plastinka; b – plastinka tagiga joylangan buyumli Petri chashkasi.

1 m³ havo tarkibidagi mikroorganizmlar sonini topish uchun avval 100 sm² oziq muhitidagi mikroorganizmlar koloniyasini aniqlash kerak. Chunki V.S. Omelyanskiy ma’lumotiga ko‘ra, 10 l havo tarkibida bo‘lgan mikroorganizmlar 5 minut ichida 100 sm² yuzaga o‘tirar ekan. Bu ko‘rsatkich aniqlangandan so‘ng 1 m³, ya’ni 1 000 litr havo tarkibidagi mikroorganizmlar sonini aniqlash juda oson bo‘ladi. Masalan, Petri idishining umumiy sathini 70,84 sm² ga teng deb olib, tajriba natijasiga ko‘ra, undagi oziq muhitida 25 dona bakteriya koloniyasi bor deb faraz qilaylik, u vaqtda 100 sm² yuzaga to‘g‘ri keladigan mikroorganizmlar koloniyasini aniqlash uchun quyidagicha proporsiya tuziladi:

$$70,84 \text{ sm}^2 — 25 \text{ dona}$$

$$100 \text{ sm}^2 — X \text{ dona}$$

$$x = \frac{100 \times 25}{70,84} = \frac{2500}{70,84} = 35 \text{ dona}$$

Demak, V. S. Omelyanskiy ma’lumotlariga asoslanib, 10 litr havo tarkibida 35 dona bakteriya koloniyasi borligi aniqlandi. Endi 1 m³, ya’ni 1000 l havo tarkibidagi bakteriyalar koloniyasini aniqlash uchun tubandagicha proporsiya tuziladi:

$$10 \text{ l} — 35 \text{ dona}$$

$$100 \text{ l} — X \text{ dona}$$

$$x = \frac{1000 \times 35}{10} = \frac{3500}{1} = 3500 \text{ dona}$$

Sinov savollari:

1. Havo tarkibidagi mikroorganizmlarni qanday aniqlanadi?
2. Havo tarkibidagi mikroorganizmlarni bir-biridan qanday ajratib olinadi?
3. Havo tarkibidagi mikroorganizmlarni aniqlashda qaysi oziq muhitidan foydalaniladi?
4. Petri idishining umumiy sathini nechaga teng?

13-laboratoriya ishi

Suvning mikroorganizmlar bilan zararlanishini sanitar-bakteriologik tekshiruvi

Ishdan maqsad: Suvdan, asbob-uskuna apparatlaridan, quvur (truboprovod)lardan, idish, jihozlardan, shuningdek, ishchilarning qo‘li va kiyimidan namuna olish qoidalari bilan tanishish. Mikroorganizmlarning umumiy miqdorini va suvdagi ichak tayoqchalari hamda har xil chiqindi suvdagi mikroorganizmlar sonini aniqlash.

1. Suvni tahlil qilish

Oziq-ovqat sanoatida ishlatiladigan suv ichimlik suviga bo‘lgan GOST talablariga javob berishi kerak. Shahar suv tarmog‘idan foydalanilganda har kvartalda bir marta, shaxsiy suv tarmog‘i bo‘lsa, oyda bir marta; bakteriyalarning umumiy miqdori, ichak tayoqchalari guruhiga mansub bakteriyalar soni va patogen mikroorganizmlar (qorin tifi, vabo, ichburug‘ kasalliklarini tarqatuvchilar) bor-yo‘qligi aniqlanadi. Patogen mikroblarni aniqlash bo‘yicha tahlil ishlari sanitariya inspeksiyasi laboratoriyasida olib boriladi.

Namuna tanlab (ajratib) olish. Buning uchun idishlar (kolba, butilkalar – 0,25; 0,5 va 1 l ga mo‘ljallangan) yaxshilab yuvilib, og‘zi paxta-doka tiqin bilan berkitiladi, ustidan qog‘oz qalpoqcha kiydirib, bo‘yni bog‘lanadi va avtoklavda 120°C da 30 minut sterillanadi, Xlorlangan suv namunasi uchun sterillashdan oldin butilkaga natriy tiosulfatning 1,5% li eritmasidan 2 ml qo‘yiladi. Quruq issiqda sterillangan idishga, namuna olishdan ilgari, atseptika qoidalariga amal qilgan holda 2 ml natriy tiosulfat quyiladi.

Jo‘mrak yoki chiqarish quvurining cheti kavsharlash lampasi yoki spirt shimdirib yoqilgan paxta tampon bilan kuydiriladi. Jo‘mrakni ochib, 10-15 minut davomida suv oqiziladi, shundan keyingina namuna olinadi. Suv namunasi oldindan tayyorlab qo‘yilgan idishga, paxta tiqinini ho‘l qilib yubormay olinadi. Idishni alanga ustida tutib turib,

og'zi tiqin bilan berkitiladi va bog'lab qo'yiladi. Ochiq suv havzalarida namunalar chuqurdan batometr yordamida olinadi. Buning uchun batometrni suvga tushirib (ma'lum chuqurlikka), arqonchasini tortib qopqog'i ochiladi. Idish suvga to'lgandan keyin arqonchasi bo'shashtiriladi va tiqin o'z-o'zidan berkitiladi. Batometrni suvdan chiqarib olib, metall tiqinni paxta tiqiniga almashtiriladi. Suv namunasi bo'lgan butilikalarga manbaning nomi va qaeyrda joylashganligi, namuna olingan kun va soat, meteorologik sharoit (havo harorati, yog'in), tekshirishdan maqsad, namuna olgan yoki uni tahlilga yuborgan shaxsning lavozimi yozib qo'yiladi va imzo chekiladi.

Suvdan namuna olganda 2 soatdan kechiktirmay tahlil qilish kerak. Namunani 5°C dan oshmaydigan haroratda tashish va 6 soatdan kechiktirmay tekshirish kerak. Namunalarni qishda yaxlab qolishdan, yozda isib ketishdan asrash kerak.

Suvdagi mikroorganizmlar normasi. Suvning sifatiga sanitariya-gigiyena jihatdan baho berishda 1000 ml suvdagi ichak tayoqchalari soni bilan (koli-indeks) yoki bitta ichak tayoqchasi bo'lgan va millilitrda ifodalangan (koli-titr) eng kichik hajm bilan ifodalanadigan ko'rsatkichlarga asoslaniladi.

$$\text{Koli-titr} = 1000 / \text{Koli-indeks} = 1000 / \text{Koli-titr}.$$

Amaldagi GOST ga muvofiq, tozalangan ichimlik suvi uchun ichak tayoqchasi titri 300 dan past bo'lmasligi, koli-indeks ko'pi bilan 3; 1 ml suvdagi bakteriyalarining umumiy soni 100 dan oshmasligi kerak.

Boshqa suv manbalari uchun norma belgilangan, lekin:

a) artezian suvida 1 ml da ko'pi bilan 100 ta bakteriya bo'lishi va kolititri kamida 500 ga teng kelishi (1 l da 2-3 ta ichak tayoqchasi bo'lishi) kerak;

b) quduq va buloq suvlarining 1 ml da ko'pi bilan 100 ta bakteriya va koli-titri 250-200 gacha (1 l da 4-5 ta ichak tayoqchasi) bo'lishi kerak;

v) ochiq suv havzalari (hovuz, daryo, suv omborlari, ko'llar) suvini faqat tozalangandan keyin oziq-ovqat sanoatida ishlatish mumkin.

Suvda patogen mikroorganizmlar bo'lmasligi kerak.

