

М. Р. ЗОКИРОВА

ОЗИҚ-ОВҚАТ МИКРОБИОЛОГИЯСИ

фанидан
амалий ва лаборатория машғулоти учун

Ўқув қўлланма

Тошкент-2017

М.Р. Зокирова

ОЗИҚ-ОВҚАТ МИКРОБИОЛОГИЯСИ

ФАНИДАН

амалий ва лаборатория машғулоти учун

ЎҚУВ ҚЎЛЛАНМА

Т О Ш К Е Н Т

2017

МУНДАРИЖА

Кириш.....	5
Микробиологик лабораторияда ишлаш қоидалари	6
1. МИКРОСКОПИЯ	8
1.1. Ёруғлик микроскопларининг тузилиши.	8
1.2. Ёруғлик микроскопининг асосий характеристикалари	13
1.3. Микроскоп билан ишлаш қоидалари	14
1.4. Қоронғу майдондаги микроскопия.....	16
1.5. Фаза – контраст микроскопияси	17
1.6. Люминесцент микроскопия.....	18
1.7. Электрон микроскопия.....	20
2. МИКРОБИОЛОГИК ЛАБОРАТОРИЯНИ ТАШКИЛЛАШТИРИШ ВА ЖИҲОЗЛАШ.....	23
2.1. Микробиологик амалиётда қўлланилувчи стерилизация усуллари ва воситалари	24
3. МИКРООРГАНИЗМЛАР ПРЕПАРАТЛАРИНИ ТАЙЁРЛАШ УСУЛЛАРИ	31
3.1. Фиксацияланган бўялган микроорганизм препаратларини тайёрлаш.....	31
3.2. Микроорганизмларнинг тирик препаратларини тайёрлаш.....	33
3.3. Тамға препаратини тайёрлаш.....	34
3.4. Микробиологик амалиётда ишлатиладиган бўёқлар ва рН-индикаторлар.	35
4. МИКРООРГАНИЗМЛАРНИ ЎСТИРИШ	38
4.1. Озуқа мухитлари	40
4.2. Микроорганизмларни озуқа мухитларига экиш техникаси.....	42
5. МИЦЕЛИАЛ ЗАМБУРУҒЛАР МОРФОЛОГИЯСИНИ ЎРГАНИШ	46
5.1. Замбуруғлар классификацияси. Баъзи намоёндаларининг характеристикаси. 46	
6. АЧИТҚИЛАР МОРФОЛОГИЯСИНИ ЎРГАНИШ	62
6.1 Маданий ва ёввойи ачиткилар баъзи турларининг характеристикаси	63
6.2 Ачиткилар суспензияси таркибида мавжуд бўлган ўлик ва куртакланаётган хужайраларни аниқлаш	69
6.3 Ачитки хужайралари таркибида мавжуд бўлган захирадаги озуқа моддаларининг бўйлиши	71
6.4 Ачиткиларда спораларнинг ҳосил бўлиши.....	72
7. БАКТЕРИЯЛАР МОРФОЛОГИЯСИНИ ЎРГАНИШ	75
7.1. Бактерия шакллари.....	75

7.2 Бактерияларни Грам усулида бўйш.....	79
7.3 Бактериялар ҳаракатчанлигини аниқлаш.....	80
7.4 Бактериялар спораларини бўйш.....	80
7.5 Бактериялардаги капсулаларни аниқлаш.....	82
8. БАКТЕРИЯЛАРНИНГ КУЛЬТУРАЛ ВА ФИЗИОЛОГИК – БИОКИМЁВИЙ	
БЕЛГИЛАРИНИ АНИҚЛАШ.....	84
8.1 Бактерияларнинг культурал белгилари.....	84
8.2 Бактерияларнинг физиологик-биооикимёвий белгилари.....	86
9 СУТ БАКТЕРИЯЛАРИНИНГ ТОЗА НАМУНАСИНИ АЖРАТИШ	92
9.1 Йиғувчи намунани олиш	92
9.2. Тоza намунани ажратиш	93
9.3 Ажратилган намунанинг тозаллигини аниқлаш	94
9.4 Сут бактериялари ажратилган намунасини идентификация қилиш	95
10 МИКРООРГАНИЗМЛАРНИ МИҚДОРИЙ ҲИСОБЛАШ УСУЛЛАРИ.....	99
10.1 Микроорганизм хужайраларини Горяев камерасида ҳисоблаш.....	99
10.2 Микроскоп остида хужайраларни бевосита санаш (Виноградский – Брид усули)	
.....	100
10.3 Микроорганизмлар миқдорини усул билан бевосита ҳисоблаш.....	101
10.4 Оқувчан цитометрия усули	103
10.5 Микроорганизмлар миқдорини мембранали филтрлаш усулида аниқлаш. ...	104
10.6 Микроорганизмлар миқдорини колонияларини ҳисоблаш усулида аниқлаш	
(чашкали усул)	104
10.7 Тирик микроорганизмларни чегаравий аралашмалар усулида ҳисоблаш.....	105
10.8 Биомассанинг аниқлашнинг нефелометрик усули	106
11. ХОНА ҲАВОСИ МИКРОФЛОРАСИНИ ТЕКШИРИШ	109
11.1 Седиментацион усул.....	109
11.2 Аспирацион усул.....	110
12. СУВНИҲ САНИТАР-БАКТЕРИОЛОГИК ТЕКШИРИШ	114
12.1. Пробаларни танлаш ва уларни анализга тайёрлаш.....	115
12.2 Суздаги умумий микроблар сонини аниқлаш.....	115
12.3 Суздаги колиформ бактериялар миқдорини аниқлаш.....	116
13. ТУПРОҚНИНГ САНИТАР МИКРОБИОЛОГИК ТЕКШИРУВИ	123
13.1 Тупроқдаги микроблар сонини аниқлаш	124
13.2 Тупроқ колититрини аниқлаш	125

13.3 Тупрокнинг перфингенс – титрини аниклаш	125
13.4 Тупрокдаги термофил микроорганизмлар микдорини аниклаш	126
13.5 Тупрокдаги протей таёқчаларини аниклаш	126
14. ОЗИҚ-ОВҚАТ МАҲСУЛОТЛАРИНИНГ АЙНИШИГА САБАБЧИ	129
БЎЛАДИГАН БАКТЕРИЯЛАРНИНГ ХАРАКТЕРИСТИКАСИ.	129
14.1. <i>Micrococcus</i> тури	129
14.2 <i>Enterococcus</i> тури	130
14.3 <i>Sarcina</i> тури	131
14.4. <i>Staphylococcus</i> тури	132
14.6. <i>Proteus</i> тури	133
14.7 <i>Pseudomonas</i> тури	134
14.8. <i>Bacillus</i> тури	135
14.9. <i>Clostridium</i> тури	137
15. ОЗИҚ-ОВҚАТ МАҲСУЛОТЛАРИНИНГ МИКРОБИОЛОГИК ТЕКШИРУВИ ..	141
15.1. Мезофил азроб ва факультатив анаэроб микроорганизмлар микдорини аниклаш (МАФАНММ)	141
15.2. Озиқ-овқат маҳсулотларида ичак таёқчалари гуруҳи бактериялари (ИТГБ)ни аниклаш	144
15.3. Ачитки ва могор микдорини аниклаш	146
ИЛОВАЛАР	148
АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ	155

ОЗИҚ ОВҚАТ МИКРОБИОЛОГИЯСИ

Кириш

Ўқув услубий қўлланмасида микробиологик лабораторияда амалий ва лаборатория машғулотларини бажариш учун таёрлашда керак бўлган маълумотлар мавжуд. Услубий қўлланманинг асосий мақсади талабаларни микробиологик тадқиқотларнинг “Озиқ овқат микробиологияси” фанини ўрганишда керак бўладиган энг асосий усулларни таништиришдан иборат.

Услубий қўлланманинг ҳар бир қисмида ўрганилаётган мавзуларнинг назарий қисми, тадқиқот мақсади, тажриба методикаси, ўз-ўзини текшириш учун *Назорат саволлари* мавжуд.

Услубий қўлланмани ўқиган талабалар қуйидаги назарий билимлар ва амалий кўникмаларга эга бўладилар:

- биологик микроскопнинг тузилиши ва микроскопик препаратларни таёрлаш техникасини ўрганиш;
- махсус микроскопик усуллар билан танишиш (**қоронғу майдонлар микроскопияси, фаза-контраст ва электрон микроскопия);
- микроскопик лаборатория жиҳозлари ва озуқа муҳитларининг стерилизация қилиш, идишлар, асбоб-ускуналар билан таанишиш;
- озиқ-овқат маҳсулотларининг сифатига таъсир қилувчи микроорганизмлари муҳим гуруҳларининг морфологиясини ўрганиш;
- ташқи муҳит объектлари ва озиқ-овқат маҳсулотларидаги микроорганизмларнинг миқдорини ҳисоблаш усулларини ўрганиш;

Микробиологик ишларни бажариш жараёнида стериллик шароитларига риоя қилиш жуда муҳим. Шунинг учун қўлланманинг дастлабки бўлимлари стериллашнинг механик усуллари ва дезинфекциянинг кимёвий воситаларига бағишланган.

Ўқув қўлланмада бактериялар, ачиткилар ва мицелиал замбуруғлар морфологиясига катта ўрин ажратилган. Озиқ-овқат маҳсулотларининг айланишига сабаб бўлувчи бактерияларнинг асосий турларига таъриф берилган. Озиқ-овқат маҳсулотларида ривожланувчи ачитки ва моғор замбуруғларининг асосий турларини тузилиши кўриб чиқилган. Бир неча лаборатория практикулари хоналаридаги ҳаво, ичимлик суви ва озиқ-овқат маҳсулотларининг микробиологик текшириш жараёнига бағишланган. Шунингдек, сув микрофлораси, ичимлик сувига қўйиладиган санитар талаблар каби масалаларга ҳам алоҳида эътибор берилган.

Иловада микробиологик амалиётда қўлланиладиган асосий озуқа муҳитлари рецептураси келтирилган.

Микробиологик лабораторияда ишлаш қоидалари

Микробиологик лабораторияда ишлаш қоидалари қатъий тартиб ва тозаликни талаб этади. Шунинг учун лабораторияда ишлаш мобайнида талабалар қуйидаги қоидаларга риоя этмоқлари лозим:

- 1) лабораторияга устки кийим, бош кийим билан кириш, бегона нарсаларни олиб кириш ман этилади;
- 2) лабораторияга ультрабинафша лампалар билан ишлов бериш даврида кириш ман этилади;
- 3) машғулотлардан аввал пахтали матодан тикилган халат кийиш лозим;
- 4) лабораториядан халатда чиқиб, устидан бошқа кийимлар кийиш мумкин эмас.;
- 5) лабортория столига шахсий буюмлар (сумка, папка, ва бошқа)ни қўйиш мумкин эмас. Улар махсус жойларда туриши керак;
- 6) лабораторияда овқат ейиш, сув ичиш, ортикча гапириш ва юриш тақиқланади;
- 7) лаборатория столида ишга алоқадор бўлмаган нарсалар турмаслиги лозим;

8) спиртовка ёки газ горелкаси билан ишлашда эҳтиёткорлик билан ҳаракат қилиш керак.

9) микроорганизмлар спораларининг тарқалиб кетмаслиги учун Петри чашкалари, пробиркалар, қўпинча аллергия хусусиятга эга бўлган моғор замбуруғлари солинган колбаларни очик қолдирмаслик лозим.

10) ишлатилган пипеткалар, предмет ва қопловчи идишларни дезинфекцияловчи суюқликка солиб қўйиш керак;

11) машғулотларнинг охирида иш жойини тартибга келтириш керак: микроскопни жойига қўйиш, идишларни ювиб қўйиш, иш столини артиб, унинг тагига табуреткани қўйиш лозим;

12) Гуруҳ навбатчиси талабаларнинг иш жойларини текшириб чиқиши лозим.

1. МИКРОСКОПИЯ

Кўз билан кўриб бўлмайдиган микроорганизмларнинг хужайралари фақатгина микроскоплар ёрдамида ўрганилади (грекча *micro* – кичик, *skopeo* – кўраман). Ушбу қурилмалар текшириладиган объектларнинг юзлаб (ёруғлик микроскоплари) ва ўнлаб (электрон микроскоплар) марта катталаштирилган тасвирини кўриш имконини беради.

1.1. Ёруғлик микроскопларининг тузилиши.

Ишдан мақсад: талабаларни ёруғлик микроскопининг тузилиши, унинг характеристикалари ва у билан ишлаш қоидалари билан таништириш.

Микроскоп ёруғлик микроскопи деб аталишига сабаб, у объектни ундан ўтаётган ёруғлик нурида ўрганишни таъминлайди. Замонавий ёруғлик микроскопларининг асосий қисмлари механик ва оптик қисмларидир (1.1-расм).

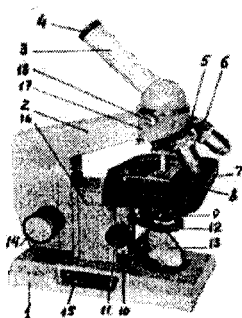
Механик қисмига штатив, тубус, револьвер, микромеханизм қутиси, предмет столи, макрометрик ва микрометрик винтлар киради.

Штатив икки қисмдан иборат – асос ва тубус улагич (колонка). Микроскоп **асоси** тўғри тўртбурчак шаклда бўлиб, бараварига тўртта таянч майдончаларга эга. Бу микроскопнинг иш столида мустаҳкам туришини таъминлайди.

Тубус ушлагич асос билан бирлаштирилади ва макро-, микровинтлар ёрдамида вертикал текисликда ҳаракатланиши мумкин. Винтлар соат стрелкаси бўйича айлантирилганида ушлагич пастга тушади. Соат стрелкасига қарши айлантирилганда препаратдан юқорига кўтарилади. Тубус ушлагичнинг юқори қисмида монокуляр (ёки бинокуляр) **насадка** учун мўлжалланган уяли бошча (головка) жойлашган. Бошча винт билан бириктирилади.

Тубус – микроскопнинг трубасти бўлиб, у асосий оптик қисмлар – окуляр ва объектив орасида маълум масофани сақлаб туришга имкон беради.

Тубуснинг юкори қисмига окуляр ўрнатилади. Микроскопларнинг замонавий моделларида эгилган тубус мавжуд.



1.1.- расм. Микроскопнинг тузилиши.

1-асос; 2-тубус ушлагич; 3-тубус; 4-окуляр; 5-револьвер; 6-объектив; 7-бюм столчаси; 8-препаратни сиқиб турувчи клеммалар; 9-конденсор; 10-конденсор кронштейни; 11-конденсорни сурувчи бурагич; 12-очиловчи линза; 13-кўзгу; 14-макрвинт; 15-микровинт; 16-микрометрик фокуслаш механизмига эга кути; 17-тубусни ва револьверни бириктириш бошчаси (головкаси); 18-бошчани бириктириш винти.

Револьвер насадка бир неча уяли ботиқ дискдан иборат. Унинг уяларига 3-4 та объективлар киритилиши мумкин. Револьвер насадкани айлантириб, тубус ёригига ихтиёрий объективни ишчи ҳолатда ўрнатса бўлади.

Микромеханизм коробкаси бир тарафдан конденсор кронштейнини, бошқа тарафдан тубус ушлагични йўналтириш вазифасини бажаради. Коробканинг ичида тишли ғилдираклар системасидан иборат бўлган микроскопнинг фокуслаш механизми бор.

Бюм столчаси ўзида препарат ёки тадқиқотнинг бошқа объектини жойлаштиришга мўлжалланган. Столча квадрат ёки айлана шаклида кўзгалувчан ёки кўзгалмас бўлиши мумкин. Кўзгалувчан оёкча горизонтал текисликда иккита ёнидаги винтлари ёрдамида кўзғатилиши мумкин. Бу

препаратни турли нукталардан кузатиш имконини беради. Объектни турли нукталардан текшириш этиш учун қўзғалмас столчада препарат қўл билан силжитилади. Тагида предмет столчасининг марказида манбадан тушаётган ёруғлик нурлари билан ёритиш учун махсус тешик мавжуд. Столчада иккита пружинали клеммалар бўлиб, улар препаратни маҳкамлайди. Микроскопнинг баъзи ситемалари препарат юзасининг ташки қисмини ўрганиш ва хужайраларни санашда керак бўладиган препаратни бошқарувчи қурилмага эга. Препартни бошқарувчи қурилма препаратнинг иккита ўзаро перпендикуляр йўналишида ҳаракатланишини таъминлайди. Препаратни бошқарувчи қурилмада линейканинг нониуслар ситемаси мавжуд бўлиб, улар ёрдамида текширилувчи объектлар ихтиёрий нуктасига координаталар бериш мумкин.

Макрометрик винт (макровинт) қўрилаётган объект тасвирини тахминий ўрнатиш учун керак. Макровинт соат стрелкаси бўйлаб айланганида микроскоп тубуси пастга тушади, тескари айланганида – қўтарилади.

Микрометрик винт (микровинт) объект тасвирини аниқ ўрнатиш учун ишлатилади. Микрометрик винт микроскопнинг энг нозик қисмларидан бири бўлиб, у билан ишлаганда эҳтиёткорлик зарур: тубус ўз-ўзидан тушиб кетмаслиги учун винтни тасвирни қўриш мақсадида айлантириб юбориш керак эмас. Микровинтнинг тўлиқ айланишида тубус 0,1 мм.га сурилади.

Микроскопнинг оптик қисми асосий оптик қисмлар (объектив ва окуляр) дан ва ёрдамчи ёритувчи тизим (кўзгу ва конденсор)дан иборат.