1 ml suvdagi mikroorganizmlarning umumiy sonini aniqlash. Buning uchun sterillangan pipetkada tekshirilayotganda suvdan va kultura aralashtirilgan (1:10) suvdan 1 ml dan olib, 2 tadan Petri likopchasiga ekiladi. Suvning ifloslangan namunalaridagi mikroblarni aniqlash uchun ularni suyultirish kerak. Mikroblar konsentratsiyasini pasaytirish uchun suyultirishda likopchada kamida 30 ta va ko'pi bilan 300 ta koloniya hosil bo'lishi kerak.

Ma'lum aralashmadagi mikroorganizmlar hujayrasining miqdorini aniqlab, 1 l suvga nisbatan hisoblab chiqiladi. 1 ml suvda 0 dan 100 tagacha koloniya bo'lsa, suv toza, 100 dan 1000 tagacha koloniya bo'lsa, gumonli, unda – 1000 tadan ko'p bo'lsa, bunday suv yaroqsiz hisoblanadi.

2. Ichak tayoqchalari guruhiga kiruvchi bakteriyalar miqdorini aniqlash

Mahsulotlar va suvdagi hamma patogen mikroorganizmlarni tez aniqlash qiyin. Shuning uchun ularning mikroblar bilan ifloslanganligi ichak tayoqchalari bor-yo'qligiga qarab aniqlanadi. Ichak tayoqchalari shartli patogen mikroorganizmlar deb hisoblanadi. Ular boshqa patogen mikroorganizmlarga qaraganda tashqi muhit ta'siriga ancha chidamlidir. Shu sababli mahsulotda ichak tayoqchalari bo'lmasa, boshqa patogen mikroblar ham yo'q deb hisoblanadi.

Ichak tayoqchalari odam va issiq qonli hayvonlar mikroflorasining tipik vakilidir. Ular tashqi muhitda saprofitlar kabi yashaydi. Odam chiqindisining 1 g da ichak tayoqchalarining yuzlab, millionlab hujayralari bo'ladi. Bu bakteriyalarning suv yoki mahsulotda topilishi ularning fekal ifloslanganligini ifodalaydi. Ichak tayoqchalari sanitar-ko'rsatkich (indikator) mikroorganizm vazifasini bajaradi.

Ichak tayoqchalari guruhiga *Enterobacteriaceae* oilasiga mansub uchta turkum: *Escherichia* turkumi (*E. coli*, *E. coli* var. *coliforme*, *E. coli* var. *aureescens*), *Citrobacter* turkumi (*C. freundii*, *C. freundii* var. *parafreundii*, *C. freundii* var. *intermedium*) va *Enterobacter* turkumi (*E. aerogenes*, *E. aerogenes* var. *acrogenoides*, *E. sloacae*, *E. alginolyticus*) kiradi. Keyingi ikkita turkum birinchisidan farq qilib, cheklangan sanitar ahamiyatga ega va yangi, fekal ifloslanish ko'rsatkichi sifatida baholanmaydi.

Ichimlik suvning sifatiga amaldagi GOST bo'yicha baho berishda 35-37°C da 24 soat ichida glyukozani bijg'itib, kislota va gaz hosil qiladigan ichak tayoqchalari hisobga olinadi. Bular grammanfiy kalta asporogen tayoqchalar bo'lib, fuksin-sulfatli agarda (Endo muhitida) o'sadi va metallsimon yaltiroq qizil, to'q qizil va o'rtasi qoramtir bo'lgan pushti, shuningdek, bo'yalmagan shaffof koloniyalar hosil qiladi. Bakteriyalarning o'lchami 0,5 x 1-2 mkm ga teng, ko'pchiligi harakatchan, keng harorat diapazonida (15-55°C gacha) o'sadi, optimumi 37°C ga yaqin, 60°C da nobud bo'ladi, aerob yoki fakultativ anaeroblardir. GPA da bir kunda kulrang-havorang tovlanuvchi shaffof koloniyalar hosil qiladi; koloniyalarning cheti yoyilgan yoki

to'liqsimon. Suyuq oziq muhitida o'stirilganda muhitni kuchli loyqalashtiradi (xiralashtiradi) va och kulrang cho'kma hosil qiladi, parda hosil qilmaydi. Jelatinni suyultirmaydi, laktozani va boshqa shakarlarni bijg'itish xossasiga qarab o'zgaradi. Ichak tayoqchasi guruhiga mansub bakteriyalarni differensiyalashda yuqorida aytilgan morfologik, kultural va biokimyoviy belgilardan tashqari, indol, atseton, vodorod sulfid, ureaza hosil bo'lishi kabi ko'rsatkichlari, metil qizil bilan reaksiyasi, sitratdan foydalanish ham hisobga olinadi.

Membranali filtrlar usuli. Ushbu usul oziq-ovqat korxonalari laboratoriyalarida keng tarqalgan. Boshqa usullarga qaraganda bir qancha afzalliklarga ega, chunki tahlil muddatini 24 soatgacha kamaytiradi, kam mehnat talab qiladi, suvdagi hatto juda kam miqdordagi mikroorganizmlarni ham aniqlashga, koloniyalarni bevosita va aniq sanashga, ularni toza holda ajratib olishga imkon beradi.

Membranali filtrlar diametri 35 mm va qalinligi 0,1 mm bo'lgan teshik-teshik sellyuloza plyonkadir. Teshiklarining diametri quyidagicha bo'lishi bilan xarakterlanadi (mkm): №1-0,35; №2-0,5; №3-0,7; №4-0,9 va №5-1,2. Suvdagi ichak tayoqchasi guruhi bakteriyalarini hisobga olishda №3 filtrdan foydalaniladi. Suv muallaq dag'al zarrachalardan tozalanadigan dastlabki filtrlar teshigining diametri 3-5 mkm bo'ladi.

Filtrlash uchun Zeys asbobidan foydalaniladi (22-rasm). U avtoklavda yoki spirt bilan namlangan tampon yordamida va kuydirib sterillanadi. Membranali filtrlarni fabrika o'ramidan ochib, kamchiligi – yorilgan, uzilgan, singan joylari yo'qligi tekshiriladi. Ularni ishlatishdan oldin distillangan suvli stakanga tushiriladi va 20-30 minut saqlanadi. Stakandagi distillangan suv 50-60°C gacha issiq bo'ladi. Keyin suvni to'kib tashlab, yangisi quyiladi. 2-3 marta ana shunday qilinadi. So'ngra filtrlar 1 minut qaynatiladi, suvini to'kib, yangisi quyiladi, havo va filtrni tayyorlashda ishlatigan organik kislotalar batamom chiqib ketishi uchun 15-20 minut qaynatiladi. Qattiq qaynatilmaydi, chunki bunda filtrning teshiklari buzilib ketadi. Tayyor bo'lgan filtrni sterillangan chetlari tekis pinsetda olib, Zeys asbobining metall to'ridagi asbest plastinkaga xira tomonini yuqoriga qaratib qo'yiladi. Filtrga ehtiyotlik bilan voronka o'rnatib, uni metall qisqich bilan yaxshilab mahkamlanadi yoki vint bilan burab qo'yiladi. Voronkaga tekshiriladigan suvni solib, asbob suv oqimli elektr nasosga yoki Kamovskiy nasosiga ulanadi.

Quvur (vodoprovod) suvini (pivo, alkogolsiz ichimliklar, yuvish suvlarini) tahlil qilish uchun undan 300-500 ml olinadi. Yarim tayyor mahsulotlar (kupaj, sharbat va hokazolar) oldin tayyor ichimlik holiga

kelguncha sterillangan suv bilan suyultirilgandan keyin tahlil 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.

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 qosozga shimdirib olinadi. Oddiy diametrli likopchaga 4-5 ta filtr qo'yiladi. Likopcha tubida filtrning tagida ekish muddati, tahlil nomeri va filtrlangan suvning hajmi ko'rsatilgan yozuv bo'ladi. Ekilgan bakteriyalar termostatda 37°C issiqda 18-24 soat o'stiriladi. Shundan keyin lupada qarab, ichak tayoqchasiga xos koloniyalar sanab chiqiladi. 2-3 ta koloniyadan surtma tayyorlab, Gram usulida bo'yaladi. Grammanfiy bakteriyalar ichiga 5 ml glyukoza-peptonli oziq muhiti (Eykman muhiti) quyilgan bijg'itish probirkalarga ekiladi. Probirkalar 43°C issiq termostatda 24 soat saqlanadi. Probirkalarda gaz va loyqa (quyqa) hosil bo'lishi tekshirilayotganda suvda ichak tayoqchasi guruhi bakteriyalarining mavjudligidan dalolat beradi. Eykman muhitini bijg'itib, gaz hosil qiladigan grammanfiy bakteriyalar koloniyasining umumiy soni hisobga olinadi. Masalan, filtrda 5 ta tipik koloniya o'sgan, filtrlangan suv miqdori 500 ml. Binobarin 100 ml suvda bitta ichak tayoqchasi bo'lgan, ya'ni koli-titri 100 ga, koli-indeksi 10 ga teng.

Bijg'ituvchi namuna usuli. Tekshiriladigan suv ichida Eykman yoki Bulir muhiti bo'lgan bijg'ituvchi idishlarga (butilka, kolba, naychali probirkalarga) quyiladi. Quvur yoki artesian suvini tekshirishda uning 300 ml (100 ml dan 2 hajmga, 10 ml dan 10 hajmga) ekiladi. 100 ml suv konsentrlangan 10 ml oziq muhit bo'lgan kolba yoki butilkalarga, 10 ml suv 1 ml o'sha muhit bo'lgan probirkalarga quyiladi, ya'ni muhit bilan suvning nisbati 1:10 bo'ladi.

Markazlashtirilmagan suv ta'minoti manbalari (quduq, buloq)ning suvini tekshirishda 200-300 ml suv olib, koli-titrni aniqlash uchun 100, 10, 1 va 0,1 ml hajmlisi ekiladi. Daryo, hovuz, ko'llar suvidan 100 ml olib, 10 marta suyurtiriladi (1:10 dan 1*10⁵ gacha) va suyultirmasdan 10, 1 ml, hamda suyultirilgan suvlardan 1 ml dan olib, koli-titrini aniqlash uchun Kessler muhitiga ekiladi. Oqova suvlar koli-titrini

aniqlash uchun suyultirmagan suvdan 1 ml va suyultirganlaridan ham 1 ml dan olib (1:10 dan 1:106 gacha) Kessler muhitiga ekiladi.

Sharbatlar va alkogolsiz meva ichimliklari koli-titrini aniqlashda 2 hajm 100 ml dan va 10 hajm 10 ml dan olinadi. Ichimliklar Bulir, Kessler muhitiga qo'shilganda yaxshi natija olinadi. Pivodan Kessler muhitiga 10, 1; 0,1 va 0,01 ml qo'shiladi: 10 ml pivoga 50 ml oziq muhiti, 1 ml pivoga – 10 ml va 0,1 hamda 0,01 ml pivoga 5 ml dan oziq muhiti qo'shiladi.

Pivo va oziq muhiti solingan idishlar 43°C issiq termostatda 18-24 soat saqlanadi. Shundan keyin kolba va probirkalarni ko'rib chiqib, gaz hosil bo'lishi va loyqalanishi qayd etiladi. Agar quvur suvi tekshirilganda mikroorganizmlar o'smagan bo'lsa, tahlil tugallanadi va koli-titri 300 dan yuqori deb hisoblanadi. Ifloslangan (daryo, oqava) suvning tahlilida mikroorganizmlar topilmasa, yana bir kun saqlanadi. Agar mikroorganizmlar o'sgan bo'lsa, bijg'ituvchi titri aniqlanadi, bu gaz hosil bo'lishi qayd etilgan eng kam suyultirmadir.

Endo muhitiga ekish usuli. Muhit loyqalangan, gaz hosil bo'lgan kolba va probirkalardan bir tomchi suyuqlik olib, Endo muhitga shtrix usulda shunday ekish kerakki, koloniyalar bir-biridan ajralgan holda o'sib chiqsin. Likopchanning tubini bir necha qismga bo'lib, har bir probirka yoki kolbadan tomchi suyuqlik olib, alohida-alohida qismga ekiladi. Keyin likopchalarni 37°C issiq termostatga qo'yib 24 soat saqlanadi. Ichak tayoqchasi guruhiga mansub bakteriyalar koloniyasining yo'qligi qat'iy oxirgi natija hisoblanadi. Agar likopchada tipik rangli va rangsiz koloniyalar bo'lsa, surtma tayyorlanadi, Gram usulida bo'yaladi va mikroskopda tekshiriladi. Surtmalarda kalta grammanfiy asporagen tayoqchalar bo'lishi ichak tayoqchasi guruhiga mansub bakteriyalar borligini bildiradi.

Ikkilamchi bijg'ituvchi namuna. Surtmada grammanfiy bakteriyalar topilgan koloniyalar naychali va ichiga Eykmaning glyukoza-pentonli oziq muhiti yoki glyukoza aralash yarim suyuq agar solingan probirkalarga qayta ekilib, 43°C issiq termostatda 24 soat saqlanadi. Gaz hosil bo'lmasligi salbiy natija beradi, gaz hosil bo'lishi ichak tayoqchasi bakteriyalari borligini ifodalovchi oxirgi ijobiy natija bo'ladi. Tahlil natijalari, 1-4-jadvaldan foydalanib, koli-indeks va koli-titr shaklida ifodalanadi.

Quvur (vodoprovod) suvi

(Ekiladigan hajmlar: 2 hajmda 100 ml dan, 10 hajmda 10 ml dan)

100 ml ga	0		1		2	
10 ml dan musbat hajmlar soni	koli-indeksi	koli-titri	koli-indeksi	koli-titri	koli-indeksi	koli-titri
0	<3	>333	4	250	11	91
1	3	333	8	125	18	56
2	7	143	13	77	27	37
3	11	91	18	56	38	26
4	14	71	24	42	52	19
5	18	56	30	33	70	14
6	22	45	36	28	92	11
7	27	37	43	23	120	8
8	31	32	51	20	161	6
9	36	28	60	17	230	4
10	40	25	69	14	>230	<4

Qudug suvi

(Ekiladigan hajmlar: 100, 10, 1 va 0,1 ml)

100	10	1	0,1	Koli-indeksi	Koli-titri	100	10	1	0,1	Koli-indesi	Kolittitri
-	-	-	-	<9	>111	-	+	+	+	28	36
-	-	-	+	9	111	+	-	-	+	92	11
-	-	+	-	9	111	+	-	+	-	94	10

-	+	-	-	9,5	105	+	-	+	+	180	6
-	-	+	+	18	56	+	+	-	-	230	4
-	+	-	+	19	53	+	+	-	+	960	1
-	+	+	-	22	46	+	+	+	-	2380	0,4
+	-	-	-	23	43	+	+	+	+	>2380	<0,4

3-jadval

Daryo suvi

(Ekiladigan hajmlar: 10, 1, 0,1 va 0,01 ml)

10	1	0,1	0,01	Koli- indeksi	Koli- titri	10	1	0,1	0,01	Koli- indeksi	Koli- titri
-	-	-	-	<90	>11,1	-	+	+	+	280	3,6
-	-	-	+	90	11,1	+	-	-	+	920	1,1
-	-	+	-	90	11,1	+	-	+	-	940	1,0
-	+	-	-	95	10,5	+	-	+	+	1800	0,6
-	-	+	+	180	5,6	+	+	-	-	2300	0,4
-	+	-	+	190	5,3	+	+	-	+	9600	0,1
-	+	+	-	220	4,6	+	+	+	-	23800	0,04
+	-	-	-	230	4,3	+	+	+	+	>23800	<0,04