Объективлар (лотинча *objektum* – предмет) – микроскопнинг энг муҳим, қиммат ва нозик қисми. Улар металл гардишга бириктирилган линзалар ситемасидан иборат бўлиб, катталаштириш даражаси ва сонлар апертураси кўрсатилган. Препаратга текис тарафи билан жойлашган ташки линза фронтал деб аталади. Айнан шу линза катталашган тасвир ҳосил бўлишини таъминлайди. Бошқа линзалар коррекцион линзалар деб аталади ва текширилувчи объектни қўришида пайдо бўладиган оптик тасвирларнинг камчиликларини камайтириш учун хизмат қилади.

Объективлар курук ва иммерсион бўлади. *Курук* объектив деб объектив ва фронтал линза орасида ҳаво бўладиган объективга айтилади. Курук объективлар кўпинча катта фокус масофага ва 8 ёки 40 маротаба катталаштириш хусусиятига эга. *Иммерсион* объективда фронтал линза ва препарат орасида махсус суюқ мухит бўлади. Шиша (1,52) ва ҳаво (1,0) нинг синдириш кўрсаткичлари турлича бўлганлиги сабабли ёруғлик нурларининг бир қисми синади ва кузатувчининг кўзига тушади. Бунинг натижасида тасвир ноаниқ бўлиб, майдароқ структуралар кўринмайди. Ёруғлик оқими сочилишининг олдини олиш мақсадида препарат ва объектив фронтал линзаси ораси синдириш кўрсаткичи шишанинг синдириш коэффициентига яқин синдириш кўрсаткичга эга бўлган модда билан тўлдирилади. Бундай моддаларга глицерин (1,47) кедр мойи (1,51), кастор (1,49), анис (1,55) мойлари ва бошқалар киради. Иммерсион объективлар гардишида қуйидаги белгилашлар мавжуд: **I** – *immersion* (иммерсия), **HI** – *homogen immersion* (бир жинсли иммерсия) **IO** – *oil immersion* **MI** – мойли иммерсия. Ҳозирги вақтда иммерсион суюқлик сифатида кўпинча сунъий махсулотлар ишлатилиб, улар оптик хоссалари бўйича кедр мойига мос келади.

Объективлар катталаштириш даражасига қараб ажратилади. Объективларнинг катталаштириш кўрсаткичи уларнинг гардишда кўрсатилган (8х, 40х, 60х, 90х). Бундан ташқари, ҳар бир объектив ишчи масофасининг маълум бир катталиги билан характерланади. Иммерсион объектив учун бу масофа мос равишда 0,12 мм ни ташкил этса, 8 ва 40 марта катталаштирувчи курук объективлар учун 13,8 ва 0,6 мм ни ташкил этади.

Окуляр (лотинча *okularis* – кўз) иккита линза- кўз (юкори) ва майдон (қуйи) линзалардан иборат бўлиб, улар металл гардишга киритилган. Окуляр объектив бераётган тасвирни катталаштирилган хизмат килади. Окулярнинг катталаштириш даражаси унинг гардишида кўрсатилган. 4 мартадан 15 мартагача катталаштирувчи окулярлар мавжуд.

Микроскоп билан узок давр ишлаганда бинокуляр насадкадан фойдаланиш лозим. Насадка кутилари кузатувчи кўзлари оралиғи масофасига боғлиқ ҳолда 55-75 мм оралиғида сурилиши мумкин. Бинокуляр насадкалар ўзининг хусусий катталаштириш қобилияти (1,5 баробар) ва коррекцион линзаларга эгадирлар.

Конденсор (лотинча *condenso* – зичлаштиряпман, қуюклаштиряпман) 2-3 та қисқа фокусли линзалардан иборат. У кўзгудан келаётган нурларни йиғиб, объектга йўналтиради. Предмет столчаси остида жойлашган даста ёрдамида конденсор вертикал текисликда ҳаракатланиши мумкин. Бу эса ўз навбатида конденсор кўтарилганда микроскопнинг ёритилганлигини оширади ва туширилганда камайтиради. Конденсордаги ёруғлик интенсивлигини созлаш учун гулсафсар (япроқли) диафрагма қўлланилади. У пўлат ўроқсимон пластинкалардан иборат. Тўлиқ очилган диафрагмада бўялган препаратларни, диафрагма тиркиши кичиклигида эса бўялмаган препаратларни кўриш тавсия этилади. Конденсор остида камроқ катталаштирувчи (8 ёки 9 марта) объективлар билан ишлашда қўлланиладиган тўғинча жойлаштирилган **очилувчи линза** мавжуд.

Кўзгу иккита нур қайтарувчи текисликка (текис ва ботик) эга. У штатив асосида шарнирларга маҳкамланиб осон буралади. Сунъий ёруғликда кўзгунинг ботик тарафидан, табиий ёруғликда текис тарафидан фойдаланиш тавсия этилади.

Ёриткич ёруғликнинг сунъий манбаси вазифасини бажаради. У штативга маҳкамланган паст вольтли қиздирувчи лампа ва камайтирувчи трансформатордан иборат. Трансформаторда лампанинг қиздиришини бошқарувчи реостат дастаси ва ёриткични ёқиш учун хизмат қилувчи тумблер мавжуд.

Кўп замонавий микроскопларда ёриткич асосга бириктирилган.

1.2. Ёруғлик микроскопининг асосий характеристикалари

Объективнинг *сон апертураси* A (лотинчада aperture – тиркиш) унинг ёруғликнинг йиғиш хусусиятини характерлайди ва қуйидагича формула билан аниқланади:

$$A = n \sin 1/2\alpha,$$

Бу ерда n – предмет шишасидан объективнинг фронтал линзаси ва предмет шишаси

Орасидан ўтаётган ёруғлик нурининг синдириш кўрсаткичи; а-бир томони оптик ўқ билан, бошқа томони объективдан чиқаётган эффектив нурларнинг объективнинг ишлаётган тиркиш чегарасини бириктирувчи чизик билан ҳосил қилинган; $1/2\alpha$ -объективнинг кириш тиркиши бурчагининг ярми;

Ёруғлик нурининг синдириш кўрсаткичи n максимал бўлиши муҳимдир. Юқорида айтиб ўтилганидек, уни катталаштириш учун объективнинг фронтал линзаси ва предмет шишаси орасига шишанинг синдириш кўрсаткичига яқин синдириш кўрсаткичли модда киритилади. $\sin 1/2\alpha$ нинг қийматини ошириш учун конденсорни максимал даражада кўтариш керак. Конденсор пастга туширилса, унинг бу хусусияти бузилади.

Объективнинг *сон апертураси* ва катталаштириш хусусияти унинг гардишида кўрсатилган: $8\times 0,2$; $40\times 0,65$; $90\times 1,25$.

Микроскопнинг *катталаштириш қобилияти* (D) окулярнинг катталаштириши (K) ва объективнинг катталаштириши (V) нинг кўпайтмасига тенг:

$$D = KV.$$

Назарий жиҳатдан микроскоп 2000 ва ундан ортиқ маротаба катталаштириши мумкин. Лекин микроскопнинг фойдали ва фойдасиз катталаштиришини фарқлаш лозим. Объектни чегаравий кўриш бурчаги остидан кўришга имкон берувчи катталаштириш фойдали катталаштиришдир. Оддий ёруғлик микроскопларининг фойдали катталаштириш чегараси 1400 гача. Фойдали катталаштиришнинг чегараларини оширишда ёруғликнинг

тўлқин табиатига боғлиқ бўлган дифракция ва бошқа ҳодисалар вужудга келади. Хусусан, 40х катталаштириш даражаси ва 0,65 сон апертурасига эга объективнинг фойдали катталаштириши 325-650 нм ташкил этади. Бундай катталаштириш бу объектив кўра олиши мумкин бўлган барча структураларни ажратиш имконини беради.

Шунинг учун фойдали катталаштириш чегарасида кўриш учун 40х объектив билан ишлашда 15х окулярни танлаш керак. Кучлироқ окулярларнинг қўлланиши кичикроқ деталларни кўриш имконини бермайди.

Агар объектив 90х катталаштириш хусусиятига эга бўлса (сон апертураси $A=1,25$), у ҳолда у учун фойдали катталаштириш 1250 нм тенг. Демак, ушбу ҳолда ҳам фойдали катталаштириш чегараларидан чиқиб кетмаслик учун 15х дан ортиқ катталаштирувчи окулярларни олмаслик керак.

Микроскопнинг *ажратиш қобилияти*. Агар микроскопнинг катталаштириш қобилияти объектив ва окулярга боғлиқ бўлса, ажратиш қобилияти асосан объектив ва конденсор билан аниқланади. Ажратиш қобилияти деб қуйидаги формула орқали ҳисобласа бўлади:

$$d=\lambda/2A,$$

бу ерда λ – инсон кўзи билан қабул қилувчи ёруғлик тўлқин узунлиги (0,4-0,7 мкм ўртача – 0,55 мкм); A -объективнинг сон апертураси.

Ёруғлик микроскопининг максимал ажратиш қобилияти 0,2 мкм нм ташкил этади, d нинг абсолют қиймати қанчалик кичик бўлса, микроскопнинг ажратиш қобилияти шунчалик яхши бўлади.

1.3. Микроскоп билан ишлаш шартлари

1. Микроскопнинг штатив колонкасида бир қўл билан ушланади. Бошқа қўл билан унинг асосидан ушланади. Микроскопнинг бошқа деталларидан ушлаб кўтариш мумкин эмас.

2. Иш столида микроскопнинг колонкаси кузатувчига қараб туриши керак. Иш бошлашдан аввал бармоқлар билан линзаларга тегмасдан юмшоқ қуруқ латтада микроскоп оптик қисмларининг чанги артилади.

3. Револьвер насадка ёрдамида керакли объектив ўрнатилади. Фиксаторнинг револьвер ичидаги ўзига хос товуши объективнинг марказлашган ҳолда ўрнатилганлигидан дарак беради. Объективнинг катталаштириши қанчалик кам бўлса, фокус масофа шунчалик катта бўлишини эсда тутиш лозим. 8х объектив билан ишлашда препарат ва объектив орасидаги масофа 9мм. ни, 40х объектив билан ишлашда - 0,6 мм. ни, 90х объектив билан ишлашда – 0,15 мм. ни ташкил этади.

4. Предмет столчасига предмет шишаси қўйилиб, у клеммалар билан маҳкамланади.

5. Микроскоп тубуси макровинт ёрдамида эҳтиёткорлик билан туширилади. Объективга ёнидан қараб, уни препаратга ишчи масофадан камроқ бўлган масофага яқинлаштирилади (препаратга тегиб кетиш мумкин эмас). Кейин окулярга қараб туриб, макровинт секин айлантирилди ва кўриш майдонида ўрганилаётган предмет тасвири пайдо бўлгунига қадар тубус кўтарилади.

6. Микрометрик винтни айлантириб, предметнинг тасвири аниқ бўлиши учун объектив фокусланади.

7. Иммерсион объектив билан ишлашда предмет столчасига бир томчи кедр мойи суртилади ва объективга ёнидан қараб туриб, тубусни макрометрик винт билан шундай тушириладики, бунда объективнинг фронтал линзаси мойга ботиб турсин. Кейин окулярга қараб туриб, макровинт секин айлантирилади ва тубус тасвир пайдо бўлгунга қадар кўтарилади. Аниқ фокуслаш учун микрометрик винтни битта айланиш чегарасида буралади.

Д и қ қ а т! Микрометрик винт ёрдамида препарат тасвирини излаш таққиланади!

8. Препарат бир неча кўриш майдонларида текширилади. Бунда предмет столчаси ён винтлар ёрдамида суриб турилади ёки препарат предмет столчасида қўл билан силжитиб турилади.

Препаратнинг микроорганизмлар яхшироқ кўринувчи қисми топилиб, микроскопик тасвир чизиб олинади.

9. Объективларни алмаштиришда кўрилайётган объектнинг ёритилиш интенсивлигини назорат қилиш лозим. Ёритишнинг керакли даражасига конденсорнин тушириб, ёки кўтариб эришилади.

10. Иш тугаганидан кейин тубус кўтарилади, препарат предмет столчасидан олинади, иммерсион объективнинг фронтал линзасидаги мой бензин билан ҳўлланган филтър коғозда артилади. Револьвер насадка ёрдамида 8х катталаштириш қобилиятига эга объектив ўрнатилади, предмет столчасига тоза дока қўйилиб, тубус туширилади.

1.4. Қоронғу майдондаги микроскопия.

Қоронғу майдондаги микроскопия объективнинг ажратиш қобилиятини тахминан 10 марта ошириб, оддий микроскоп кўра олмайдиган объектларни ҳам кўришга имкон беради. Қоронғу майдон микроскопияси объектни объективга тушмай қолиб кўзга кўринмайдиган ёруғликнинг кия тушувчи нурлари билан ёритишга асосланган (Тиндаль ходисаси). Шунинг учун кўриш майдони коп-қоронғу бўлиб кўринади. Агар препаратда қандайдир заррачалар, масалан микроблар бўлса, маълум бурчак остида йўналтирилган нурлар дифракцияси натижасида уларнинг юзасидан қайтади ва ўзининг бошланғич йўналишини ўзгартириб, объективга тушади. Ёруғлик нурлари объективдан келганлиги сабабли, кузатувчи қора фонда микроб хужайралари ёки бошқа заррачалар контурининг таратувчи тасвирини кўради. Қоронғу майдонга ёруғлик микроскопининг оддий конденсорини ўрнини босадиган махсус конденсорни қўллаш билан эришилади. Лекин қоронғу майдон эффекти

конденсор апертураси объект апертурасидан 0,2 – 0,4 бирликка бўлгандагина кузатилади.

Қоронғу майдон микроскопияси микроорганизмларнинг тирик хужайраларини текширишда қўлланилади. У микроблар ҳаракатчанлиги, баъзи бир касалликлар (лептоспироз)нинг қўзғатувчиларини аниклаш учун керак. Лекин қўришнинг қоронғу майдонида микроб хужайрасининг шакли ва ички тузилишини яхши ўрганиб бўлмайди.

Ачитки хужайраларни қўришда цитоплазма ўзидан кам ва бир текисда ёруғлик чиқаради. Унинг фонида қора вакуолилар, липосомаларнинг ялтирок гранулалари аниқ ажралиб туради. Ўлаётган хужайраларнинг протопласти сутсимон оқ рангга эга.

1.5. Фаза – контраст микроскопияси

Фаза – контраст микроскопия тирик объектларни бўямасдан ва фиксация қилмасдан қўриш имконини беради. Инсон кўзи ёруғлик нури тўлқин узунлиги (ранги)нинг ва амплитудаси (интенсивлик, контрастлик) нинг ўзгаришини сезади. Лекин фаза фарқларини била олмайди. Фаза – контраст микроскопияси бир хил тўлқин узунлик ва амплитудага эга нурларни ўтказадиган, лекин фазаларини силжитадиган шаффоф объектларни кузатиш учун ишлаб чиқилган. Силжиш катталиги қалинликка ва структураларнинг синдириш кўрсаткичига боғлиқ. Фаза-контраст қурилмаси ёрдамида шаффоф объектлар орқали ўтаётган ёруғлик тўлқинларининг фаза ўзгаришлари амплитуда ўзгаришларига айланади. Бунда, қўрилаётган объектларнинг турли қисмлари кўзга аниқ кўринади.

Тадқиқотларни олиб бориш учун ёруғлик микроскопига фаза-контраст қурилмаси қўшилади. Бунда асосан ёрдамчи микроскоп, махсус фазали микроскоплар ва халқали диафрагмалар тўпламига эга конденсордан иборат КФ-4 модели қўп ишлатилади.

Ёрдамчи микроскоп оддий микроскоп окулярини алмаштирган ҳолда ўрнатилади. Фазавий контраст олиш учун объективга махсус фазали пластинка киритилиб, у бир тарафига нодир металллар тузлари сепилган юпка дискдан иборат. Ушбу пластинка ўтаётган ёруғлик тўлкини фазасини $1/4\lambda$ га ўзгартиради. Бу эса ўз навбатида фаза фарқларининг амплитудавий фарқларга айланишига сабабчи бўлади. Фазавий объективлар гардишида индекслар белгиланган: $\Phi 10$, $\Phi 20$, $\Phi 40$ ва $\Phi 90$. Халқали диафрагмалар конденсор остидаги револьвер дискида ўрнатилган ва уларни дискни буриш билан тез ўзгартиш мумкин. Халқали диафрагма препарат текислигига конденсор орқали фақат ёруғлик халқасини ўтказиши мумкин. Фаза-контраст эффекти фаза пластинкаси ва халқа диафрагмаси проекциялари бир-бирига аниқ келтирилгандагина кузатилади.

1.6. Люминесцент микроскопия

Люминесцент микроскопиянинг қўлланилиши баъзи биологик объектларнинг инсон кўзи кўрмайдиган қисқа тўлқинли нурлар (кўк-бинафша-460 нм, ёки ультрабинафша 300-400 нм. тўлқин узунликка эга) билан нурлантирилганида ёруғлик ажратиш қобилятига асосланган. Бу ҳодиса шундай тушунтирилади: тушаётган ёруғлик энергиясининг бир қисми ютилади ва ёритилаётган объект ўзидан нурлантираётган ёруғлик нурлари тўлқин узунлигидан каттарок тўлқин узунлигидаги нурлар чиқаради. Бунда хужайралар сариқ-яшил ва зарғалдоқ рангдаги нур чиқаради (флуоресценция). Бу хусусий ёки бирламчи люминесценция ҳисобланади.

Бирламчи нур чиқариш қобилятига ўсимлик ва сув ўтлари хлорофилл туфайли эгадирлар. Шунингдек, бундай қобилят пигмент ишлаб чиқарувчи баъзи бактерияларда кузатилади. Микроорганизмларнинг кўп хужайралари сул бирламчи люминисенция хусусиятига эгадирлар.

Хусусий люминисценцияга эга бўлмаган объектларнинг иккиламчи (ёки орттирилган) люминесценциясига уларни махсус бўёқлар – флуорохромлар

билан бўйш билан эришиш мумкин. Энг қўп ишлатиладиган флуорохромлар акридин ва тиазолл гуруҳларига киради (зарғалдоқ ва сарик акридин, аурамин, уранин, родамин, тиофловин, примулин, флуоресцин ва бошқалар). Хусусан зарғалдоқ акридин цитоплазмани яшил-сарикқа, метахроматинни ёрқин қизилга, вакуолини пуштига, ядрони оч яшил рангга бўййди.