4-jadval

Oqar suv

(Ekiladigan hajmlar: 1, 0,1 0,01 va 0,001)

1	0,1	0,01	0,001	Koli- indeksi	Koli- titri	1	0,1	0,01	0,001	Koli- indeksi	Koli- titri
-	-	-	-	<900	>1,11	-	+	+	+	2800	0,36

-	-	-	+	900	1,11	+	-	-	+	9200	0,11
-	-	+	-	900	1,11	+	-	+	-	9400	0,10
-	+	-	-	950	1,05	+	-	+	+	18000	0,06
-	-	+	+	1800	0,56	+	+	-	-	23000	0,04
-	+	-	+	1900	0,53	+	+	-	+	96000	0,01
-	+	+	-	2200	0,46	+	+	+	-	238000	0,004
+	-	-	-	2300	0,43	+	+	+	+	238000	0,004

Sinov savollari:

1. Oziq-ovqat sanoatida ishlatiladigan suv qanday talablarga javob berishi kerak?
2. Shahar suv tarmog'idan foydalanilganda tahlil ishlari qancha muddat oralig'ida olib boriladi?
3. Ichak tayoqchalari guruhiga kiruvchi bakteriyalar miqdorini qanday aniqlanadi?
4. Koli-indeks nima?
5. Koli-litr nima?
6. Bijg'ituvchi namuna usuli qanday amalga oshiriladi?

14-laboratoriya ishi

Muhim oziq-ovqat mahsulotlari mikroflorasi

Ishdan maqsad: oziq-ovqat sanoatida ishlatiladigan amalda muhim ahamiyatga ega bo'lgan ayrim mikroorganizmlarning, shuningdek, oziq-ovqat mahsulotlarini buzadigan ko'p tarqalgan qo'zg'atuvchilarning elektiv kulturasidan namunalar olish usullari bilan tanishish.

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 kulturasini olish usullari bayon etiladi.

Har bir talaba biror elektiv kulturani 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 qo'yiladi; ikkinchi mashg'ulotda tajriba

natijasi tahlil qilinadi.

Sut kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma kulturasini olish. Bunda qattiq, tuzlangan sabzavot va mevalar, o'simliklar guli yoki bargi va boshqa obyektlar sut kislota hosil qiladigan bakteriyalarni ajratib olish uchun boshlang'ich material bo'lib xizmat qiladi. Sut kislota hosil qiluvchi bakteriyalar o'stiriladigan elektiv muhit 3-ildoda berilgan. E.I. Kvasnikov sut kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning spirtga chidamliligini hisobga olib, sut kislota hosil qiluvchi mezofil bakteriyalarning yig'ma kulturasini olishning quyidagi usulini taklif etdi: tekshiriladigan material optimal muhitga ekiladi va 18-24 soatdan keyin unga etil spirt qo'shiladi. Sut kislota hosil qiluvchi kokklarni ajratib olish uchun muhitdagi spirt konsentratsiyasini 8-10 hajm % (foiz), sut kislota hosil qiluvchi tayoqchalar uchun 12-14 hajm % darajada saqlash mumkin. Spirtli manbalar (sharob, brajka, pivo)dan ajratib olingan ba'zi turlar (*Lactobacillus buchneri*, *L. brevis*, *L. fermenti*) uchun spirt konsentratsiyasi 16-18 hajm % gacha oshiriladi.

Sut kislota hosil qiluvchi termofil bakteriyalarning yig'ma kulturasini 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'liqinsimon loyqa paydo bo'ladi; mikroskopda tekshirilganda ingichka uzun, harakatlanmaydigan sporasiz tayoqchalar ko'rinadi.

Achitqilarning yig'ma kulturasini olish. Boshlang'ich material sifatida presslangan yoki ekiladigan ishlab chiqarish achitqilaridan, pishgan uzum, rezavor mevalardan, pivo yoki sharbat cho'kmasidan, non achitqilari va hokazolardan foydalanish mumkin. Materialdan ozgina olib, solod sharbatiga (pH 4-4,5), uzum sharbatiga sentetik elektiv muhitga qo'shilsa va termostatda 28-30°C da saqlansa, achitqilar avj olib rivojlanadi. Solod sharbatida avj olib rivojlanadigan mitseliyli zamburug'larning o'sishi oldini olish uchun 4-6 hajm % etil spirt yoki 0,2% natriy propionat qo'shish mumkin. Birga uchraydigan bakteriyalar muhitga levomitsetin (50 mg/l), neomitsin (20 birlik/mg) yoki penitsillin bilan steptomitsinning aralashmasini (50-100 birlik/ml) qo'shib yo'qotiladi. Takomillashmagan achitqilarni yo'qotish uchun oziq 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 bakteriyalarni yig'ma kulturasini olish. Bu

kulturalar dastlab pasterizatsiya qilingan substratlardan olinadi. *Bacillus subtilis*ning yig'ma kulturasini uchun maydalab qirg'ilgan pichan ustiga 40°C gacha isitilgan suv quyib, keyin 10-15 minut qaynatiladi. 2-3 kundan keyin substrat yuzasida akatsiya hidi anqib turadigan kulrang-ko'k plyonka hosil bo'ladi. U *B. subtilis* tayoqchalaridan tashkil topgan bo'ladi.

Moy kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma kulturasini olish. Buning uchun bo'r (mel) qo'shilgan va 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 (Megapaskal)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 kolbalarga 8-10 ml dan ekiladi. Bulardan tashqari, 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 kulturasini 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 pasterillanadi, 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 kulturasini olish. Buning uchun 50 ml hajmli konussimon kolbaga oziq muhiti – pasterillangan pivodan yupqa qatlam qilib, (1-1,5 sm) quyib, yana 1 ml 5%li sirka kislota qo'shiladi. Muhitga kislota qo'shish sirka kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning rivojlanishiga to'siqlik 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 kulturasini solodli yoki karamli muhitda ularga 4 hajm % etil spirt va 20 birlik/ml monomitsin antibiotigi qo'shib va bu muhitlarga achigan sharob, pivo yoki boshqa materiallarni ekish yo'li bilan olinadi.

Chirituvchi bakteriyalarning elektiv kulturasini olish. *Proteus* (*Proteus vulgaris*) va kartoshka tayoqchasi (*Bac. mesentericus*)

chirituvchi bakteriyalarning tipik vakillari hisoblanadi. Bularning yig'ma kulturasini olish uchun ichida sterillangan GPB (go'sht-pepton buyolon) bo'lgan probirkaga ozgina tuproq solinadi. Probirkani 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 kulturasini olish. Protey nihoyatda harakatchanligi bilan xarakterlanadi, mayda tayoqcha shaklida bo'lib, spora hosil qilmaydi, Gram usulida bo'yalmaydi. Ayrim tur xillari toksin ishlab chiqaradi. Bu bakteriyalar ko'paygan mahsulot iste'mol qilinsa, zaharlanish mumkin. Yig'ma kultura 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 faol 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 va mikroskopda qaraladi. Bunda hujayralarning shakli va harakatchanligi qayd etiladi.

Kartoshka tayoqchasining yig'ma kulturasini olish. *Bacillus mesentericus* spora hosil qiluvchi harakatchan tayoqcha. Uning yig'ma kulturasini olish sporalarning issiqqa chidamliligiga va ishlatiladigan oziq 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 qo'yib, 30°C da 2-3 kun saqlanadi. Kartoshka bo'lakchalari ustida *B. mesentericus* jigarrang mayda yoki yirik burmali g'ubor shaklida o'sadi. G'uborni mikroskopda ko'riladi, "ezilgan tomchi" va oddiy usulda bo'yalgan preparat tayyorlanadi.

Sinov savollari

1. Sut kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma kulturasini olish uchun nima qilish kerak?
2. Achitqilarning yig'ma kulturasini olish qanday amalga oshiriladi?
3. Spora hosil qiluvchi bakteriyalarga qanday bakteriyalar kiradi?
4. Proteylarning yig'ma kulturasini olishda qanday oziq muhitidan foydalaniladi?
5. Kartoshka tayoqchasiga qaysi mikroorganizm kiradi?

15-laboratoriya ishi

Oqsil chirishi jarayonida ishtirok etadigan bakteriyalarni aniqlash

Ishdan maqsad: Oqsil chirishi jarayonida va organik birikmalarni parchalanishida ishtirok etadigan ammonifikatsiya bakteriyalarni o'rganish.

Kerakli jihozlar: kolba, pepton (eruvchan oqsil), tuproq, qizil lakmus qog'oz, qo'rg'oshin atsetat $[Pb(CH_3COO)_2]$ tuzi eritmasi va oksalat kislota ($H_2C_2O_4$), shimdirilgan qog'ozlar, tiqin tayyorlash uchun paxta, buyum oynalari, fuksin, mikroskop, bakterial ilmoq, immersion moy (kedr moyi).

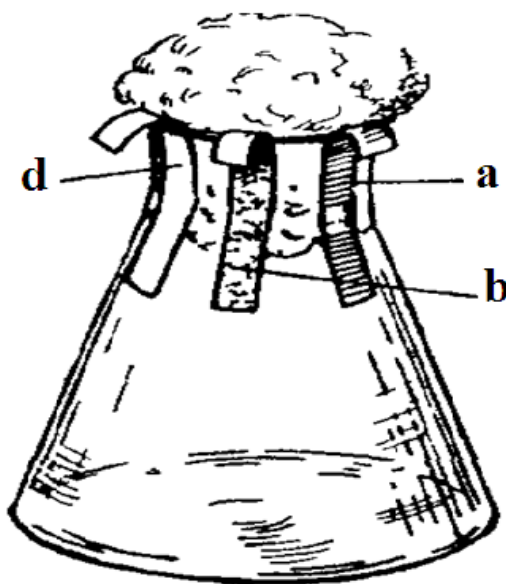
Nazariy tushuncha: Ammonifikatsiya jarayoni. Oqsil va tarkibida azot bo'lgan boshqa organik birikmalar parchalanib, o'zida ammiak hosil qilishi **ammonifikatsiya** deyiladi. Odatda, bu jarayon **oqsilning chirishi** deb aytiladi. Oqsil chirishi jarayonida ammiakdan tashqari, H_2S , indol (C_8H_7N), metil-merkaptan (CH_3CH), fosfat kislota (H_3PO_4) va boshqa birikmalar hosil bo'ladi. O'zidan tashqi muhitga proteolitik fermentlar ishlab chiqaradigan tirik organizmlargina bevosita oqsilga ta'sir qila oladi va uni parchalaydi. Boshqa organizmlar pepton va aminokislotalarni ammiakkacha parchalashi mumkin. Ammonifikatsiya jarayonida bakteriyalardan tashqari, aktinomitsetlar va mog'or zamburug'lari ham qatnashadi. Ammonifikatsiya jarayoni tabiatda keng tarqalgan bo'lib, qishloq xo'jaligida juda muhim rol o'ynaydi. Bu jarayonda hayvon va o'simliklar qoldig'i tarkibidagi azotli organik

moddalar parchalanib, oʻsimliklarning oziqlanishi uchun zarur boʻlgan mineral moddalar hosil boʻladi. Shuni ham aytib oʻtish kerakki, agar tabiatda ammonifikatsiya jarayoni yuz berib turmasa, yer shari oʻsimlik va hayvonlar qoldigʻi bilan toʻlib ketgan boʻlar edi.

Demak, ammonifikatsiya jarayoni tabiatda azotning aylanishida birinchi tartibli jarayon boʻlib hisoblanadi. Bu jarayonda qatnashuvchi bakteriyalar juda xilma-xil boʻlib, ularning baʼzi turlari anaerob, ikkinchi xil turlari aerob sharoitda hayot kechiradi. Bu jarayonda fakultativ anaerob bakteriyalar ham ishtirok etadi.

Ishning borishi: Bu ishni bajarish uchun 200 ml hajmli kolbaga uning 3/4 qismigacha 3% li pepton eritmasi toʻldirilib, eritma ichiga 0,5 g chamasida tuproq aralashtiriladi. Tuproq tarkibidagi aerob va anaerob bakteriyalar taʼsirida bu aralashmada ammonifikatsiya jarayoni boshlanadi.

Kolba ogʻziga qoʻyilgan paxta tiqinning bir joyiga qizil lakmus qogʻoz, ikkinchi joyiga konsentrlangan oksalat kislotasi ($H_2C_2O_4$) va uchinchi joyiga qoʻrgʻoshin atsetat $[Rb(CH_3COO)_2]$ tuzi eritmasi shimdirilgan qogʻoz parchalari osib qoʻyiladi. Bakteriyalarga qulay sharoit yaratish uchun kolba $30^{\circ}C$ li issiq termostatga qoʻyiladi (22-rasm).

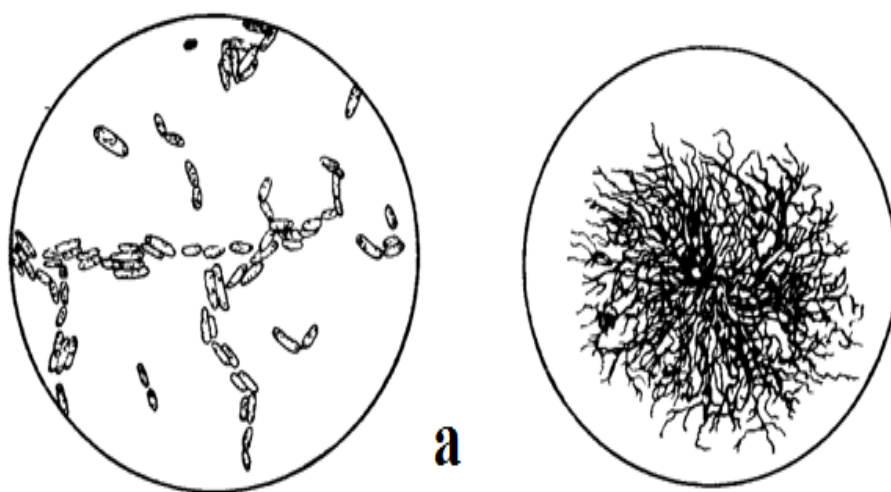


22-rasm. Ammonifikatsiya jarayonini tekshirish uchun tajribaning qoʻyilishi:

a – qizil lakmus qogʻoz; b – oksalat kislotasi ($H_2C_2O_4$) tuzi eritmasi shimdirilgan filtr qogʻoz; d – qoʻrgʻoshin atsetat ($Pb(CH_3COO)_2$) tuzi eritmasi shimdirilgan filtr qogʻoz.

Oradan bir necha kun o'tgach, kolba tiqiniga osib qo'yilgan qog'ozlarning rangi o'zgargan-o'zgarmaganligi tekshiriladi. Jumladan, qizil lakmus qog'oz jarayon vaqtida ajralib chiqqan ammiak ta'sirida ko'k rangga kiradi. Qo'rg'oshin atsetat tuzining eritmasi shimdirilgan qog'oz H_2S ishtirokida qora rangga, oksalat kislota shimdirilgan qog'oz indol ta'sirida pushti rangga bo'yaladi.