Люминесцент микроскопия қоронғу хонада махсус люминесцент микроскоп, масалан, МЛ-2 ёрдамида амалга оширилади.

Люминесцент микроскопларда ультрабинафша нурланиш манбаи сифатида махсус кварц лампалари қўлланилади. Объектга тушгунига қадар лампа нурлари ультрабинафша спектрининг $\lambda=360-380$ нм. тўлқин узунлигидан бошланадиган маълум бир қисм нурларни ўтказувчи қатор ёруғлик филтрларидан ўтади.

Люминисценциянинг ҳосил қилишни осонроқ усули кўринувчи ёруғлик нурининг киска тўлқин қисми - $\lambda=460$ нм дан бошланувчи кўк-бинафша нурларни ишлатишдир. Бу ҳолда кузатувларни нафакат махсус люминесцент микроскопда, балки оддий микроскопда нурлар йўлига кўк рангдаги шиша ёки суюк ёруғлик филтри ўрнатиб ўтказиш ҳам мумкин. Ортиқча кўк нурларни микроскоп окулярига ўрнатилган сарик ёруғлик филтри ёрдамида олиб ташласа бўлади. Натижада препаратда қора фонда люминисценцияланувчи объектлар кўринади.

Люминесцент микроскопия объектларнинг оддий микроскопда кўриб бўлмайдиган морфологик хусусиятларни кўриш имконини беради. Бундан ташқари, у микробларни нурланиш характериға қараб аниқлашга, ҳужайранинг турли физиологик ҳолатларида структурасининг ўзгаришини билишга ёрдам беради. Бу усул ёрдамида бактерияларнинг антиген структурасини ўрганиш ва юкумли касалликларнинг қўзғатувчиларини люминесцент бўёқлар билан белгиланган иммун зардобларни қўллаш йўли билан аниқлаш мумкин.

1.7. Электрон микроскопия

Электрон микроскопда ёруғлик нурлари ўрнига ҳаракатланаётган электронларнинг оқими қўлланилади. Бу қурилманинг ажратиш қобилиятини 100 мартадан кўп микдорга ортиради. Замонавий электрон микроскопларнинг юқори ажрата олиш қобилияти ёруғлик микроскопида кўринмайдиган объектларни кўриш ва ўрганишга имкон беради: вируслар, бактериофаглар, микроплазмалар, прокариот ва эукариот ҳужайраларнинг нозик тузилиши уларнинг макро ва микроструктурали элементлари.

Электрон микроскоп бир неча мураккаб қурилмалардан иборат:

1. Электрон пушка, электронлар дастасини фокусловчи қурилмалар, конденсорли линза, объект камераси (предмет столчаси, объектив, оралик ва проекцион линзалар); флуоресцент экран, фотокамера ўрнатилган колонна.

2. Колоннада юқори вакуум яратувчи вакуум қурилма.

3. Бошқарув пулти

4. Колонна ортидаги металл шкафда жойлашган электр манба учун қурилма

5. Ёрдамчи қурилмалар

Электрон микроскопнинг ёритувчи системаси электрон пушка ва конденсорли линзадан иборат. Электронлар дастасини фокусловчи линзалар сифатида электромагнит майдон ишлатилади (шишадан электронлар ўта олмаганлиги сабабли шиша линзаларни қўллаб бўлмайди). Ҳаво электронларнинг ҳаракатига тўсқинлик қилади. Шунинг учун микроскоп ичида вакуум ҳолатини ушлаб туриш керак.

Препаратларни электрон микроскопга тайёрлаш техникаси ёруғлик микроскопиясидагидан бошқача бўлади. Электрон микроскопда кўриладиган препаратлар электронлар ўтиши мумкин бўлган жуда юпка тагликда тайёрланади. Таглик сифатида қалинлиги тахминан 1 мкм бўлган коллодий, кварц ёки бошқа материаллардан тайёрланган плёнкалар ишлатилади.

Плёнкалар жуда юпка ва нозик бўлгани сабабли уларни махсус майда ячейкали тўрларга ўрнатилади. Препарат ва тагликнинг умумий қалинлиги 0,25 мкм дан ошмаслиги керак. Текширилаётган объектларнинг контрастлигини ошириш мақсадида уларга чуқур вакуум ҳолатида хром, олтин, платина, палладий каби моддаларнинг жуда юпка катлами сепилади ёки турли контраст моддалар ишлатилади (уанилацетат, уанилнитрат, фосфор-вольфрам кислотаси). Кўрилаётган объект конденсор ва объектив линзаси орасида жойлашган предмет столчасига қўйилади. Текширилаётган объектдан ўтган электронлар дастаси сочилади ва объектив линзасининг синдирувчи электромагнит майдонида фокусланади. Бунда объектнинг кўриш шишасидан кўрунувчи 40-50 минг марта катталаштирилган ҳақиқий тасвири ҳосил бўлади. Кейин электронлар оқими проекцион линзанинг электромагнит майдонида тушади. Ушбу линза ўтаётган электронлар оқимини йигади ва уларни флюоресцент экранда фокуслайди. Бунда объектнинг 200-300 минг маротаба катталаштирилган таасвири ҳосил бўлади.

Флюоресцент экран тагида фотокамера жойлашган. Махсус дастак ёрдамида экранни кўтариб туриб электронлар дастаси фотопластинкага туширилади ва объект тасвири олинади.

Назорат саволлари

1. Микробиологик лабораторияда ишлашнинг асосий қондалари нималардан иборат?
2. Микроскоп механик қисмининг асосий элементларини айтинг.
3. Микроскоп оптик қисмининг асосий элементларини айтинг.
4. Микроскопнинг сон апертураси деб нимага айтилади?
5. Куруқ объективлар иммерсион объективлардан нимаси билан фарқланади?
6. Макро ва микровинтларнинг вазифаси нимадан иборат?
7. Револьвер насадка нима учун керак?

8. Микроскопнинг катталаштириш қобилияти қандай аниқланади?
9. Препаратнинг ёритилганлик даражасини қандай аниқлаш мумкин?
10. Ёруғлик микроскопининг асосий характеристикаларини айтинг.
11. Қоронғу майдондаги микроскопиянинг моҳияти нимадан иборат?
12. Фаза-контраст микроскопининг ишлаш принципини тушунтиринг
13. Люминесцент микроскопнинг ишлаш принципини тушунтиринг
14. Электрон микроскоп билан ишлаш қоидалари нималардан иборат?

2. МИКРОБИОЛОГИК ЛАБОРАТОРИЯНИ ТАШКИЛЛАШТИРИШ ВА ЖИҲОЗЛАШ

Ишдан мақсад: талабаларни микроскопик лаборатория жиҳозлари, озуқа муҳитларини стериллаш усуллари ва воситалари, идишлар билан таништириш.

Микробиологик лабораторияда қуйидаги хоналар мавжуд бўлиши керак:

- Тадқиқотлар ўтказиладиган лаборатория хоналари;
- Юқори стерилликни талаб қилувчи ишлар бажариладиган ойна билан тўсилган бокс;
- Идишларни ювиш учун жиҳозланган ювиш хонаси;
- Озуқа муҳитлари, идишларни стериллашга тайёрлаш, реактивларни тайёрлаш учун мўлжалланган препаратлар хонаси;
- Автоклавлар ўрнатилган стериллаш бўлими;

Лабораториянинг барча хоналари табиий ва сунъий ёруғлик билан яхши таъминланган бўлиши керак. Столлар ва полнинг юзаси яхши тозаланадиган материаллар билан қопланган бўлиши лозим (пластик, линолеум); боксда, автоклав ва ювиш хоналарида деворлар ва поллар махсус плиталар билан қопланади. Лаборатория хоналарида ҳавони стериллаш мақсадида бактерицид лампалар ўрнатади (БУВ-15, БУВ-30 ва бошқалар).

Жиҳозлар: автоклавлар, термостатлар, курук иситувчи шкафлар, микроскоплар, музлатгичлар, техник тарозилар, хоналарни микробиологик анализ қилувчи аппарат, микроорганизм колонияларини сановчи қурилма, анаэроб бактерияларни кўпайтирувчи анаэроустат, рН-метр.

Идишлар ва мосламалар: бактерологик сиртмоқлар ва ниналар, Дригальский шпателлари, кайчилар, пинцетлар, штативлар, лаборатория идишлари (Петри чашкалари, пробиркалар, пипеткалар – асосан 1,0 ва 0,1 см³ учун, предмет ва қопловчи шишалар, бўёқ ва эритмалар учун флаконлар) пахта, дока, филтр қоғоз.

2.1. Микробиологик амалиётда ўўлланилувчи стерилизация усуллари ва воситалари

Стериллаш (лотинча *sterilis* – бепушт) микробиологик амалиёт ва озик-овқат ишлаб чиқаришда материаллардаги барча вегетатив ҳужайралар ва уларнинг спораларини йўқотишни англатади. Стериллаш микробиологик амалиётда энг муҳим ва керакли тадбирлардан бири ҳисобланади.

Стериллашнинг қуйидаги усуллари мавжуд:

Термик стериллаш

- Оловда қиздириш (фламбирлаш);
- Қайнатиш;
- Куруқ иссиқлик;
- Босим остидаги тўйинган буг;

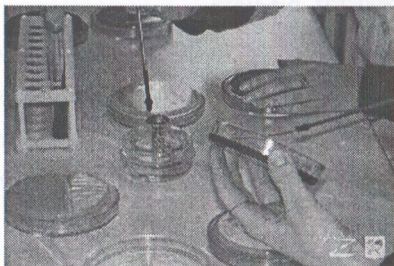
Совуқ стериллаш

- Филтрлаш;
- Нурлантириш;

Дезинфекция

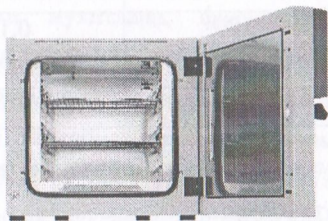
Термик стериллаш

Фламбирлаш – майда предметларни спиртовка ёки горелка оловида қиздириш йўли билан стерилизация қилиш (предмет шишалари, бактерологик сиртмоқлар, ниналар, пинцетлар, ланцетлар ва ҳ.к.з.). Шунингдек, оловда турли озука муҳитларини қуйишда ишлатиладиган колба ва пробиркаларнинг оғзи ҳам қуйдирилади.



Қайнатиш металл асбоблар, ниналар, резина трубкаларни стериллашда ишлатилади. Асбоблар махсус қопқоқли металл стерилизаторларда 30-40 дақиқа давомида қайнатилади. Лекин узоқ қайнатиш жараёни ҳам объектнинг стериллигини тўлиқ таъминлаб бера олмайди. Чунки қатор анаэроб клостридияларнинг споралари 3 соат қайнатилса ҳам нобуд бўлмайди.

Қуруқ иссиқлик билан стериллаш. Шиша идишларни (пипеткалар, пробиркалар, колбалар, Петри чашкалар ва ҳ.к.з.) қуруқ иссиқлик шкафларида 160⁰ дан 180⁰С ҳароратда 1 – 1,5 соат мобайнида ушланади. Бундай шароитда вегетатив хужайралар ва микроорганизмлар споралари ҳалок бўлади.



Пастер печи

Стерилизациядан аввал идишлар ювилиб, қуритилади. Пробиркалар ва колбалар пахта-докали тикинлар билан беркитилади. Пробиркалар қоғозга 10-20 дона қилиб ўралади. Колбаларга уларни чангдан асровчи қоғоз қопқоқлар ёпилади. Пипеткаларнинг оғизга киритиладиган томонларига пахтали тампонлар тикилади. Пипеткалар махсус шиша ёки металл пеналларга жойлаштирилади ёки қоғозга ўралади. Иш мобайнида пипеткалар пеналдан фақат тампон киритилган юқори қисмидан ушлаб олинади. Петри чашкалари қоғозга ўралади (ҳар бири алоҳида ёки 2-3 тадан). Стериллашга таёрланган идишлар қуритувчи шкафга жуда зич жойлаштирилмайди. Чунки уларнинг бир хил қизиши таъминланиши керак. Стерилизация тугаши билан шкаф ўчириб қўйилади. Лекин у ҳарорати 100-70⁰С гача тушгунига қадар очилмайди. Шкаф

тез очиб юборилса, идишлар дарз кетиши мумкин. Стерилликни саклаш учун идишлар бевосита ишдан олдин очилади.

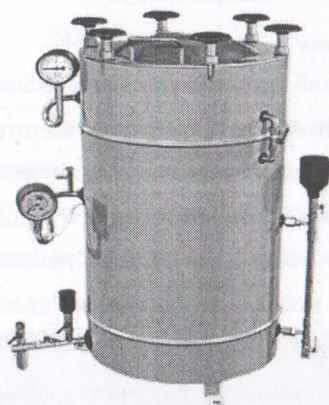
Босим остидаги тўйинган буғ билан стериллаш. Ушбу усул энг кенг тарқалган ва самарадор усул бўлиб, у сувнинг қайнатиш натижасида ҳосил бўлган буғнинг ёпиқ жойда йиғилиб, босимини орттиришга асосланган. Босим ортганда буғнинг ҳарорати ортади (2.1-жадвал).

2.1-жадвал.

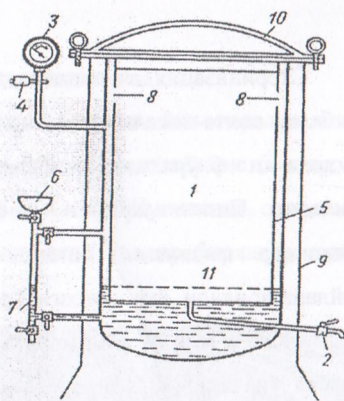
Манометр кўрсаткичлари ва тўйинган буғ ҳароратининг мослиги

Манометр кўрсаткичи, МПа	Тўйинган буғнинг температураси, °С	Манометр кўрсаткичи, МПа	Тўйинган буғнинг температураси, °С
0,00	100	0,15	128
0,05	112	0,20	134
0,10	121	0,30	144

Стериллаш махсус герметик ёпилган иккита деворли аппаратлар – автоклавларда ўтказилади. Автоклавнинг ишлаш принципи босим



а)



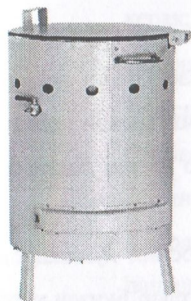
б)

а) - умумий кўриниши. б) - схематик кўриниши: 1- стерилизация камераси; 2- ҳаво чиқарувчи кран; 3- манометр; 4- сакловчи клапан; 5- сув-буғли камера; 6- автоклавга сув қуйиш учун воронка; 7- сув ўлчаш найчаси; 8- стерилизация камерасига буғ ўтувчи тешиклар; 9- ҳимоя кавати; 10- автоклав копкоғи; 11- стерилизация қилинувчи асбобларни қўйиш ғовакли баркаш.

орттирилганида сувнинг қайнаш ҳароратининг ошишига асосланган. Буг ҳосил бўлиши учун автоклавдаги сув электр энергия ёрдамида иситилади. Автоклавнинг асосий қисмлари қуйидагилар: кожух, сув-буғли камера, стериллаш камераси, резина қопламали қопқок. Қўшимча равишда автоклавга қуйидаги элементлар қўшилади: сифон трубкали ва уч томонли кранга эга манометр, сув-буғ камерасидаги сув миқдорини назорат қилувчи сув ўлчовчи шиша най, автоклавда босим ҳаддан ташқари ошиб кетишини олдини олувчи ҳимоя клапани, стериллашнинг бошида ҳавони чиқариб юбориш, стериллаш камерасидан конденсатни чиқариб юбориш учун мўлжалланган ҳаво ва чиқариш клапанлари.

Автоклавларда озуқа мухитлари, физиологик эритмалар, резина предметлар, резина тикинли шиша идишлар стерилланади. Стериллаш тартиби (ҳарорат ва стериллаш давомийлиги) озуқа мухитининг таркиби, рН нинг миқдори билан аниқланади. Таркибида шакар, сут, витаминлар бўлган мухитлар 0,05 МПа босим остида 15-20 дақиқа, гўшт-пептон мухитлар 0,1 МПа босим остида 20-30 дақиқа стерилланади. Стериллаш даври керакли босим ўрнатилган вақтдан бошлаб ҳисобланади.

рН нинг кичик қийматларида озуқавий мухитлар таркибига кирувчи баъзи моддалар стериллаш давомида гидролизга учрайди. Бунинг олдини олиш учун баъзи компонентлар (аминокаслоталар, витаминлар) эритмаси алоҳида стерилланиб, мухитга стериллашдан сўнг қўшилади.



Кох аппарати

Оқувчи буг билан стериллаш (бўлиб стериллаш) – ушбу усул 100° дан юкори ҳароратлар таъсир этганида ўз таркибини ўзгарувчи озуқа мухитларни бепушт қилиш учун қўлланилади. Бўлиб стериллашнинг моҳияти шундан иборатки, мухитни қиздириш 15-30 дақиқадан 100°C ҳароратда уч кун кетма кет амалга оширилади. Дастлабки қиздиришдан сўнг вегетатив ҳужайралар ҳалок бўлади. Лекин баъзи споралар тирик қолиб, кейин ўсиб чиқади. Ҳароратга чидаган спораларнинг вегетатив

формалари такрорий киздиришда ҳалок бўлади. Бўлиб стериллаш очик туширувчи кран ҳолатида Кох аппарати ёки автоклавда амалга оширилади.

Тиндаллаштириш – юқори ҳароратларда осон парчаланадиган материаллар (зардоблар, витаминлар, баъзи антибиотиклар)ни бўлиб стериллаш. Стериллаш объектни 60° дан 65°C гача бўлган ҳароратда 60 дақиқа 5-6 кун кетма-кет ёки $70-80^{\circ}\text{C}$ да 3 кун кетма-кет амалга оширилади.

Совуқ стериллаш

Бактериал филтрлар орқали филтрлаш. Агар юқори ҳарорат стерилланувчи металл сифатини кескин ўзгартириши мумкин бўлса, у ҳолда майда тешикли филтрлар орқали филтрлаш амалга оширилади. Бундан ташқари, филтрли стериллаш бактериал токсинлар ва микроорганизмлар фаолиятининг бошқа маҳсулотларини тозалаш учун қўлланилади.

Филтрларнинг 2 асосий хили мавжуд – чуқур ва мембрана филтри.

Чуқур филтрлар толали материаллардан иборат. Заррачалар улардаги адсорбция ва филтр materialiда механик ушланиб қолиши натижасида ўта олмайди. Бактериал филтрлар турли материаллардан, турли диаметрли тешиклар билан тайёрланади. Бу хусусиятлар қадокда кўрсатилган бўлади. Филтрлаб стериллаш учун Зейтцнинг пластинкали асбест филтрлари, каолин ва кварц қумидан тайёрланган Шамберлан шамлари, инфузор тупроқ ва асбестдан тайёрланган Беркефельд шамлари ишлатилади.

Мембрана филтрлари узлуксиз структурага эга бўлиб, улар нитроклечаткадан иборат ва уларнинг зарраларини ушлаб қолиш қобилияти тешиклар катталиги билан аниқланади. Мембрана филтрлари тешиклар катталигига қараб (350-1200 нм) 1 дан 5 гача номерлар билан белгиланган бўлади.

Филтрлаш орқали стериллаш вакуум ёки сув насосини қўллаш билан вакуум остида бажарилади. Ишни бошлашдан аввал филтрлар Бунзен колбаси билан уланган махсус улагичга ўрнатилади. Филтрлайдиган қурилма автоклавда 0,15 МПа босим остида 30-40 дақиқа стерилланади. Мембрана ва

асбест филтрлар бир маротаба ишлатилади. Шамберлан ва Беркефельд шамлари филтрлаш тугаганидан сўнг тескари йўналишда дистилланган сув тортилиб ювилади ва қайтадан ишлатиш учун тозаланади.

Нурланиш билан стериллаш. Ультрабинафша нурлар билан стериллаш хонадаги ҳавода мавжуд бўлган микроорганизмларни нобуд қилиши учун озуқа маҳсулотларини кадоқлашдан аввал уларни стериллаш учун ҳўлланилади. Бундай стериллаш турли қувватга эга бўлган (тўлқин узунлиги 253-265 нм) бактерицид лампалар ёрдамида амалга оширилади. Ионизацион нурланиш озик-овқат ишлаб чиқаришда ишлатиладиган баъзи кадоқловчи материалларни стериллашда қўлланилади.

Дезинфекция

Микроорганизмларни кимёвий модда ёрдамида нобуд қилиш *дезинфекция* деб аталади (лотинча *infectia* – инфекция ва французча *des* – инкор қўшимчаси). Кимёвий моддалар ташки муҳит объектларида патоген микроорганизмларни йўқотиш учун ишлатилади. Булар – иш жойи, хоналар, иш кийимлари, қўллар, технологик жиҳоз ва асбоблар;

Дезинфекция мақсадида қўлланиладиган моддаларга қатор талаблар қўйилади:

- Улар сувда яхши эриши керак;
- Қисқа вақт давомида бактерицид хусусиятларини намоён қилиши керак;
- Инсон ва ҳайвонларга токсик таъсир этмаслиги керак;
- Зарасизлантириладиган объектларнинг бузилишига сабаб бўлмаслиги керак;

Дезинфекцияловчи моддалар бир неча гуруҳларга ажратилади:

- 1) Хлорли бирикмалар (хлорли оҳак, натрий гипохлорит, хлорамин, пантоцид, хлордезинсульфохлаорантин ва бошқ.);
- 2) Йод ва бром асосидаги бирикмалар (йодопирин, дибромантин);
- 3) Оксидловчилар (водород пероксиди, калий перманганат ва бошқ.);

4) Фенол ва унинг бирикмалари (фенол, лизол, креолин, гексахлорофен);

5) Оғир металлларнинг тузлари (натрий мертиолят, сулема).

Антимикроб таъсирига шунингдек кислоталар ва уларнинг тузлари (борат кислота, салицил кислота), ишқорлар, спиртлар (этанолнинг 70% ли эритмаси), альдегидлар (формальтегид) эга.

Шунингдек бактерицид совунлар ҳам мавжуд: фенолли, “Гигиена”. Уларнинг таркибида 3-5% ли гексохлорофен мавжуд.

Назорат саволлари

1. Стериллашнинг қандай усулларини биласиз?
2. Стериллашнинг қайси усуллари термик усулга киради?
3. Лаборатория идишлари стериллашда қандай қилиб тайёрланади?
4. Стериллаш тартибини қандай факторлар аниқлайди?
5. Қайси ҳолларда стериллашнинг “совук” усуллари қўлланилади?
6. Дезинфекциаловчи моддаларга қандай талаблар қўйилади?
7. Дезинфекция учун қандай моддалар қўлланилади?

3. МИКРООРГАНИЗМЛАР ПРЕПАРАТЛАРИНИ ТАЙЁРЛАШ

УСУЛЛАРИ

Ишдан мақсад: микроорганизмларнинг тоза намуналари билан ишлаш, ҳамда тасаввур ҳосил қилиш, микроорганизмларнинг фиксацияланган-бўялган ва тирик препаратлари ва тамға препаратини олишни ўрганиш.

Микробиология амалиётида микроорганизмлар морфологияси, биокимёси ва физиологиясини уларнинг тоза намуналари кўлаб ўрганилади. Тоза кўриниш деб битта ҳужайранинг авлоди бўлган микроорганизмлар популяциясига айтилади.

Тоза намуналар билан ишлашда уларни бошқа микроорганизмалардан ҳимояловчи маълум шароитларни сақлаш керак. Барча операциялар ёниб турувчи спиртовка зонасида бажарилади. Майда предметлар (предмет шишалари, пинцетлар, қайчилар, бактериологик сиртмоқлар ва игналар) спиртовка оловида стерилланади-фламбирланади (немисча flame – олов). Зич мухитда ўстирилган микроорганизмлар бактериологик сиртмоқ ёки игна ёрдамида пробиркадан олинади. Суюқ (Бульон) кўринишидаги микроорганизмларни олиш учун стерилланган пипетка ёки сиртмоқ ишлатилади.

3.1. Фиксацияланган бўялган микроорганизм препаратларини тайёрлаш

Фиксациядан мақсад: микроорганизм ҳужайраларини nobud қилиш ва улар бўялганида ва сув билан ювилганида предмет шишаси юзасидан ювилиб кетмаслигини таъминлаш; ҳужайраларнинг рангини яхшилаш. Чунки ўлган ҳужайралар бўёқларни яхшироқ қабул қилади.

Пробиркада озукавий агарда ўстирилган микроорганизмлардан намуна олишда фиксацияланган бўялган препаратни тайёрлаш тартиби:

1. Спиртовка ёкилади;

2. Тоза предмет шишаси олинади ва спиртовка оловидан бир неча бор ўтказиб, фламбирланади;

3. Шиша столда совутилади ва унга флакондан бир томчи сув томизилади;

4. Намуна солинган пробирка чап қўлнинг бош ва қўрсаткич бармоқлари билан ушланиб, пробирканинг ичидаги модда қўринадиган қилиб озгина бурчак остида ушланади.

5. Ўнг қўлга бактериологик сиртмоқ ушланиб, сим қизаргунича спиртовка оловида қиздирилади ва ушлагичнинг симга тегиб турувчи жойи куйдирилади.

6. Ўнг қўлнинг бешинчи ва тўртинчи бармоқлари билан кафтга пахтали тикин зич ушланиб, пробиркадан олинади ва шундай ҳолатда ташқаридаги нарсаларга теккизмай ушлаб турилади.

Д и к қ а т! Микроорганизмлар билан контаминация (лотинча *contaminatio* – теккизиш) содир бўлмаслиги учун тикинни столга ёки бошқа юзларга қўйиб бўлмайди.

7. Очик пробирканинг четлари спиртовка оловида куйдирилади

8. Сиртмоқ пробиркага ботирилиб, деворларига теккизилиб совутилади ва озуқа муҳити юзасидан озгина намуна олинади.

Д и к қ а т! Озуқа ағари юзасини сиртмоқ билан бузиб бўлмайди.

9. Пробирканинг четлари горелка оловида яна куйдирилади ва олов устидан олиб ўтилиб, тикин билан ёпилади. Намуна солинган пробирка штативга қўйилади.

10. Пробиркадан сиртмоқ билан олинган материал предмет шишасидаги сув томчисига қўшилади ва шундан кейин эҳтиёткорлик билан аралаштирилиб, шиша юзасида юпка қатлам ҳосил қилинади.

11. Сиртмоқда қолган микроорганизмлар хужайралари горелка оловида ёндирилади. Шундан сўнг сиртмоқ жойига қўйилади.

12. Микроорганизмлар суспензияси спиртовка оловининг иссиқ ҳаво оқимида қуритилади ва 3-4 марта олов устидан ўтказилиб, фиксация қилинади (қуритилмаган суртмаларни фиксация қилиш мумкин эмас).

13. Совитилган шиша кўприкчага қўйилиб, қўқ метилен билан 2 дақиқа давомиди бўялади. Вақт қум соатга қараб белгиланади.

14. Бўёқ сув билан ювилади, препарат предмет шишасига эҳтиёткорлик билан қўйилиб, филтёр коғоз билан қуритилади.

15. Бўялган препаратга 1 томчи кедр мойи суртилади. Предмет шишаси предмет столчасига қўйилиб, макровинт ёрдамида иммерсион объектив (90х) мойга ботирилади ва аниклик ўрнатиш учун макровинтдан фойдаланиб, микроскопдаги тасвир топилади.

Д и қ к а т! Макровинтни препаратдаги микроблар тасвирини топиш учун ишлатиб бўлмайди.

3.2. Микроорганизмларнинг тирик препаратларини тайёрлаш.

Тирик препаратлар микробларнинг ҳаракатчанлиги, спораларнинг ўсиши, бўлиниш усуллари ва ҳоказоларни тадқиқ қилиш учун қўлланилади. Микроорганизмларнинг тирик препаратларини тайёрлашнинг 2 та асосий усули мавжуд – “эзилган томчи” ва “осилган томчи”.

“Эзилган томчи” препарати. Тоза предмет шишасига флакондан бир томчи сув суртилади. Унга пробиркадан сиртмоқ билан олинган текширилаётган намуна томизилиб, шишага суртиб юбормасдан секин аралаштирилади. Суюқ мухитда ўстирилган намуна (микроорганизм суспензияси) предмет шишасига пипетка ёрдамида суртилади.

Микроорганизмлар суспензияси устидан қопловчи шиша ёпилади. Унинг тагида текширишга ҳалақит бериши мумкин бўлган ҳаво пуфакчалари бўлмаслиги лозим. Шиша орасидан чиқиб кетган ортикча суюқлик филтёр коғози ёрдамида олинади.

Қопловчи шишага 1 томчи кедр мойи томизилиб, препарат конденсори туширилган иммерсион объектив орқали кўрилади. Актив ҳаракатланаётган бактериялар кўз майдонидан сузиб ўтадилар, йўналишини ўзгартирадилар, айланма ҳаракатни содир этадилар.

“Осилган томчи” препарати. Бундай препаратни тайёрлаш учун марказида ботик қисми бор махсус предмет шишаси ва оддий қопловчи шиша керак бўлади. Предмет шишаси чуқур қисмининг чегаралари вазелин билан мойланади. Микроорганизмларнинг бульонли намунаси (суспензия) қопловчи шишанинг марказига суртилади. Предмет шишаси чуқур қисми билан пастга қаратилади ва қопловчи шишадаги суспензия томчиси чуқур қисмининг марказига тўғри келадиган қилиб қўйилади.

Предмет шишаси қопловчи шишага бостирилади, бунда шишалар ёпишиб қолади. Препарат кўтарилиб, қопловчи шишани юқорида бўладиган қилиб ўгирилади. Бунда томчи узоқ вақт давомида қуриб қолмайдиган герметик камера ҳосил бўлади. Тўғри тайёрланган препаратда томчи қопловчи шишадан эркин осилиб, чуқурчанинг таги ёки чегараларига тегмаслиги лозим. Қопловчи шиша устига бир томчи иммерсион мой суртилиб, 90х объектив орқали қоронғилаштирилган майдонда (торайтирилган диафрагма ва туширилган конденсорда кўрилади.

3.3. Тамға препаратини тайёрлаш

Тамға препарати микроорганизмлар ҳужайраларининг субстрат ёки озиқ-овқат маҳсулоти юзасида табиий жойлашини ўрганиш учун ишлатилади. Тоза предмет шишаси фламбирланади ва текширилувчи объект (гўшт, балиқ, пишлоқ ва бошқ)нинг юзасига қўйилади. препарат-из спиртовка олови устида ушлаб турилади ва Грам усулида кўк метиленга бўялади. препаратга кедр мойи суртилади ва иммерсион объектив орқали кўрилади.

3.4. Микробиологик амалиётда ишлатиладиган бўёқлар ва pH-индикаторлар.

Бўялмаган микроорганизмлар (замбуруғлардан ташқари) ёруғлик микроскопида уларнинг кам контрастлилиги туфайли микроскопда кўринмайди. Микробиологик амалиётда бўяш микробларнинг шакли, ўлчамлари, структураси ва ўзаро жойлашишини аниқлашда қўлланилади. Фиксация қилинган препаратларни бўяш усуллари оддий ва мураккабга бўлинади. Микроорганизмаларни оддий бўяш усулларида асосий ва нордон анилин бўёқлари ишлатилади. Асосий бўёқларда хромофор (ранг берувчи ион) бўлиб катион, нордонларда – анион хизмат қилади. Асосий бўёқлар хужайранинг ядро компоненталари билан кўпроқ бирикадилар. Нордон бўёқлар хужайранинг цитоплазма компоненталарини яхши бўяйди.

Асосий бўёқларга қуйидагилар киради:

- Қизил бўёқлар – нейтрал қизил, асосий фуксин, сиорранин, тионин, пиронин, гематоксилин;
- Кўк бўёқлар – кўк метил, “Виктория”;
- Бинафша ранг бўёқлар – кристалл бинафшаранг, бинафшаранг генциан;
- Яшил бўёқлар – яшил янус, малахит яшил, метил яшил;
- Қора бўёқлар – индулин;

Нордон бўёқларга қуйидагилар киради:

- Қизил ва пушти – нордон фуксин, эозин, эритрозин;
- Сарик – конго, пикрин кислотаси, флуоресцин;
- Қора – нигрозин

Бўяшнинг оддий усулларида микробларнинг структурасини, шунингдек кўпинча уларнинг бўёқларга бўлган сезгирлигини аниқлаб бўлмайди. Бу мақсадларга эриши учун бўяшнинг мураккаб усули қўлланилади. Мураккаб усулларга Грам усули (7.2-бўлимга қаранг), Циль-Нельсен усули билан кислотага чидамлилиқни аниқлаш, Леффлер усули (6.3-бўлимга қаранг) билан

полифасфатлар уруғларини аниқлаш, бактериялар спораларини Циль–Нельсен ёки Пешков (7.4-бўлимга қаранг) усули билан аниқлаш, капсулаларни Гинс-Бурри усули (7.5-бўлимга қаранг) билан аниқлаш ва бошқалар киради.

pH индикаторлари органик моддалар бўлиб, улар муҳит актив кислоталик хусусиятининг ўзгаришида унинг рангини ўзгартиради. Ҳаётий фаолияти даврида микроорганизмларнинг ўзлари ривожланаётган муҳитининг кислота-ишқор мутаносиблигини ўзгартиради. Индикаторлар бу ўзгаришларни қайд қилиш учун ишлатилади. Бир муҳитда бўлган, бошқа муҳитда рангсиз бўлган индикаторлар *бир рангли* индикаторлар деб, интервалнинг 2 хил томонида турли рангга эга индикаторларини *2 рангли* деб аталади.

Микробиологияда кўпинча 3.1 жадвалда келтирилган индикаторлар қўлланилади.

3.1 жадвал

Икки рангли индикаторлар.

Индикатор	Ранг ўзгариши содир бўладиган pH	Рангнинг ўзгариши
Тимол кўк (нордон)	1,2–2,8	Қизил→сарик
Бромфенол кўк	3,0–4,6	Сарик →кўк
Бромкрезолгрюн	3,8–5,4	Сарик →кўк
Метил қизил	4,4–6,0	Қизил→сарик
Бромкрезол қирмизи	5,2–6,8	Сарик→қирмизи
Бромтимол кўк	6,0–7,6	Сарик →кўк
Фенол қизил	6,8–8,4	Сарик →қизил
Крезол қизил	7,2–8,8	Сарик →қизил
Тимол кўк (ишқорли)	8,0–9,6	Сарик →кўк

Масалан, микроорганизмларни аниқлашда уларнинг сахаролитик хусусиятларини аниқлаш учун Гиссинг “рангли қатори” қўлланилади. Гисс муҳитлари 1% ли пептопли сувга 0,5 – 1% ли углевод ва Андреде индикатори

(нордон фуксин) ва кўк бромтимол кўшиш билан тайёрланади. Мухитнинг бошланғич ранги (ферментатив активликнинг йўқлиги) – Андреде индикатори билан оч сарик ва кўк бромтимол билан кўк-яшил бўлади. Гисс муҳити экилган пробиркалар оптимал ҳароратда 24°C давомида инкубация қилинади. Микроорганизмлар углеводни парчалаганларида кислота ҳосил бўлиб, булар ҳисобига муҳитнинг ранги ўзгаради. Андреде индикаторили муҳит пушти-кизил, кўк бромтимолли муҳит – сарик бўлиб қолади.