Mikroskopda oval shaklli spora hosil qiladigan kichik tayoqcha-*Batsillus mikoides* (*Bacillus mycoides*) borligi ko'rinadi. Bu batsilla peritrix tipda joylashgan xivchinli bo'lib, oqsilni ammiakkacha parchalaydi. Qattiq oziq muhiti betida zamburug' mitsellalari (iplari) ga o'xshash koloniyalar hosil qiladi (23-rasm, a). Oqsilning chirishida pichan batsillasi (*Bacillus subtilis*) ham faol qatnashadi (23-rasm, b). Oqsilning anaerob sharoitda parchalanishida qatnashadigan batsillus putrifikans (*Bacillus putricus*)ning bor-yo'qligini aniqlash uchun kolbadagi suvning pastki qatlamidan bir tomchi eritma olib surtma tayyorlanadi. Surtma quritilgandan so'ng bo'yaladi va mikroskopda tekshiriladi. Bo'yalgan surtmada spora hosil qiluvchi, baraban tayoqchasi shaklidagi batsilla borligi ko'rinadi (23-rasm, c).

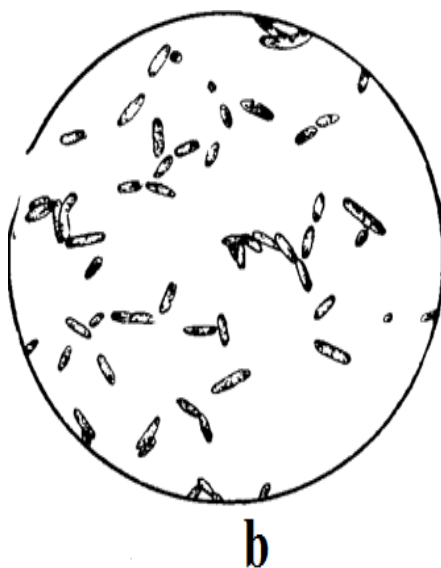


23-rasm. Ammonifikatsiya jarayonida qatnashadigan mikroorganizmlar:

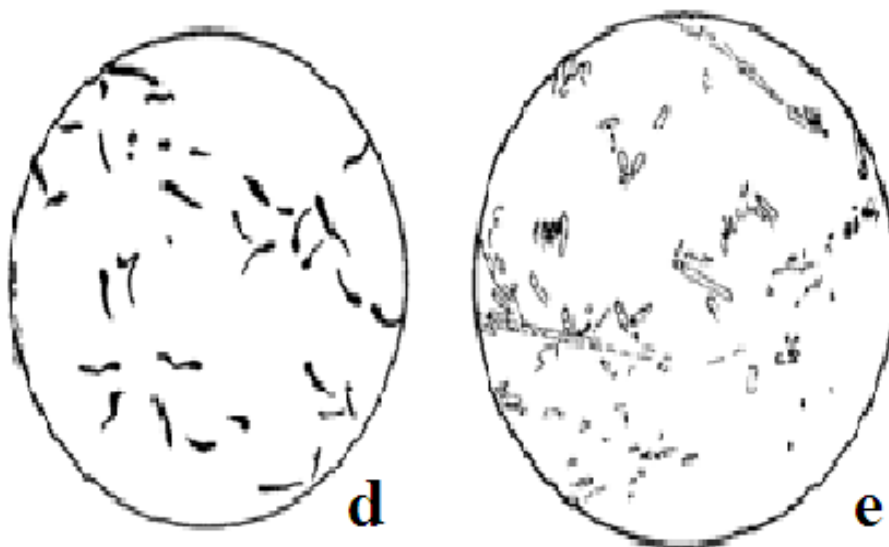
a – *Batsillus mikoydes* (*Bacillus mycoides*); chap tomonda spora hosil qilish oldidagi vegetativ hujayralar, o'ng tomonda koloniyalari.

Proteus vulgaris (*Proteus vulgaris*) nomli bakteriya (23-rasm, d) esa ingichka tayoqchalar shaklida ko'rinadi. Bu bakteriya spora hosil qilmaydi. Oqsilning parchalanishi natijasida indol va H_2S hosil bo'ladi. Agar muhitga uglevod berilsa, bu holda karbonat angidrid va vodorod

gazlari ham ajraladi. *Proteus vulgaris* fakultativ anaerob bakteriya bo'lib, aerob va anaerob sharoitda hayot kechiradi.



b – *Batsillus subtilis* (*Bacillus subtilis*)



d - *Batsillus putrifikus* (*Bacillus putrificus*); e – *Proteus vulgaris* (*Proteus vulgaris*)

Sinov savollari:

1. Oqsil chirishi jarayonida qanday bakteriyalar ishtirok etadi?
2. Ammonifikatsiya deb nimaga aytiladi?
3. Ammonifikatsiya jarayonini qanday tekshiriladi?
4. Ammonifikatsiya jarayonida qaysi mikroorganizmlar qatnashadi?

16-laboratoriya ishi

Spirтли bijg'ish va bu jarayonni qo'zg'ovchi tirik organizmlar

Ishdan maqsad: Mikroorganizmlar yuzaga keltiradigan muhim biokimyoviy jarayonlarni, jumladan spirтли bijg'ish jarayonini qo'zg'ovchi tirik organizmlarni o'rganish.

Kerakli jihozlar: mikroskop, kolbalar, egri shisha nay o'rnatilgan kauchuk tiqin, suvli idish, probirkalar, quruq achitqi, pivo achitqisi, suv hammomi, termometr, shakarning 10% li eritmasi, ishqorning 10% li eritmasi, buyum va qoplagich oynalar, yod eritmasi, hovoncha.

Nazariy tushuncha: Spirтли bijg'ish. Tabiatda mikroorganizmlarning foydali va foydasiz turlari juda ko'p tarqalgan. Shuning uchun zararli mikroorganizmlarning hayot jarayonlari o'rganilib, ularga qarshi kurash choralari ishlab chiqilmoqda. Foydali mikroorganizmlarning hayot jarayonida hosil bo'ladigan mahsulotlarni xalq xo'jaligida ishlatish uchun ularning faol shakllaridan foydalanilmoqda. Bu organizmlardan to'g'ri va samarali foydalanish uchun tabiatda eng muhim hisoblangan spirт, sut, moy, kletchatka, pektin kabi moddalarning bijg'ish jarayoni bilan, shuningdek, spirтning oksidlanishi natijasida sirka kislota hosil bo'lish yo'llari bilan qisqacha tanishib o'tish zarur.

Vino tayyorlash usullari qadimdan ma'lum bo'lishiga qaramay, shakarning parchalanishi natijasida etil spirт hosil bo'lishi XVII asr oxiridagina aniqlangan. Lavuaze ma'lumotiga ko'ra, shakarning parchalanishi natijasida etil spirт va karbonat angidrid ajralib chiqadi. Bu reaksiya tubandagicha boradi:



Spirтли bijg'ish jarayoni tirik organizmlar ishtirokida borishini, ya'ni biologik jarayon ekanligini Lui Paster 1858 yilda ko'rsatib o'tdi. Bu davrgacha spirтли bijg'ish jarayoni kimyoviy reaksiyalardan iborat hodisa deb qaralgan, xolos.

Spirтли bijg'ish jarayoni *Sacharomyces* oilasiga kiradigan achitqi zamburug'larining ishtiroki bilan borishini ham Lui Paster aniqlagan. Bu jarayon havosiz sharoitda borganligini nazarda tutib, u bijg'ish – anaerob sharoitdagi hayot ekanligini uqtirib o'tgan.