Назорат саволлари.

1. Препаратни тайёрлаш учун микроорганизмларнинг тоза намунасини олишда қандай шароитлар яратиш керак?
2. Препаратни фиксация қилишдан мақсад нима?
3. Микроорганизмларнинг тирик препаратларни тайёрлаш усулларини айтинг
4. Микроорганизм препаратларни оддий ва мураккаб бўяш усулларини айтинг
5. Микроорганизмларни бўяшда қандай бўёқлар қўлланилади?
6. Микробиологик амалиётда қандай рН – индикаторлари қўлланилади?

4. МИКРООРГАНИЗМЛАРНИ ЎСТИРИШ

Ишдан мақсад: микроорганизмларни ўстиришда қўлланиладиган озуқа муҳитларининг турли хиллари билан таништириш; талабаларни микроорганизмларни экиш ва қайта экиш билан таништириш;

Микроорганизмларни озуқа муҳитларида ўстириш, культивация қилиш (лотинча *cultus* – ўстириш) деб аталади. Бу жараёнда ривожланган микроблар эса – культура деб аталади. Унинг қуйидаги турлари бор: фақат бир турдаги хужайранинг авлоди бўлган *тоза* культура; бир турдаги хужайралар ёки бир бирига яқин микроорганизмлар хужайралари кўп бўлган *йиғилган* культура ва бир неча организмлар тўпланмасидан иборат аралаш культуралар мавжуд;

Қандайдир текширилаётган материал (сув, маҳсулот, тупроқ намуналари ва бошқ.)нинг стерил озиклантирувчи муҳитга киритилиши *экиш* деб аталади. Ўстириб бўлинган культурани стерил муҳитга олинishi *қайта экиш* деб, кўп маротаба қайта экишларда – *пассирлаш* (лотинча *passis* – қайталаниш) деб аталади.

Микроорганизмларни культивация қилишда уларнинг ўсиши учун оптимал шароитлар яратиб бериш муҳимдир. Ўсиш тезлигига таъсир этувчи асосий омиллар бу – ҳарорат, муҳит рН миқдори, кислороднинг мавжудлиги ёки бўлмаслиги, муҳитнинг таркиби ва хоссаларидир.

Микроорганизмлар ўзлари учун қулай бўлган ҳароратда термостатлар ёки термостат хоналарда ўстирилади. Бу жараён *инкубация* ёки *инкубирлаш* (лот. *incubatio* – қушларни ўстириш) деб аталади. Хусусан, мезофил микроорганизмлар 25 дан 30°C гача, термофил микроорганизмлар – 40 дан 45°C гача, ичак таёқчаси бактериялари гуруҳи – 37°C ҳароратда ўстирилади.

Микроорганизмлар муҳит ўзгаришига жуда сезгирдирлар. Шунинг учун стериллашгача муҳитнинг рН катталигини тўғрилаб қўйиш керак. Бунда рН миқдори стериллашдан сўнг бир мунча камайиб қолишини инобатга олиш керак.

Лаборатория шароитларида микроорганизмлар шиша идишларда культивация қилинади. Булар: колбалар, пробиркалар, Петри чашкалари, матраслар (текис шиша идишлар). Культивация жараёни суюқ муҳитда (бульонлар), сутда ёки зич озуқа муҳитларида амалга оширилади.

Одатда микроорганизмларнинг тоза намуналари қия агар ёки суюқ (бульон) муҳитли пробиркаларда ўстирилади. Агар пробиркаларда ўстириш учун зич муҳит керак бўлса, стериллашга тайёрлашда эса эриган муҳитни пробирка ҳажмининг $1/3 - 1/4$ қисмга солинади.

Стериллашдан сўнг котмаган муҳитли пробиркаларни ён бошлаган ҳолда тахланади. Қотган муҳитли пробиркалар косяклар деб аталади.

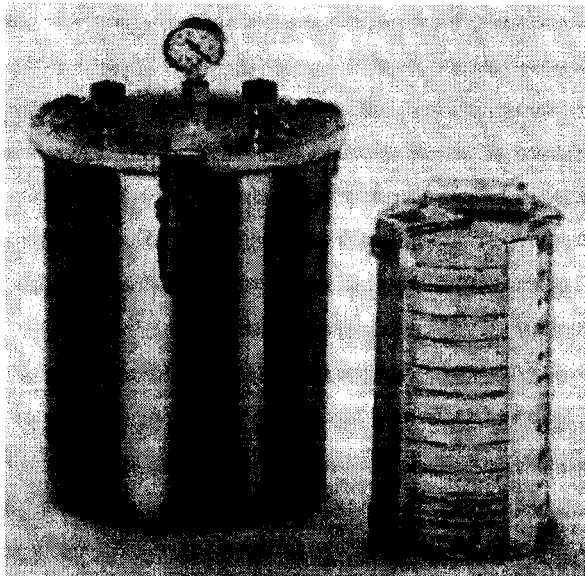
Суюқ муҳитларда аэроб бактерияларни ўстириш учун пробиркаларнинг $1/3$ қисми озуқа бульони билан тўлдирилади, анаэроблар учун – $2/3$ қисми. Микроорганизмлар бульонда ўсишининг ўзига хос белгилари бир жинсли хиралашиш, юзасида парданинг ҳосил бўлиши, маълум хилдаги чўкиндининг ҳосил бўлиши ва бошқалардир.

$1/2$ ҳажми зич муҳит билан тўлдирилган пробиркалар *устунчалар* деб аталади. Улар намунани *укол* билан экишда ишлатилади.

Микроорганизмларни колбаларда ўстириш учун факат суюқ озуқа муҳитлари, Петри чашкаларида ўстириш учун зич муҳитлар қўлланилади.

Петри чашкаларида кўпинча аэроб ва факультатив-анаэроб микроорганизмлар культивация қилинади. Улар зич озуқа муҳити юзасидан маълум хилдаги колонияларни ҳосил қилади.

Анаэроб бактерияларни культивация қилиш учун махсус асбоб – анаэроустатлар (4.1 расм) қўлланилади.



4.1 расм. Анаэростат

Анаэростат вакуумли резина гардишга эга қопқоқ билан ёпиладиган цилиндрдан иборат. Анаэростат қопқоғида вакуумметр ва 2 та кран мавжуд. Битта кран ҳаво тортадиган насосга, бошқаси газли (N_2 , CO_2 , H_2) баллонларга уланган. Чашка ва пробиркалар жойланганидан кейин вакуумли насос ёрдамида анаэростатдаги ҳаво чиқариб юборилади. Кейин кран махсус винт билан беркитилиб, анаэростат вакуумли насосдан ажратиблиб, термостатга олинади.

4.1. Озуқа муҳитлари

Озиқ-овқат маҳсулотларидаги микроорганизмларни аниқлаш, миқдорини санаш, ажратиш ва хоссаларини ўрганиш учун таркиби ва вазифаси жиҳатдан турлича бўлган озуқа муҳитлари ишлатилади. Ҳар бир озуқа муҳитлари қуйидаги талабларга жавоб бериши керак: таркибида микроорганизмларни озиқлантириш учун барча керакли моддалар енгил бирикадиган шаклда бўлиши, оптимал намлик, қовушқоқ ва pH га эга бўлиши, изотоник ва иложи

борича шаффоф бўлиши керак. Ҳар бир озука муҳити ўзининг таркибига қараб маълум бир усулда стерилланади.

Таркибига кўра синтетик ва табиий озука муҳитлари фарқланади.

Синтетик муҳитлар маълум кимёвий тоза бирикмаларнинг маълум дозасининг сувдаги эритмаларидан иборат, яъни, уларнинг таркиби аввалдан маълум. Лекин фақат оз микдордаги озукага талабчан бўлмаган микроорганизмларгагина синтетик озука муҳитлари ишлатилади.

Натурал ёки табиий муҳитлар ўсимлик ёки ҳайвонот келиб чиқишига эга бўлган маҳсулотлардан иборат бўлиб, мураккаб ноаниқ кимёвий таркибга эга. Уларга гўшт пептонли бульон ва агар, солод суслоси ва солод-агар, ёғсизлантирилган ва гидролизланган сут, турли сабзавотлар қайнатмалари ва бошқалар киради.

Мақсадига кўра озука муҳитлари асосий, эффектив ва дифференциал-диагностик хилларга бўлинади.

Асосий муҳитлар деб кўп бактерияларни ўстириш учун қўлланиладиган муҳитларга айтилади. Уларга гўшт-пептон бульон (ГПБ), гўшт, балик маҳсулотлари, казеиннинг триптик гидролизатлари киради. Бундай муҳитлар мураккаб озука муҳитларини тайёрлаш учун асос бўлиб хизмат қилади. Уларга дон, шакар, сут ва бошқа ингредиентлар киради.

Электив ёки танланган муҳитлар микробиологик амалиётга С.Н.Виноградский ва М.Бейеринк томонидан киритилган. Бу муҳитлар маълум турдаги (ёки маълум гуруҳдаги) микроорганизмларни турли микрофлорали объектлардан олиш ва йиғиш учун мўлжалланган. Ёндош микроорганизмлар бундай муҳитларда ўсмайди ёки улар жуда секин ривожланади. Электив муҳитлар билан ишлаш ушбу микроорганизмларнинг кўпгина бошқа турларидан фарқланувчи биологик хусусиятларга асосланган.

Дифференциал-диагностик муҳитлар бир турдаги ёки гуруҳдаги микроорганизмларни аниқлаб, бошқаларидан ажратиш (дифференциаллаш) имкон беради. Уларнинг таркиби берилган турдаги микроорганизмларнинг

характерли хусусиятларини аниқ топишга имкон бериши керак. Бунга эришиш учун муҳитларга махсус бўёқ-индикаторлар киритилиб, улар аникланаётган микроорганизмлар колониясини маълум рангга бўяйди. Хусусан, ичак таёқчаси гурухи бактерияларини аниклаш учун Эндо, Кесслер, Эйкмана, Плоскирев, Левин ва бошқаларнинг дифференциаллайдиган муҳитлари ишлатилади.

Физикавий хоссаларига кўра муҳитлар суюқ, ярим суюқ, зич ва қуруқ муҳитларга бўлинади.

Суюқ муҳитлар (бульонлар) микроорганизмларнинг биомассаси ёки улар метаболизми маҳсулотларини йиғиш, шунингдек, микроорганизмларнинг физиологик-биокимёвий хусусиятларини аниклаш учун ишлатилади.

Яримсуюқ муҳитлар таркибида 0,08 дан 0,7% гача агар мавжуд.

Зич муҳитлар суюқ муҳитларга желатин ёки агар (1,5-2%) қўшиб тайёрланади. Бу икки модда иссиқ сувда эриганида коллоид эритма ҳосил қилиб, у совиганида зич гел ҳосил бўлади. Гельсимон муҳитларни иситиб, яна эритса бўлади. Зич муҳитлар микроорганизмларнинг тоза намуналарини аниклашда диагностик мақсадларда (муҳитда ўсган колонияларнинг таърифини бериш), микроорганизмларни миқдорий аниклашда, антагонистик, протеолик фаолликни аниклашда ишлатилади.

Қуруқ озуқа муҳитлари махсус корхоналар томонидан ишлаб чиқарилади ва микробиологик мақсадларда сув қўшилиб, стериллаб ишлатилади.

4.2. Микроорганизмларни озуқа муҳитларига экиш техникаси

Микроорганизмлар билан ишлашда махсус бактериологик сиртмоқлар, игналар, шпателлар, пипеткалар қўлланилади. Экиш доим горелка олови зонасида амалга оширилади. Тоза намуна билан ишлаётган киши ёнида кескин ҳаракат қилиши, юриш, йўталиш мумкин эмас. Чунки хавонинг ҳаракати намунали пробиркага бегона микроорганизмларнинг тушишига сабаби бўлади. Шунинг учун микроорганизмларни экиш ва қайта экиш боксда бажарилади. Бокснинг асосий хонасига факат боксда ишлаганда кийиладиган халатлар

мавжуд бўлган тамбур орқали киритилади. Боксинг барча жиҳозлари, деворлари ва поли доимий равишда дезинфекциаловчи воситалар билан артиб турилади. Иш бошлашдан аввал бокс бактерицид лампалар воситасида 1,0-1,5 соат давомида стерилланади.

Суюқ озуқа муҳитга экиш – экиш сиртмоқ ёки градиуровкаланган пипетка ёрдамида амалга оширилади. Экиладиган материал бактериологик сиртмоқ билан пробиркага солинади ва озуқа муҳитининг юқори қатламида енгил силкитилади. Ёки экиш материали суюқ муҳит билан ювилиб, пробирка деворларига суртилади.

Стерил пипетка намуна солинган пробиркага солиниб, маълум миқдор материал олиниб, янги озуқа муҳити солинган пробиркага ўтказилади. Бунда суюқлик пробирка деворларига суртилади, ёки пипетка муҳит ичига киритилиб, ичидаги материал чиқарилади.

Ўрилган агар солинган пробиркага штрих усули билан экиш. Культуралар солинган ва ўрилган озуқа ағари солинган пробиркалар чап қўлда эгилган ҳолатда ушланади. Ўнг қўлга бактериологик игна олиниб, у спиртовка оловида кизаргунича ушланади, кейин игна ушлагич олов орқали олиб ўтилади. Ўнг қўлнинг бешинчи бармоғи билан иккита пробиркадаги тикинлар олиб ташланади, пробиркаларнинг четлари қуйдирилади. Сиртмоқ культуралари пробиркага киритилади, четларига теккизилиб, совитилади ва микроблар намунасида озгина миқдори олинади. Экиш материали суртилган сиртмоқ стерил муҳитга солиниб, деярли тубигача туширилади. У ерда конденсацион намликнинг озгина миқдори йиғилиб қолади. Агарга енгил тегиб, зигзагсимон чизик ўтказилади. Бунда сиртмоқ озуқа муҳити юзасидан узилмайди. Экишдан сўнг сиртмоқ пробиркадан олинади ва экиш материали колдиклари билан бирга қуйдирилади. Кейин пробиркаларнинг четлари ва тикинларнинг ички тарафлари қуйдирилади. Шундан сўнг пробиркалар ёпилади. Пробиркаларнинг ташқи юзасида экиш санаси ва культуранинг номи ёзилади.

Укол билан экиш. Фламбирланган бактериологик игна билан текширилувчи намуна олинади. Озука мухитининг устунчаси солинган пробиркани ўнг қўлга олинади. Тескари ўгирилади, унинг тикини 5-бармоқ билан кафтга теккизилиб олинади. Пробиркани кўз даражасига кўтариб, зич мухитнинг тагигача игнада тешилади. Кейин игна олинади, пробирка тикин билан ёпилиб, устига ёзилади. Сўнг уни термостатга ўстириш учун жойланади.

Петри чашкасида мухит юзасига экиш. Петри чашкасига эриган агар қуйилади, у котгунича кутилади ва термостатда қуритилади. Экиш бактериологик сиртмоқ ёки Дригальский шпатели (учбурчак кўринишидаги шиша таёкча) ёрдамида амалга оширилади. Петри чашкасининг копоғи сиртмоқка кирадиган даражада очилади. Сиртмоқ озука мухитини тимдалаб юбормаслиги учун горизонтал ҳолда туширилиб, микробли намуна агарнинг бутун юзаси бўйлаб зигзагсимон ҳаракат билан (штрих) мухитдан узмасдан сурилади. Бу изоляцияланган агарни олишга имкон беради.

“Газон” усули билан экиш шпатель билан амалга оширилади. Бунинг учун чап қўл билан Петри чашкаси озгина очилади, сиртмоқ ёки пипетка билан экилувчи материал озука агар юзасига суртилади. Кейин шпатель горелка оловидан ўтказилади, копоқнинг ички тарафига теккизилиб совутилади ва материал мухитнинг бутун юзасига суртилади. Экувчи материалнинг инкубациясидан сўнг чашкада бир текис ўсган намуна “газони” пайдо бўлади.

Петри чашкасига чуқур экиш. Экишга тайёрланган текширилувчи материалнинг маълум миқдорини ($1,0$ ёки $0,1 \text{ см}^3$) пипетка билан бўш Петри чашкасига солинади. Эриган ва 45°C гача совиган озука мухити солинган пробирка ёки колбанинг тикини олинади, четлари горелка оловида қуйдирилади ва копоқни озгина очиб, чашка тубига қуйилади

Экилган материалли пробирка ва чашкалар берилган микроорганизм учун оптимал ҳароратли термостатга қуйилади. Қоидага кўра мезофил бактериялар $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ да, термофил бактериялар $40-55^{\circ}\text{C}$ да, ачитки ва моғор замбуруғлар $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ да ўстирилади.

Назорат саволлари

1. Тоза, йиғилган ва аралаш культуралар деб нимага айтилади?
2. Озуқа муҳитлар компоненталари ва таркибига кўра қандай классификация қилинади?
3. Қандай муҳитлар баъзи микробларнинг ўсишини орттириб, баъзиларининг камайтириш имконини беради.
4. Микроорганизмлар озуқа муҳитларига экилиши қандай усул билан амалга оширилади?
5. Аэроб ва анаэроб бактерияларни культивация қилиш қандай амалга оширилади?

5. МИЦЕЛИАЛ ЗАМБУРУҒЛАР МОРФОЛОГИЯСИНИ ЎРГАНИШ

Ишдан мақсад: энг кўп тарқалган мицелиал замбуруғлар – озиқ-овқат маҳсулотларини айнитувчи қўзғатувчилар морфологияси билан танишиш.