Ba'zi mog'or zamburug'lari ham bijg'ish jarayonini qo'zg'aydi. Lekin bular ta'sirida hosil bo'lgan spirт miqdori 5-7% dan oshmaydi. 1 g shakar bijg'ishi natijasida 0,5 g chamasi spirт va boshqa mahsulotlar (sirka aldegid, gliserin, butil, izobutil va amil spirтlar, sirka va qahrabo

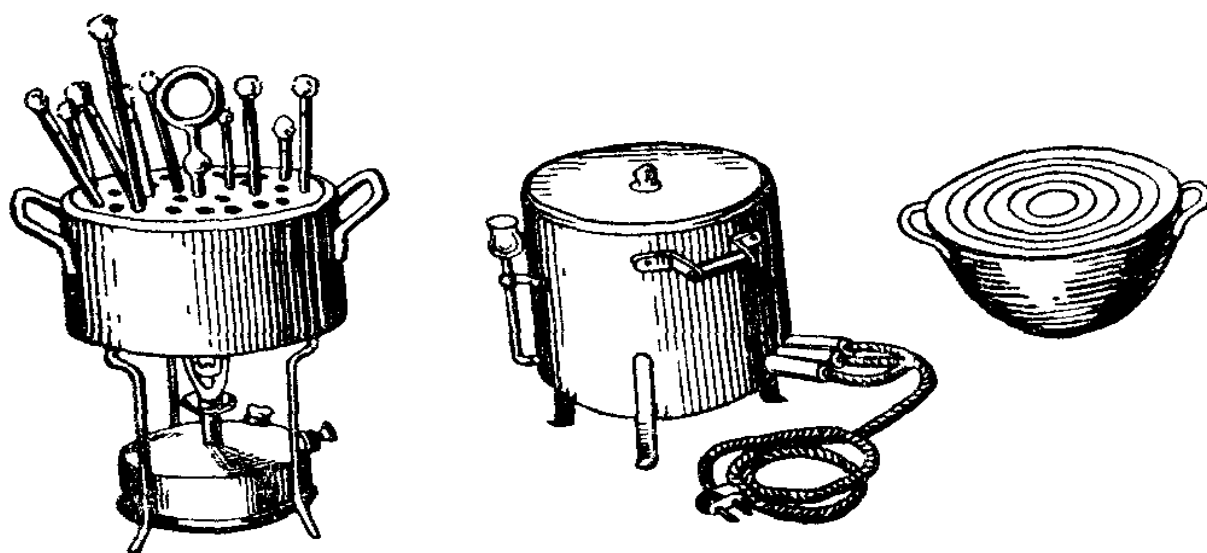
kislotalar) hosil bo'ladi. Shakarning 1-5% ga yaqin qismi zamburug'larning oziqlanishi vaqtida sarf bo'ladi. Reaksiya vaqtida ajralib chiqqan 25-27 kkal ga yaqin energiya zamburug'larning hayot faoliyatida sarflanadi.

Achitqi zamburug'lari fakultativ anaerob organizmlar qatoriga kirib, aerob sharoitda ham hayot kechira oladi. Achitqi zamburug'larining aerob sharoitdagi hayot faoliyati natijasida shakarning ko'p qismi suv va sirka kislotagacha parchalanib ketadi. Bunda spirt kam hosil bo'ladi. Bulardan tashqari, aerob sharoitda zamburug'larning ko'payish jarayoni ham tezlashadi. Shundan foydalanib, achitqi zamburug'larini to'plab olish maqsadida, bijg'ish jarayonida oziq muhiti ichiga havo yuborib turiladi.

Anaerob sharoitda 10-15% gacha etil spirt to'planadi. Agar bijg'ish vaqtida muhitga natriy sulfit tuzi (Na_2SO_3) qo'shilsa, spirt o'rniga 25% ga yaqin gliserin to'planadi. Demak, spirtli bijg'ish jarayonidan gliserin tayyorlash sanoatida ham foydalaniladi.

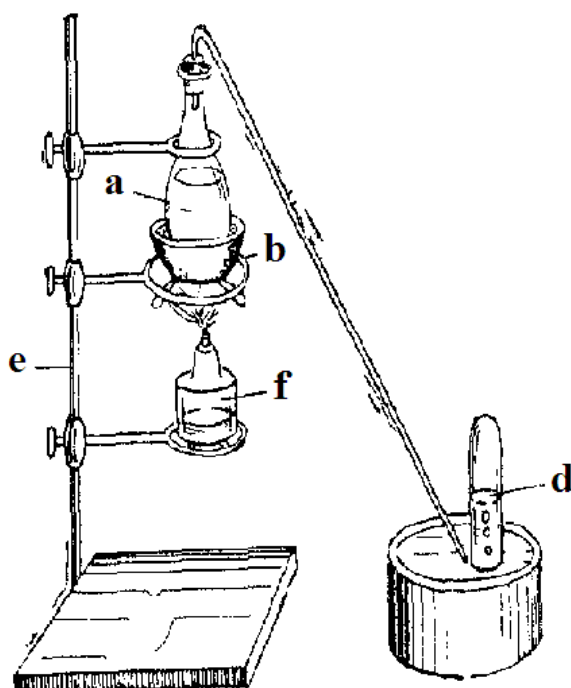
Spirtli bijg'ish jarayoni normal o'tishini ta'minlash uchun $\text{pH}=3-6$, harorat esa $25-40^\circ\text{C}$ bo'lishi kerak. Azot manbai sifatida pepton, aminokislotalar va ammiakdan foydalanish mumkin.

Ishning borishi: Bu mashg'ulotni o'tkazish uchun avval 3-5 g quruq achitqiga shakarning 10% li eritmasidan 10 ml qo'shib, hovonchada eziladi (eritiladi) va 40-60 minut tindiriladi. So'ngra 100 ml hajmli kolbaga shakarning 10% li eritmasidan 50 ml quyib, unga yuqoridagicha tayyorlangan achitqi-shakar aralashmasi qo'shiladi. Qolbaning og'zi egri shisha nay o'rnatilgai kauchuk tiqin bilan mahkam bekitiladi. Bijg'ish jarayoni faol o'tishi uchun kolba $30-35^\circ\text{C}$ li suv hammomiga joylanadi (24-rasm). Nayning ikkinchi uchiga suv to'ldirilgan probirka to'nkarib kiygizilib, suvli idishga botirib qo'yiladi (25-rasm). Oradan 20-30 minut o'tgach, bijg'ish jarayoni vaqtida ajralib chiqayotgan karbonat angidrid (CO_2) probirkaga to'planadi. Keyin probirkaning og'zi barmoq bilan bekitilib, pastga qaratilgan holda barmoq olinadi va darhol 10% li ishqor quyilgan stakanga botirib qo'yiladi. Probirkadagi CO_2 gazi ishqor bilan reaksiyaga kirishadi. Undagi gaz o'rnini ishqor oladi, ya'ni probirkani to'ldiradi. Ayni vaqtda kolbadan ajralib chiqayotgan gaz ikkinchi probirkaga to'ldirib olinadi va u yonishga yordam bermaganligi aniqlanadi.