Моғор замбуруғларининг кўплари сапрофитлардир, лекин улар орасида инсон, ҳайвонлар, ўсимликлар касалликларини келтириб чиқарувчи патоген турлари ҳам мавжуд. Кўп мицелиал замбуруғлар озиқ-овқат маҳсулотларининг юзасида ёки ичида кўпайиб, уларнинг айланишига олиб келади. Бундан ташқари баъзи замбуруғлар ўзларининг ҳаётий фаолиятлари даврида метаболизмнинг захарли маҳсулотлари – микотоксинларни ишлаб чиқаради. Микотоксинларнинг озиқ-овқат маҳсулотларида тўпланиши гепатоген, тератоген ёки канцероген таъсирга олиб келиши мумкин. Моғорнинг зич субстратларида турли рангдаги думалок, пахмайган, тўрсимон ёки барқутсимон колониялар ҳосил қиладилар: кора, жигарранг, кулранг-ҳаворанг, сариқрок ёки оқ ранг. Моғор колониялари кўп миқдордаги шохланган гифалар деб аталувчи иплардан иборат, уларнинг қалинлиги 1 мкмдан 15 мкмгача, узунлиги 100 ммгача бориши мумкин. Гифалар шохланиб, бир-бирига чирмашиб, замбуруғ танаси – *мицелийни* ҳосил қилади. Гифаларнинг кўпчилиги ҳавода мицелий ҳосил қилиб ривожланади; гифаларнинг бир қисми субстратга кириб кетиб субстратли мицелий ҳосил қилади. Моғор замбуруғлари колонияларининг ранги споралар қандай рангга бўялганига боғлиқ; мицелий гифалари рангсиз бўлади.

5.1. Замбуруғлар классификацияси

Баъзи намоёндаларининг характеристикаси

Ҳозирги вақтда замбуруғлар эукариот тури, *Mycota (Fungi)* гуруҳига кириб, унга иккита бўлим киради: *Muchomycota* – шилимшиқ замбуруғлари ва *Eumycota* – ҳақиқий замбуруғлар киради. *Eumycota* бўлими тузилиши ва ривожланиш босқичларига кўра 7 та синфга бўлинади: анаморф (жинсسىз) ва

телеоморф (жинсли). 4 та синф куйи замбуруғларга: *Chytridiomycetes*, *Hyphochytridiomycetes*, *Oomycetes*, *Zygomycetes* ва 3 таси юқори замбуруғларга киради: *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*.

Куйи замбуруғлар уларни бошқа замбуруғлардан ажратувчи иккита хусусиятга эгадирлар. Биринчидан, улар кўндаланг тўсик билан бўлинмаган бир хужайрали мицелийга эга. Ушбу тўсик *септирланмаган* (грекча *septum* – тўсик деб аталади). Шунинг учун мицелий бир хужайрали ва кўп ядроли хисобланади. Иккинчидан, куйи замбуруғлар спораси (спорангиоспоралар) доим алоҳида хужайралар – спорангияларда эндоген (грекча *endon* – ичида) равишда ҳосил бўлиб, улар мева ҳосил қилувчи гифалар – спорангий ташувчиларда жойлашган.

Юқори замбуруғлар яхши ривожланган кўп хужайрали (*септирланган*) мицелийга эга, уларнинг гифалари тўсик билан ажратилган. Улар вегетатив йўл билан экзоспоралар – *конидий* ёрдамида ва жинсий йўл билан *аскоспоралар* ва *базидиоспоралар* ҳосил қилиш билан кўпаяди.

Куйи замбуруғлар.

1. *Chytridiomycetes* синфи (хитридиомицетлар), кўпинча мицелий ҳосил қилмайди, танаси қуруқ протопласт (плазмодий)дан иборат бўлиб, у спорангийга айланиш жараёнида қобиқ билан қопланади. Спорангийлар ичида ҳаракатчан зооспоралар ҳосил бўлади. Кўп хитридиомицетлар ўсимликларда паразит сифатида яшайди. Ўсимликларнинг зарарланган хужайраларида улар ҳаракатсиз хужайралар – калин қобиққа эга *цисталарни* ҳосил қилади.

Хитридиомицетларнинг муҳим намоёндаларидан бири картошка саратонининг кўзгатувчиси - *Synchytrium endobioticum*. Зарарланган сабзавотларнинг кўзлари атрофида ғадир-будир ўсимталар – “ўсма”лар ҳосил бўлади. Ўсимталарда замбуруғ цисталарининг массаси жойлашган. Ўсимталар эзилса, цисталар тупроққа тушади ва у ерда кишни ўтказади. Баҳорда цисталар ўсиб, ёш ўсимликларни зарарлайдиган ҳаракатчан зооспораларга айланади.

2. *Hyphochytridiomycetes* синфи (гифохитридиомицетлар) – кўпайишнинг жинсий босқичи бўлмаган бир хужайрали замбуруғлар. Бу синфнинг кўп турлари яшил ва қўнғир сув ўтлари, маданий ўсимликларнинг хужайралари ичидаги паразитлардир. Хусусан, *Plasmodiophora rassica* тури карамгулдошлар касаллигини кўзгатувчиси *Spongospora subterranea* эса, картошка касаллигини кўзгатувчиси.

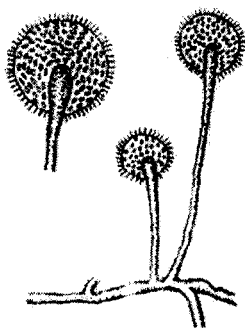
3. *Oomycetes* синфи (оомицетлар) – сув ва ердаги шаклларни ўз ичига олади. Жинсиз йўл билан зооспоралар ёрдамида, шунингдек жинсий йўл билан ооспоралар ҳосил қилиб кўпаяди. Бу синф замбуруғлари яхши ривожланган мицелийга эга. Оомицетларга фитофтороз кўзгатувчиси – *Phytophthora infestans* тури кириб, у картошка, помидор, ва баклажонни захарлайди. Қисқа шохланган спорангий ташувчиларда лимонсимон спорангийлар ривожланиб, улар етилганидан сўнг тупрокка тушади. Уларда гифаларга кириб кетувчи зооспоралар ҳосил бўлади.

4. *Zygomycetes* синфи (зигомицетлар) – табиатда кенг тарқалган ер замбуруғлари. Уларга *Mucor*, *Rizopus*, *Thamnidium* туридаги замбуруғлар кирилади.

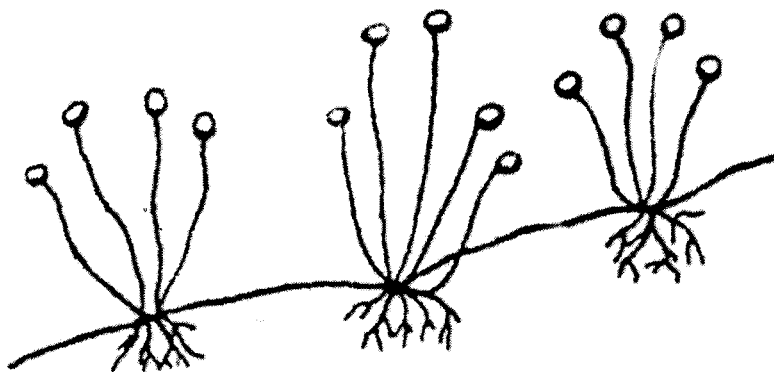
Mucor тури. Мукор замбуруғлари аввал оқ, кейин кулранг бўладиган пахмайган, тўрсимон мицелийга эга. Асосий мицелийдан жуда кўп мева ҳосил қилувчи гифалар – спорангий ташувчилар кўтарилиб, уларнинг учлари йирик спорангийлар ҳосил қилиб шишган. Ташқаридан спорангийлар кальций оксалати кристалларидан иборат ингичка тиканлар билан қопланган. Спорангийларда жинсиз йўл билан жуда кўп *спорангиоспоралар* ҳосил бўлади. Мукор замбуруғлари нам бугдой, солод, ер остида ўсувчи сабзавотлар, озик-овқат маҳсулотлари юзасида яхши кўпаяди.

Mucor mucedo (5.1-расм) узунлиги 4 см гача борадиган сариқ-кулранг рангдаги шохланмайдиган спорангий ташувчиларига эга колониялар ҳосил қилади. Спорангийлар кулранг, баъзида жигарранг – қора.

***Rhizopus* тури.** Резопус туридаги замбуруғлар қулранг-жигарранг наमतсимон мицелий ҳосил қилади. Мукор змабуруғларидан *столонлар* деб аталувчи ёйсимон эгилган қуртаклари билан фарқланади. Субстратга столонлар *ризойд* деб аталувчи гифаларнинг ингичка ўсимталари билан бириктирилган. Ризоидларнинг устида 3-5 та (баъзида 10 та) спорангий ташувчилар дастаси (буталар) жойлашган. Спорангийлар шарсимон, аввал рангсиз, етилганидан сўнг қора бўлади. *Rizopus nigricans* (5.2-расм) туридаги замбуруғлар мевалар, илдизли ўсимликларни зарарлайди.



5.1-расм. *Mucor mucedo*



5.2-расм. *Rizopus nigricans*

Thamnidium тури. Тамнидиум туридаги замбуруғлар учларида йирик спорангийлар жойлашган узун тўғри турувчи спорангий ташувчили кулранг-ок рангдаги мицелийга эга. Спорангий ташувчиларида озгина микдордаги спорангиоспоралари мавжуд бўлган майда *спорангиолалар* ҳосил бўладиган ёндош шохлар ўсиб чиқади.

Thamnidium elegans (5.3-расм). Паст ҳароратларда яхши ўсади, гўшт ва гўшт маҳсулотларини музлатгичда сақланганида заралайди.

Юқори замбуруғлар

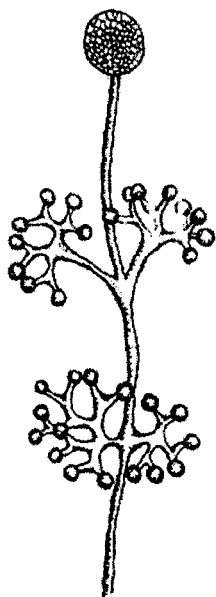
5. ***Ascomycetes*** синфи (аскомицетлар – грекча ask – сумка). Ушбу синф замбуруғлари яхши ривожланган кўп хужайрали мицелийларга эга. Жинсий жараёнда аскомицетлар аскоспорали асқларни ҳосил қилади. Кўп аскомицетлар экзоспоралар – конидийлар ёрдамида жинссиз йўл билан кўпайиши мумкин. Споралар сақлашнинг бу шакли номукамал деб аталади. Аскомицетларнинг энг кўп тарқалган намоёндалари *Penicillium* ва *Aspergillus* туридаги замбуруғлар.

Penicillium тури. Кўп хужайрали замбуруғларнинг бу гуруҳи уларнинг ташки муҳит шароитларига чидамли бўлгани учун табиатда кенг тарқалган. Пенициллиум туридаг замбуруғлар субстратнинг устида кулранг, хаворанг ёки яшил рангдаги барқутсимон колониялар ҳосил қилади. Пеницилларнинг конидий ташувчилар кўп хужайрали, шохланган. Шохларнинг учларида чўзиқ хужайралар – конидий занжирларига эга *стеригмалар* жойлашган. Бунда мева ҳосил қилувчи гифаларнинг учлари попуқни эслатадиган (*Penicillium* – попуқ). Конидийлар силлиқ ёки тиканли, думалок, турли рангларга бўялган.

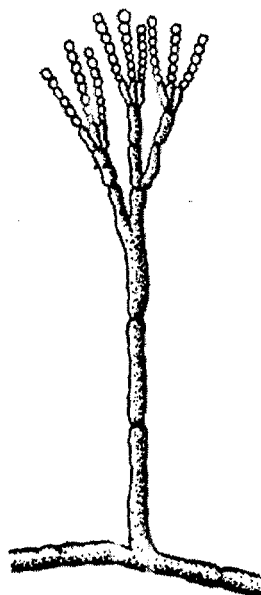
Penicillium glaucum – яшил пеницилл тўғри попуқсимон шохланган конидий ташувчиларига эга кулранг-яшил колониялар. Конидийлар занжирларининг кўпи бир-бирига зич тегиб туради. Бу тур кўпинча нон, сариёғ, пишлоқлар, кондитер ва макарон маҳсулотлари, музлатгичда сақланадиган гўштларда ва бошқа озиқ-овқат маҳсулотларида кўпаяди.

Penicillium roqueforti ва *Penicillium camamberti* туридаги замбуруғлар моғорли пишлоклар: рокфор, бри, камамбер, дор-блю ва бошқаларни ишлаб чиқаришда қўлланилади. Улар бу пишлокларга хос махсус таъм ва замбуруғ хидини беради.

P. chrysogenum ва *P. Notatum* турлари антибиотик пенициллин олиш учун қўлланилади.



5.3-расм. *Thamnidium elegans*



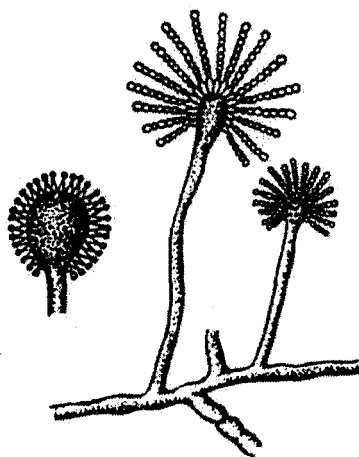
5.4-расм. *Penicillium glaucum*

Aspergillus тури. Аспергилларнинг конидий ташувчилари септирланмаган, уларнинг қалинлашган учлари стеригмалар билан тугалланади. Стеригмалардан конидийлар занжирлари ажралиб чиқади. Аспергилларнинг конидийлари етилганида турли рангга киради, бу ҳол замбуруғлар турларининг номида ифодаланади ва бошқа белгилари каби уларнинг хусусиятларини билдиради.

Aspergillus niger (қора аспергилл – 5.5-расм) бошланғич босқичда оппок мицелий ҳосил қилиб, унда етилиш давомида жигарранг-қора бошчали конидий ташувчилар ҳосил бўлади. Шунинг учун замбуруғ колониялари қора рангга киради.

Aspergillus glaucum (яшил аспергилл) қисқа конидий ташувчили баркутсимон сарик-яшил рангдаги колониялар ҳосил қилади.

Қора (*A. niger*, *A. awamori*), жигарранг (*A. terreus*), сарик-яшил (*A. oryzae*, *A. flavus*) аспергиллар ичида турли ферментлар, органик кислоталар, антибиотикларнинг турли фаол маҳсулотлари ажратилган. Баъзи аспергиллар нафас йўллари, тери, оғиз бўшлиғининг шиллиқ қавати касалликларини келтириб чиқаради. *A. Flavus* заҳарли моддалар – афло токсинларини ҳосил қилади.



5.5-расм. *Aspergillus niger*

Claviceps тури. Бу турнинг энг асосий намоёндалари *Claviceps purpurea* – фитопатоген замбуруғлар бўлиб, спорынья кўзгатувчиси бўлиб, у арпа, баъзида бугдой ва жавдарни гуллаш даврида касаллантиради (5.6-расм). Спорынья билан касалланган ўсимликлар гулларида тўқ бинафшаранг шохчалар

кўринишига эга *склероциялар* яхши билиниб туради. Ҳосил йиғилганда склероциялар тупроққа тушади ва у ерда кишни ўтказди. Баҳорда склероциялар ўсиб, ипсимон оёқчаларда жойлашган бошчалар кўринишидаги мева таначаларини ҳосил қилади. Строма бошчасининг ичида жинсий жараён содир бўладиган бўшлиқлар бор. Бу жараён аскогоннинг, антеридийнинг, шунингдек плазмोगамия ва кариогомия шаклланишини ўз ичига олади. Жараён саккизтадан ипсимон аскоспоралари бор сумкалар (асklar)нинг ҳосил бўлиши билан тугалланади. Етилган аскоспоралар буғдойдошларнинг гуллаш даврида уларга сочилиб спорага эга мицелийларни ҳосил қилади. Зарарланишидан бир неча кун кейин замбуруғнинг конидиал боскичи ривожланади. Замбуруғ конидийсининг ҳашоратлар томонидан тарқатилишида конидийлар ботиб турадиган «медвяная роса»си катта аҳамиятга эга. Гулнинг тугунчасида жавдарнинг пишиши даврида мицелий зичлашади ва уруғлар ўрнига шохчалар (склероцитлар) шаклланади. Юқори намликда склероцитлар «медвяная роса» пайдо бўлганидан бир ҳафта кейин, қуруқ ҳавода – 2 ҳафта кейин ҳосил бўлади.



5.6-расм. Спорынья билан касалланган бошок ва ўсиб чиққан склероцит.

Спорынья билан касалланиш дон ҳосилини камайтиради. Бундан ташқари склероцийнинг донга тушиши инсон ва ҳайвонларнинг кучли захарланишига олиб келиши мумкин (токсикозлар). Юқори биологик фаолликка эга спорынья токсинлари ва уларнинг ҳосилалари кўп ўрганилган. Токсинлар асосан алкалоидлардан иборат бўлиб, улар эрготин ва лизергин кислоталарининг

ҳосилалари ҳисобланади. Спорынья шохчалари тушган ундан тайёрланган нонни ейиш ҳолсизлик, бош айланиши, томир тортишишга сабаб бўлади (“эрготизм” деб аталувчи захарланиш). Спорынья шохчаларининг дондаги микдори 0,05 % дан ошмаслиги керак.

6. *Basidiomycetes* синфи (базидиомицетлар). Юқори даражада ривожланган кўп ҳужайрали замбуруғларнинг гуруҳида 30 мингта тур бор. Бу синф замбуруғларининг ўзига хослиги махсус орган – базидиянинг мавжудлигидир. Унда жинсий жараён натижасида базидиоспоралар ривожланади. Базидиомицетларга куйидаги замбуруғлар киради:

- Қалпоқчали замбуруғлар (трубкасимон, пластинкали, игнали) қалпоқча кўринишидаги бир йиллик мевали танаси бўлиб, у оёқчага бириккан;

- Дарахтлар поясида ўсквчи ва ёғочни парчаловчи трут замбуруғлари;

- Биноларнинг тахта қисмларида кўпайувчи уй замбуруғлари. Бу замбуруғларнинг ривожланишида ёғоч секин-аста парчаланadi, чирийд;и

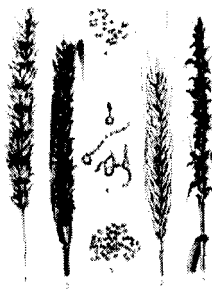
- Дала, боғ ўсимликларини зарарловчи паразитик замбуруғлар. Уларнинг энг муҳим намояндалари қора куя замбуруғи (*Ustilaginales* тартиби) ва занг замбуруғлари (*Uredinales* тартиби).