24-rasm. Suv hammomlarining turlari

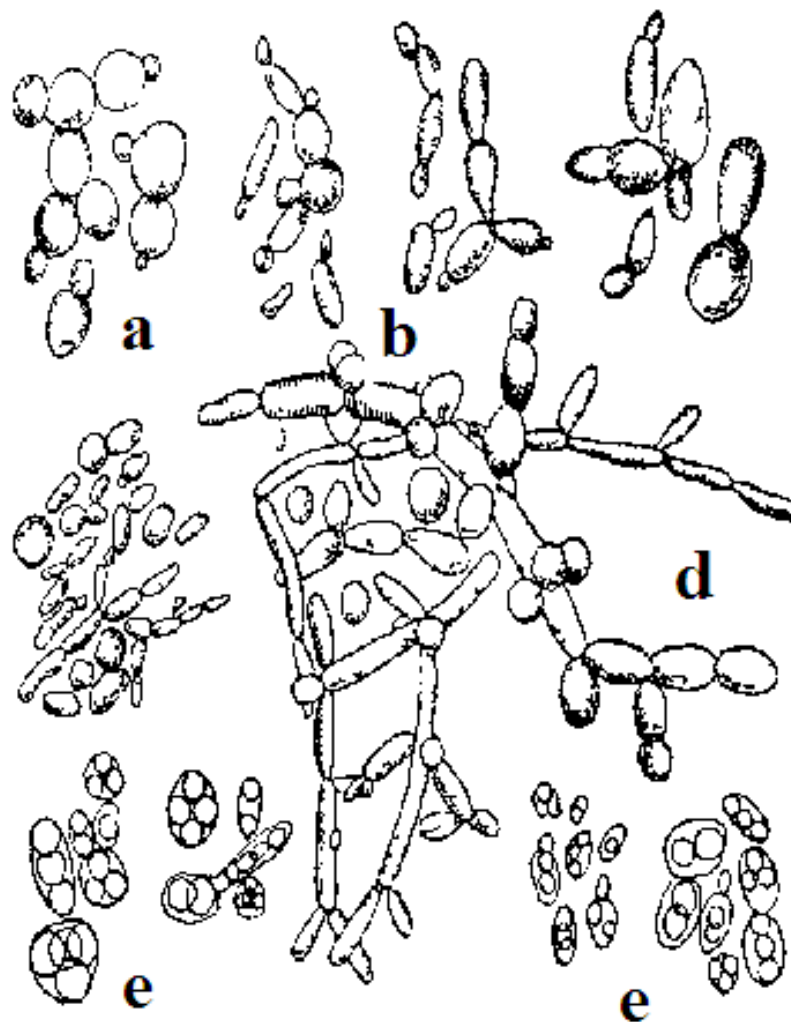
Achitqi zamburug‘larini mikroskopda ko‘rish uchun pivo achitqisidan foydalanish mumkin. Agar pivo achitqisi bo‘lmasa, quruq achitqi (xamirturush) suvda eziladi va eritiladi. Shu tartibda tayyorlangan eritmadan buyum oynasiga bir tomchi tomizib, usti qoplag‘ich oyna bilan yopiladi.



25-rasm. Spirtli bijg‘ish jarayonini kuzatish asbobi:

a – shakar bilan achitqi aralash eritma solingan kolba; b – suv hammomi; d – spirtli bijg‘ish vaqtida ajralib chiqqan CO_2 gazini to‘plab olish uchun qo‘yilgan probirka; e – shtativ; f – spirt lampasi.

Preparatda kurtaklanish yo‘li bilan ko‘payayotgan saxaromitses sereviziya (*Saccharomyces cerevisiae*) nomli zamburug‘ borligi ko‘zga tashlanadi. U oval shaklda bo‘ladi. Shu preparatning o‘zida boshqa shakldagi zamburug‘larni ham ko‘rish mumkin (26-rasm).



17 - rasm. Achitqi zamburug‘lari:

a – *Saccharomyces cerevisiae*, b – *Sacharomyces ellipsoideus*; d – kurtaklanish jarayonida hosil bo‘lgan koloniya; e – sporali hujayralar.

Zamburug‘lar tarkibida hayvon kraxmali-glikogen to‘planadi. Uni aniqlash uchun preparatga yod eritmasi tomiziladi. Yod ta’sirida glikogen kizg‘ish-qo‘ng‘ir rangga kiradi.

Sinov savollari:

1. Spirtli bijg‘ish deb nimaga aytiladi?
2. Spirtli bijg‘ishda qaysi tirik organizmlar qatnashadi?
3. Qaysi achitqi zamburug‘larini bilasiz?

Foydalanilgan adabiyotlar:

1. Sattarov M.E., Sultanova Sh.A., Safarov J.E. Mikrobiologiya fanidan laborotoriya ishlarini bajarish uchun uslubiy qo‘llanma. Toshkent. 2015.
2. Лысак В.В. Микробиология. Учебное пособие. Минск: БГУ, 2007.
3. Jacquelyn G. Black. Microbiology, 8th Edition International Student Version. Wiley. United States of America. 2012.
4. Прунтова О.В., Сахно О.Н. Лабораторный практикум по общей микробиологии. Владимир. 2005.
5. Нетусова А.И. практикум по микробиологии. Москва. Издательский центр «Академия». 2000.
6. Manufacturing Process and Equipment. George Tlusty. Prentice Hall Lewiston NY, U.S.A 1999.
7. Handbook of Food Processing Equipment (Food Engineering Series) 2nd ed. 2016 Edition, George Saravacos, Athanasios, E. Kostaropoulos Springer; 2nd ed. 2016 edition), USA 2015.

Elektron resurslar

1. <http://www.ziyo.net>
2. www.cbio.ru
3. www.biotex.ru
4. www.promega.com
5. www.molbio.ru
6. www.biotech.ru
7. <http://www.microbeworld.org/home.htm>– © 2002 American Society for Microbiology.
8. <http://www.bact.wisc.edu/Bact303mainpage>– © 2003, Dr. Kenneth T. (University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology).

MUNDARIJA

Mavzular	Bet
1-laboratoriya ishi. Mikrobiologiya laboratoriyasida ishlash tartibi, laboratoriyaga qo‘yiladigan talablar va maxsus laboratoriya jihozlari bilan tanishish.....	3
2-laboratoriya ishi. Mikroskopiya usullari. Yorug‘lik mikroskopining tuzilishi.....	11
3-laboratoriya ishi. Mikroorganizmlarni fiksatsiyalangan va bo‘yalgan holda tekshirish.....	13
4-laboratoriya ishi. Mikroorganizmlarning o‘lchamini aniqlash...	18
5-laboratoriya ishi. Mikroorganizmlar sonini aniqlash.....	20
6-laboratoriya ishi. Mikrob biomassasini aniqlash.....	26
7-laboratoriya ishi. Mikroorganizmlar kulturalari uchun oziq muhitlari tarkibi va ularni tayyorlash usullari.....	29
8-laboratoriya ishi. Sterilizatsiya va pasterizatsiya qilish usullari. Sterillash hamda mikroorganizmlarni parvarish qilish.....	32
9-laboratoriya ishi. Mikroorganizmlarni yig‘ma kulturalari va toza kulturalarini olish usullari.....	35
10-laboratoriya ishi. Mikroorganizmlarni kislorodga munosabatini aniqlash.....	37
11-laboratoriya ishi. Havo mikroflorasini o‘rganish.....	38
12-laboratoriya ishi. Havo tarkibidagi mikroorganizmlarni aniqlash va ularni bir-biridan ajratib olish.....	41
13-laboratoriya ishi. Suvning mikroorganizmlar bilan zararlanishini sanitar-bakteriologik tekshiruvi.....	43
14-laboratoriya ishi. Muhim oziq-ovqat mahsulotlari mikroflorasi.....	51
15-laboratoriya ishi. Oqsil chirishi jarayonida ishtirok etadigan bakteriyalarni aniqlash.....	55
16-laboratoriya ishi. Spirtli bijg‘ish va bu jarayonni qo‘zg‘ovchi tirik organizmlar.....	59
Foydalanilgan adabiyotlar	63

Qaydlar uchun

Tuzuvchi: Sattarov M.E., Parpiyev Z.T.
“Mikrobiologiya” fanidan laboratoriya ishlarini bajarish uchun
uslubiy qo‘llanma.

Muharrir: Sidikova K.A.