Қора куя замбуруғи асосан дон ўсимликларини заралантириб, қора куя деб аталувчи касалликни келтириб чиқаради.

Каттик, чангли ва пуфакли қора куя замбуруғи ажратилади. Ҳозирги даврда бугдой, арпа, жавдарнинг каттик (хўл) қора куяси тарқалган бўлиб, унинг кўзгатувчилари *Tilletia caries*, *Tilletia hordei* эканлиги маълум. Қора куя споралари донлар ўсиб чиққунича уруғда ривожлана бошлайди. Мицелий доннинг ўсимтасига кириб, ўсимлик билан бирга ўсиб чиқади. Гуллаш даврига келиб замбуруғ мицелийси гул тугунчасига кириб, сутли етилиш фазасида доннинг ички қисми қора куя споралари ёки телеоспоралар билан тўлади. Бошоқда доннинг ўрнига қора хламидоспоралар билан тўлдирилган думалок

қопчалар ҳосил бўлади. Касалланган бошоқ тўқ тусда бўлиб, ёқилган пайрахага ўхшайди – “қора куя” номи шундан келиб чиққан (5.7-расм).

Ҳосил йиғиш даврида ва донлар эзилганида қопчалар бузилади ва споралар соғлом донлар юзасига тушади. Дон спораларда триметиламин борлиги сабабли селёдка балиғи тузламаси хидига эга бўлиб қолади. Қаттиқ қора куя споралари гигроскопик, намланганида осон суртилади. Қаттиқ қора куя билан касалланган дондан тайёрланган ун тўқ рангга киради, ёмон хид ва таъмга эга бўлади, сўлак безларига ёмон таъсир қилади ва ичаклар фаолиятининг бузилишига олиб келиши мумкин.



5.7-расм. Дон ўсимликларининг чанг қора куяси

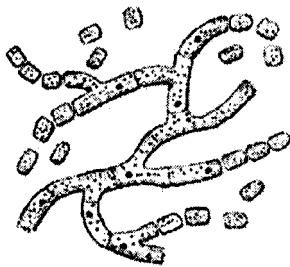
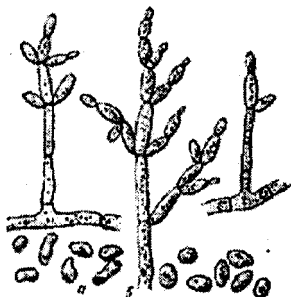
7. *Deuteromycetes* синфи (дейтеромицетлар – номукаммал замбуруғлар). Бу синфга *экзоспоралар* конидий ёки артоспоралар (ондий) ёрдамида жинссиз йўл билан кўпайувчи кўп ҳужайрали замбуруғлар киради. Баъзиди конидиал спора ҳосил қилиш бўлмай, фақат склероциялар ҳосил бўлади.

Дейтеромицетлар табиатда кенг тарқалган, уларнинг кўплари маданий ўсимликларда ва озиқ-овқат маҳсулотларида кўпайиб, уларнинг айнишига сабачи бўлади.

***Cladosporium* турти** – шингилсимон моғор, субстрат юзасида яшил зайтун рангидаги баркутсимон колониялар ҳосил қилади. Мицелий кўп ҳужайрали, кам шохланган. Кладоспориум бластоспоралар ҳосил қилади. Улар конидоген ҳужайралар учларида шишлар ҳосил қилиб, кейин ундан тўсиқ билан

ажраб олади. Субстратга тегиб турувчи колонияларнинг орқа қисми қора рангга эга. *Cladosporium herbarum* музлатгичда сақланаётган гўшт, сариёғ, пишлокнинг юзасида ривожланади (5.8-расм).

Endomyces тури гифалари алоҳида хужайралар – оидийларга бўлинадиган ок баркутсимон мицелий ҳосил қиладилар. Улар шунингдек артроспоралар деб аталади (5.9-расм). Бу тур намояндаси сут моғори *Endomyces lactis* (синоними *Geotrichum candidum*) бўлиб, сут-қатик маҳсулотлари, пишлоклар, сариёғ юзасида ривожланади. Сут моғорининг мицелийси ҳеч қачон қораймайди ва рангли мевалар қилмайди. Сут моғори фаол протеаза ва липазаларга эга. Шунинг учун у сут маҳсулотларида ривожланганида улар аччиқ таъм ва ёмон хидга эга бўладилар.



5.8-расм. *Cladosporium herbarum* а –
конидийлар; б – конидий ташувчилар

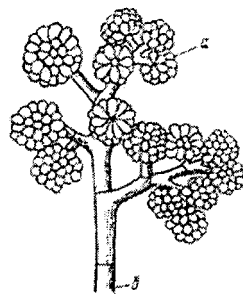
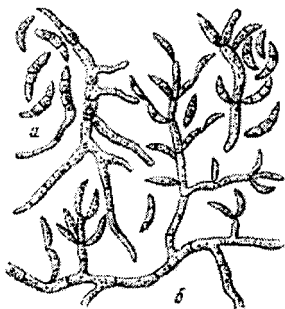
5.9-расм. *Endomyces lactis* (синоними
Geotrichum candidum)

Fusarium тури ок ёки ёрқин колониялар ҳосил қилади. Фузариум икки турдаги конидийларга эга: макроконидийлар- ўроксимон бўлиб, улар қисқа конидий ташувчиларда ривожланади, ва микроконидийлар-майдарок, овал, рангсиз (5.10 расм). Микроконидийлар ўзига хос ўроксимон шаклга эга. Уларнинг бир ёки бир неча кўндаланг тўсиқлари бор. Микроконидийлар майда, рангсиз, бир хужайрали ёки бир-иккита тўсиқларга эга. Бу турдаги замбуруғлар ичида мева ва сабзавотлар касаллиги-“фузариоза”ни келтириб чиқарувчи паразитик турлар

кўп. Энг кўп тарқалган тури *Fusarium avenaceum*. Баъзи турлари микотоксинларни йиғди.

Botrytis тури. Ботритис субстратда кулранг ёки жигарранг зайтун рангидаги ёйилувчи парда кўринишида ривожланади. Баъзида склероцийлар зич ўралган гифалардан иборат мицелий тўпланмалари ҳосил қилиб, улар захира моддаларга бой ва замбуруғнинг ноқулай шароитларда сақланишига хизмат қилади. улар жигарранг ва кора рангда бўлиб, кўз билан кўрса бўлади. *Botrytis* дарахтга ўхшаб шохланган конидий ташувчиларга эга бўлиб, уларнинг учларида қиска, конидий шингилларига эга зич жойлашган стеригмалар бор (5.11. расм). Конидийлар- эллипссимон, баъзида шарсимон, рангсиз. *Botrytis cinerea* (грекча botrytis – шингиль, cinerea – кулранг) олма, нок ва бошқа мевалар касалликларини келтириб чиқаради. Касалланган мевалар юзаси пахмок кулранг парда билан қопланади, ўсимлик тўқимаси қўнғир рангга киради, замбуруғнинг фаол пектиназалари таъсирида юмшаб қолади.

Trichothecium тури ёйилувчи мицелийга эга, субстрат юзасида конидий ташувчилар ва конидий ташувчилардан иборат унсимон парда ҳосил бўлади. Конидий ташувчилар тўғри, тўсиқлари кам. Конидийлар чўзик, конидий ташувчилар тепасида биттадан ҳосил бўлади ёки тез парчаланиб кетадиган бошчани ҳосил қилади (5.12 расм). *Trichothecium roseum* сариқ-пушти рангдаги пахмок колониялар ҳосил қилади.



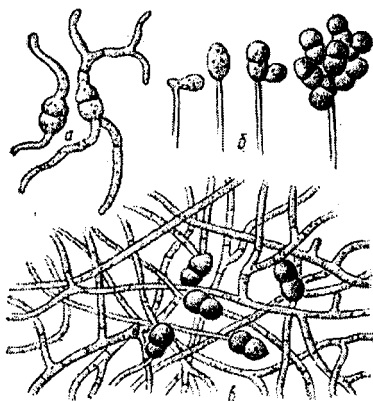
5.10-расм. *Fusarium avenaceum*

Рис. 5.11. *Botrytis cinerea*

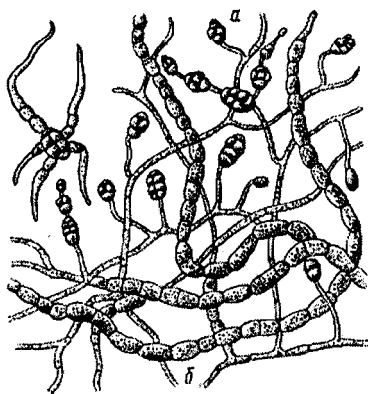
а – макроконидийлар, *б*-мицелий

а-конидийлар, *б*-конидий ташувчилар

Alternaria тури (5.13 расм). Аввал яшил зайтун, кейин жигарранг-қора рангдаги тўрсимон колониялар ҳосил қилади. Мицелийдан қисқа конидий ташувчилар тарқали, уларда ноксимон ёки учли қўп ҳужайрали конидийлар жойлашган. Замбуруғ колония остидаги субстратни қора рангга бўёвчи пигмент ажратади. Ушбу турдаги замбуруғлар сариёғ ва пишлокда қўпайиб, уларни юзасида қора доғлар ҳосил қилади. Бу турнинг қўп намоёндалари ўсимликларда альтернариоз (қора чириш) касаллигини келтириб чиқаради.



5.12-расм. *Trichothecium roseum* а-конидийларнинг ривожланиши, б-конидий ташувчилар: в-конидийли мицелий

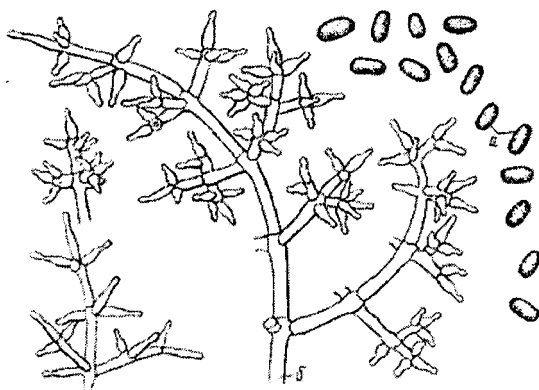


5.13-расм. *Alternaria radicina* а-конидийлар: б-мицелий

Trichoderma тури (5.14 расм). Моғор бўлинган юзали колониялар кўринишида ўсади. Мицелий судралувчи, рангсиз, ёши катталашиши билан тўқ яшил рангга киради. Конидий ташувчилар шохланган, мицелий устида

кўтарилган. Уларнинг учларида учли стеригмалар жойлашади. Стеригмаларда конидийларнинг бошчалари бўлиб, ҳар бирида 20 та дона бўлади. *Trichoderma lignorum* зумрад яшил рангга эга. Конидий ташувчилар мицелийда ёндош шохлар бўлиб, ўсиб чиқади.

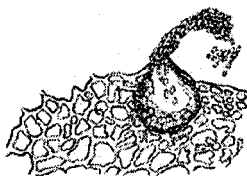
Phoma* тури (5,15 расм).** Субстрат юзасида аввал оқ тўрсимон мицелий ҳосил қилиб, кейин у тўқ рангга киради ва унда пикнидийларнинг қора доғлари ҳосил бўлади. Шарсимон пикнидалар субстратга ботган, кичикроқ думалок тешиги бор. Пикнида қобиғи тўқ жигарранг, деярли қора. Конидий ташувчилар шохланмаган, конидийлар овал ёки тухумсимон. ***Phoma илдиз мевалар касаллиги *фомозни* келтириб чиқаради. Масалан, *Phoma betae* лавлаги ичининг чиришини, *Phoma rostrupii* сабзининг фомоз чиришини келтириб чиқаради. Баъзида *Phoma* сарийғ бўлаги ичида қора доғлар кўринишида учрайди.



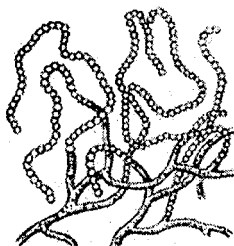
5.14- расм *Trichoderma lignorum*; а – конидийлар; б – конидий ташувчи.

***Catenularia* тури (5.16 расм).** Майда, секин ўсувчи жигарранг шоколад рангидаги колониялар ҳосил қилади. Конидийлар ялтироқ, сариқ-жигарранг бўлиб, енгил мицелийнинг учларидаги гифалардан узун занжирлар кўринишида

тарқалган. *Catenularia fuliginea* кўпинча шакарли қуйилтирилган сутда шоколад рангидаги тўпланмалар ёки “тугмачалар” ҳосил қилади.



5.15 расм *Phoma betae*



5.16 расм *Catenularia fuliginea*

Monilia тури. Бу тур ачитқилардан мицелиал замбуруғларга ўтувчи тур ҳисобланади. Аввал колониялар ачитки колонияларига ўхшаш бўлиб, кейинроқ хужайралар узаяди ва енгил иплар тарқалувчи ҳақиқий мицелий ҳосил қилади. Мицелий эндоген, зич дасталар кўринишида юзага чиқади. *Monilia* турининг кўп намоёндалари уруғли ва данакли ўсимликларни зарарлантиради. *Monilia fructigena* олма, нок, беҳи ва бошқа дарахтлар меваларини чиритади. *Monilia cinerea* олча, олхўрида ривожланиб, кулранг чиритишни келтириб чиқаради.

Monilia nigra қаттиқ пишлоқлар устида ичига кириб кетувчи кора доғлар ҳосил қилади. *Monilia roseum* сариёғ устида кўпайиб, пушти доғлар ҳосил қилади.

Назорат саволлари.

1. Қуйи замбуруғлар юқори замбуруғлардан қандай белгиларига кўра фарқланади?
2. Юқори ва қуйи замбуруғлар синфларини айтинг.
3. Қуйи замбуруғлар намоёндалоарини айтинг.
4. Аскомицетлар синфи замбуруғлари намоёндаларини айтинг.
5. Базидиомицетлар синфи замбуруғлари намоёндаларини айтинг.
6. Дейтеромицетлар синфи замбуруғлари намоёндаларини айтинг.

7. Озиқ-овқат саноатида моғор замбуруғлари қандай аҳамиятга эга?

6. АЧИТҚИЛАР МОРФОЛОГИЯСИНИ ЎРГАНИШ

Ишдан мақсад: пиво пишириш ва нон ёпишда ишлатиладиган маданий ачитқилар морфологияси ва озиқ-овқат маҳсулотларининг айнишига сабаб бўладиган ёввойи ачитқилар билан танишиш.

Ачитқилар зукариотлар гуруҳига кириб, бир хужайрали микроскопик замбуруғлар ҳисобланади. Жинсий жараён характери ёки унинг йўқлигига қараб ачитқилар юқори замбуруғларнинг уч гуруҳига тегишли бўлиши мумкин: аскомицетлар, базидиомицетлар ва дейтеромицетлар.

Аскомицетлар (*Ascomycetes*) гуруҳига ачитқиларнинг учта гуруҳи киради: *Saccharomycetaceae*, *Schizosaccharomycetaceae* ва *Saccharomycodaceae*. Бу гуруҳнинг характерли белгилари жинсий спораларга ва аска (сумка) ларда иккита, тўртта ёки саккизта аскоспораларнинг бўлишидир.

Озиқ-овқат ва микробиологик ишлаб чиқаришда *Saccharomycodaceae* оиласига мансуб *Saccharomyces* туридаги ачитқилар ишлатилади. Сахоромицетлар спирт, вино, пиво, квас, нон, нон ачитқисини тайёрлашда қўлланилади. Пиво пиширишда *Saccharomyces cerevisiae*, нон пиширишда - *Saccharomyces cerevisiae* ва *Candida milleri* (аввал *Saccharomyces minor*) туридаги ачитқилар ишлатилади.

Saccharomycodaceae оиласига мансуб баъзи ачитқилар (*Nadsonia*, *Saenko* турлари) херес ва шампань виноларини ишлаб чиқаришда иштирок этадилар. Ачитқиларнинг бошқа барча турлари бегона (“ёввойи”) бўлиб, биотехнологик жараёни турли босқичларида контаминация қилинади.

Дейтеромицет (*Deuteromycetes*)лар гуруҳининг номукамал ачитқилари – булар маълум аскомицетлар ёки базидомицет замбуруғнинг анаморфлари ёки жинсий босқичи аниқланмаган ёки йўқ бўлган турлардир. Бу гуруҳда аскомицетлар аффинитет белгиларига эга *Candidaceae* оиласини ва икки оила – *Cryptococcaceae* (баллистоспораларни ҳосил қилмайди) ва базидомицет аффинитет белгиларига эга *Sporobolomycetaceae* (баллистоспораларни ҳосил

килади)ни ажратадилар. *Candida* ва *Trichosporon* туридаги ачитқилар псевдомицелий ҳосил қила оладилар.

6.1 Маданий ва ёввойи ачитқилар баъзи турларининг характеристикаси

Ачитқилар бир хужайрали эукариот микроорганизмлар бўлиб, куртакланиш, споралар ҳосил қилиш ва бинар бўлиниш орқали кўпаядилар. Озиқ-овқат саноатида ишлатиладиган ачитқилар ўлчами энига 3-6 мкм гача, бўйига 8-12 мкм бўлади.

Ачитқилар морфологиясини ўрганиш учун улар курук моддалари концентрацияси 8-10% бўлган солод суслосида ёки глюкоза пептон муҳитда 25-28°C ҳароратда 2-3 сутка давомида ўстирилади.

Турли хилдаги ачитқилар вегетатив хужайраларининг шакли хилма-хилдир. Ачитқи хужайраларининг шакли ва ўлчами уларнинг тури, ёши, озуқа муҳити, культивация усулига боғлиқ. Ачитқи хужайралари думалок, овал, тухумсимон, озгина цилиндрик, лимонсимон (апикулят) шаклга эга бўлиши мумкин. Номукакммал ачитқиларда хужайралар аниқрок шаклга эга: стрелкасимон (*Brettanomyces* тури), учбурчак (*Trigonopsis* тури), ўроксимон (*Selenotila* тури), колбасимон (*Schizoblastosporion* тури).

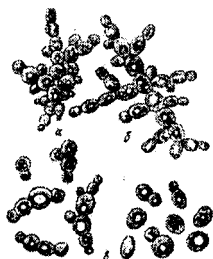
Candida ва *Trichosporon* туридаги ачитқиларда думалок ва овал хужайралар билан бир қаторда препаратларда псевдомицелийнинг узун хужайралари ҳам учрайди.

Маданий ачитқилар

***Saccharomyces cerevisiae* тури (6.1 расм)**

Морфологик белгилар. Ушбу турдаги ачитқиларнинг хужайралари (5-6)х(9х14)мкм ўлчамга эга бўлиб, овал, думалок, тухумсимон ва бироз узунчок шаклдадир. Ачитқи хужайрасининг цитологик хусусиятлари унинг ёшига қараб сезиларли ўзгариши мумкин. Янги ёш хужайра унинг ўсиш жараёнида спорадан ривожланиши ёки вегетатив равишда куртакланишда ҳосил бўлиши мумкин.

Ачиткиларнинг ёш актив хужайралари (12-18 соатли намуна) микроскопда кўрилганда юпка шаффоф кобик ва соф гомоген цитоплазма, катта бўлмаган вакуолига эга. Баъзида цитоплазмада 1-2 дона полифосфатлар учрайди. Ёш ачиткилар интенсиив равишда кўпаяди. Бунда куртакланувчи хужайраларнинг улуши 70-80%ни ташкил қилиши мумкин.



6.1 расм. *Saccharomyces cerevisiae* туридаги ачиткилар, а-ёш хужайралар, б-етилган хужайралар, в-қари хужайралар

Е т и л г а н ачиткилар (24-48 соатли намуна) дона-дона уруғли бир жинсли бўлмаган ёки гетероген цитоплазмага эга. Вакуолига эга хужайралар сони кўпаяди, баъзида икки ва ундан ортиқ вакуолили хужайралар учрайди. Ачиткиларнинг кўпайиш жараёни секинлашади; куртакланаётган хужайраларнинг фоиз миқдори ўртача 10-15% ни ташкил этади. Хужайранинг ичида яримёпиқ диафрагмада махсус бўйашсиз кўринадиган ёғли кўшимчалар ҳосил бўлади. Етилган ачиткиларда 2-4% гача ўлик хужайралар учрайди. Улар тириклигида ачиткилар суспензиясини кўк метиленнинг эритмаси билан бўйаш услубида аниқланади. Кўк метилен цитоплазмага фақат ўлик хужайралар кобиклари орқали кириб боради. Бунинг натижасида улар ҳаворангга бўйлади. Тирик хужайралар эса рангсиз бўлиб қолади. Захирадаги моддалар – липидлар, гликоген улуши хужайра ўсиши билан кўпаяди. Ачиткиларнинг етилган намунасида хужайраларда гликогеннинг катта миқдори бўлиши ҳосил. У вакуолида резерв модда сифатида йиғилиб, хужайра қариши мобайнида сарфланади. Ачиткиларни углеводларга бой муҳитларда азрациясиз

культивация килишда гликогенли хужайраларнинг миқдори 65-70%ни ташкил этиб, бу ачиткиларни анча “семиз”лиги ва етилганлигидан дарак беради. Гликоген ачитки препаратлари тириклигида йод эритмаси билан бўйш усули билан аникланади. Гликоген билан бир қаторда етилган ачиткиларда яна бир резерв модда – метакроматин (вольютин) йиғилиб, бу ачиткиларнинг фиксация килинган препаратини кўк метилен билан бўйшда бинафша рангга киради.

Қ а р и ачиткилар (48 соат ва ундан ортиқ) микроскопда яхши кўринувчи қалинлашган қобикқа эга. Цитоплазма донна-донна уруғсимон, гетероген, вакулилар йирик, битта хужайрада бир нечта. Қари намуна популяциясида липидлари мавжуд бўлган хужайралар бор. Липидлар думалок ва ёруғликни кескин синдиради. Қари намунанинг ўзига хос белгиларидан бири унда ўлик хужайраларнинг кўп миқдорда бўлишидир.

Культивация шароитлари ўзгарганда муҳим цитологик ўзгаришлар вужудга келади: аэроб жараёнданр анаэроб жараёнга ўтишда, муҳит таркибининг ва моддалар концентрациясининг ўзгаришида, шунингдек кучли физиологик таъсирларда.

Аэроб шароитларда ачитки интенсив равишда кўпаяди. Хужайралар анча майда ва бир жинсли бўлиб, уларда митохондриялар актив бўлинади, уларнинг сони сезиларли даражада ортади.

Анаэроб бижғиш шароитларида митохондриялар бирлашадилар, хужайраларда кўпроқ гликоген йиғилади ва у йирик гранулалар кўринишида бўлади.

Культурал белгилар. Сусло – агардаги колониялар оқ, думалок шаклда, чегаралари текис ва маркази бўртган, силлиқ, хира – ялтирок юзали, диаметри 0,5-1,0 см гача. Суюқ солод суслосида ўстирилганида, бу турдаги ачиткилар сарик-оқ рангдаги чўкма ҳосил қилади.

Candida milleri тури (авваллари *Saccharomyces minor*). Бу турдаги ачиткилар жавдар хамир учун ҳосдир.

Морфологик белгилар. Хужайралар майда, думалок, диаметри 1,5-3,0 мкм, ўзига хос куртакланишга эга: куртаклар хужайранинг бир учида жойлашган. Ачиткиларни суюқ мухитда ўстиришда хужайранинг иккала учида куртаклар ҳосил бўлади ёки бир учида иккитадан куртак ҳосил бўлади.

Қўлтурал белгилар. Сусло – агарда майда кулранг – оқ чегаралари текис, маркази кўтарилган, 0,4-0,8 см диаметрга эга. Колониялар юзси силлик, ялтирок. Солод суслосида силкитганда осон сочиладиган кулранг-оқ чўкма ҳосил бўлади.

Озиқ-овқат маҳсулотларининг айланишига сабаб бўлувчи ачиткилар

Биотехнологик жараёнда маданий ачиткилар билан бир қаторда “ёввойи” ачиткилар деб аталувчи ачиткилар ҳам учрайди. Улар ҳам маданий ачиткилар каби субстрат озуқа моддалари учун курашиб, тайёр маҳсулотнинг айланиши ёки органолептик кўрсаткичларнинг ёмонлашишига сабаб бўлиши мумкин. Кўпинча “ёввойи” ачиткилар орасида ачиткилари ва *Saccharomyces*, *Kloeccera*, *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Rhodotorula* бошқалар учрайди.

Saccharomyces pastorianus тури (6.2, а расм) – хужайралар эллипсимон ёки цилиндрик, кам ҳолларда овал шаклда. Пивонинг асосий бижғишида маданий ачиткилар билан биргаликда чўкинди ҳосил қилмайди, улар кўпайганда пиво хиралашади, ранги очариши кийин бўлади, ёкимсиз хид чиқаради, мазаси нордон бўлиб қолади.

Saccharomyces turbidans тури (6.2, б расм) – хужайралар овал ёки эллипс шаклида, кўпинча 4-5 та хужайрдан иборат занжирларга бирлашади. Пивода кучли хираликка, мазанинг бузилишига сабаб бўлади.

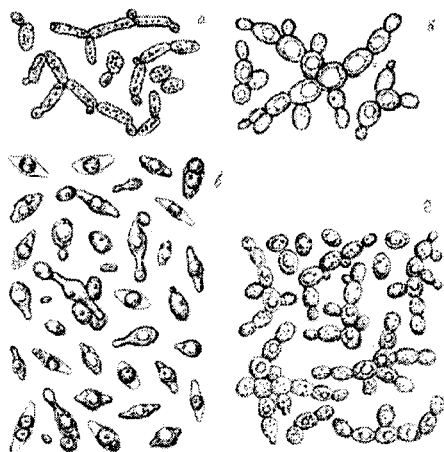
Kloeccera apiculata тури (6.2, в расм) – хужайралар майда, лимонсимон, 1 ёки 2 та кутби учли, алохида-алохида, баъзида жуфт бўлиб жойлашадилар. Қариш мобайнида чўзилган чарх кўринишини оладилар. Хужайраларнинг ўлчами (5-8)х(2-4) мкм. Пивода ривожланганда учувчи кислоталар, эфирлар, водород сульфид йиғилиб, у маҳсулотларга ёмон хид беради.

Saccharomyces bayanus тури (6.2, г расм) – хужайралар йирик, овал шаклда. Пиво, сидр, вино материалларида учрайди. Улар тайёр махсулотга эфирлар, диацетил, уксус кислотаси, олтингугурт мавжуд учувчи кислоталар ҳосил бўлиши натижасида ёмон маза ва бадбўй хид беради.

Saccharomyces validus тури (6.2, д расм) – хужайралар овал ёки жуда чўзилган, жуфт ёки кичик тўплар бўлиб жойлашади. Пивонинг хиралашишига ёмон хидга эга бўлиши сабаб бўлади.

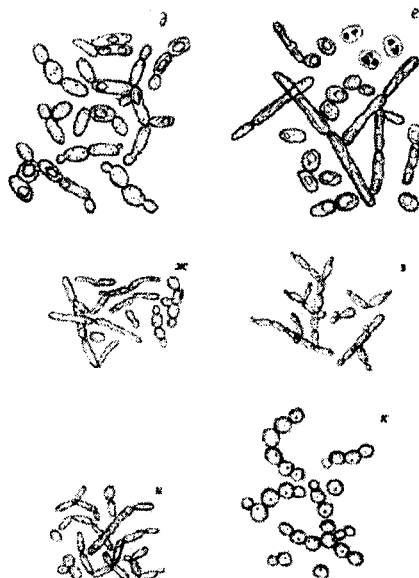
Hansenula anomalia тури(6.2, е расм) – хужайралар думалоқ,эллипсимон, баъзида колбасасимон ёки гурзисимон. *Hansenula* туридаги ачитқилар спиртлар ва эфирларнинг катта микдорини ҳосил қилиб, пивога ўткир хид беради. Маданий ачитқиларнинг ривожланишини тўхтатади.

Pichia farinosa (рис. 6.2, ж) хужайралар думалок, овал, якка ёки жуфт бўлиб бирлашган. Хужайраларнинг ўлчами (4,0-7,5)х(3-6) мкм. Бу турдаги ачитқилар, шунингдек *P. Membranifaciens* пиво юзасида оқ парда ҳосил қилади. Пивога альдегидлар, эфирлар, учувчи кислоталар йиғади. Улар ўз навбатида унга мева ёки дориларнинг мазасини беради. Пиво қуйилаётганида ҳаво кириши натижасида кўпайиб, унинг хиралашишига сабабчи бўлади.



6.2-расм (а-з) Ёввойи ачитқиларнинг баъзи намоёндалари (Т.П. Слюсаренко, 1984). а – *Saccharomyces pastorianus*; б – *Saccharomyces turbidans*; в – *Kloeckera apiculata*; з – *Saccharomyces bayanus*

Brettanomyces bruxellensis тури (6.2, з расм) – ҳужайралар турли шаклга эга: овал, жуда чўзилган, таёқчасимон, баъзида ўткир учли. *B. Brettanomyces bruxellensis* суслو ва пивони контаминация этадилар. Бу ачитқиларнинг ривожланиши пивода бегона мева ҳидлари ва хиралашиш пайдо бўлиши билан кечади. Бошқа турлар (*B. anomalus*, *B. Intermedius*) пастеризация қилинган пивони айнитиб, унга ёмон ҳид беради.



6.2-расм (д-к) Ёввойи ачитқиларнинг баъзи намоёндалари (Т.П. Слюсаренко, 1984): д – *Saccharomyces validus*; е – *Hansenula anomalia*; ж – *Pichia farinose*; з – *Brettanomyces bruxellensis*; и – *Candida mycoderma*; к – *Torulopsis colliculosa*

Candida тури. Бу турнинг асосий намоёндалари – *C. Mycoderma* (6.2, и расм), *C. utilis*, *C. krusei*, *C. Guillermondii* – овал ёки узайган цилиндрик

кўринишга эга. Хужайраларнинг ўлчами (4-16)х(2-5) мкм. Бу турдаги ачиткилар споралар ҳосил қилмайди ва аспороген бўлади. Бу турнинг кўп намоёндалари вино, пиво, нон ачитқисини тайёрлашда зарарқунанда бўлиб ҳисобланади. Сусло ёки пивонинг юзасида кўпинча оқ ва кулранг қуруқ парда ҳосил қиладилар. Пивонинг хиралашиши, ёмон таъм ва ҳидга эга бўлишига сабаби бўлади.

Нон ачитқиси тайёрлаш жараёнида *Candida* туридаги ачиткилар маданий ачиткилар билан бир қаторда субстратнинг озучавий моддалари учун курашадилар, тайёр ачиткиларнинг мальтоз фаоллигини камайтирадилар.

Torulopsis тури. Торулопсис туридаги ачитки хужайралари майда, думалоқ ёки овал, ўлчамлари (5–8)х(2–5). Бу турдаги ачиткилар кўпинча кефир замбуруғларидан олинади (*Torulopsis kefir*). *Torulopsis colliculosa* турдаги (6.2, к расм) ачиткилар пиво ва ачитки ишлаб чиқаришда зарарқунанда ҳисобланади.

Rhodotorula roseum тури – хужайралар думалоқ ёки овал, якка, жуфт-жуфт, псевдомицелий ҳосил қилмайдилар.ларнинг ўлчами (5–8)х(2,5–5,0) мкм. Озуқа агарида *R. roseum* пушти рангдаги ялтироқ думалоқ колонияларни ҳосил қилади. Кўпайиш жараёнида озиқ-овқат маҳсулотларининг юзасида пигментация ҳосил бўлишига сабаби бўлади.

6.2 Ачиткилар суспензияси таркибида мавжуд бўлган ўлик ва куртакланаётган хужайраларни аниқлаш

Ушбу ачиткиларнинг морфологик ҳолати микроскопда кўриш орқали аниқланади. Бу мақсадда куртакланаётган ва ўлик хужайраларни санаш амалга оширилди.

Ўлик хужайралар микдорини аниқлаш. Ўлик хужайраларнинг микдори – пиво ва нон ачитқилари сифатининг муҳим кўрсаткичидир. Яхши сифатли ачиткиларда ўлик хужайралар микдори 5%дан ортиқ бўлмаслиги керак. Ўлик хужайралар микдорининг ошиши ачиткилар кўпайиши

жараёнидаги нохуш факторлардан дарак беради. Ўлик хужайраларнинг кўп миқдорда бўлиши технологик жараёнинг бузилишига сабабчи бўлади: секин бижғиш, бегона микроорганизмларнинг кўпайиши.

Бўялмаган озуқа мухитларида культивация қилинувчи ачиткиларнинг ўлик хужайралари миқдорини аниқлашда уларни кўк метилен билан бўяш қулай. Бунинг учун бўёқнинг дистилланган сувдаги эритмаси 1:10000 миқдорда тайёрланади. Препарат қуйидагича тайёрланади: предмет шишасига текширилувчи намунадан 1 томчи томизилади ва қопловчи шиша билан ёпилади. Қопловчи шишага 1 томчи иммерсион мой суртилиб, 90х марта катталаштириб, микроскопда кўрилади. Ўлик хужайралар ҳаво рангга бўялиб, тириклари рангсиз бўлиб қолади. Тайёрланган препаратнинг 10 та кўриш майдонида ўлик хужайралар сони ҳисобланади (В).

Куртакланаётган хужайралар миқдорини аниқлаш. Предмет шишасига текширилаяётган ачитки суспензиясидан бир томчи томизилиб, унга кўк метилен қўшилади. Сўнг аралаштириб, қопловчи шиша билан ёпилади. 60х ёки 90х объектив орқали кўрилади. Препаратнинг кўриш майдонидаги умумий сон 30-40 дан ошмаслиги лозим. Ҳар бир кўриш майдонида куртакланувчи хужайралар сони (С) ва хужайраларнинг умумий сони (А) ҳисобланади. Куртак деб катталиги она хужайра катталигининг $\frac{1}{2}$ қисмидан кичик хужайрага айтилади. Ўлчами она хужайра ўлчамининг $\frac{1}{3}$ қисмидан кам бўлган куртакли хужайрани битта хужайра деб ҳисобланади. Ачиткиларнинг фаол кўпайиш жараёнида куртакланаётган хужайралар сони 50% дан ортади. Куртакланаётган хужайраларнинг кам бўлиши ачитки кўпайиши фаоллигининг пастлигидан дарак беради. Хужайраларнинг умумий миқдори ва куртакланаётган хужайралар сонини ҳисоблаш камида 10 та кўриш майдонида амалга оширилади.

Тажриба натижалари 6.1-жадвалга киритилиб, текширилаяётган ачитки суспензиясидаги ўлик ва куртакланаётган хужайралар миқдори аниқланади.

Хужайралар	Кўриш майдонлари	А,В,С
------------	------------------	-------

сони											ларнинг ўртача арифметик қиймати
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
А-умумий											
В-ўлик											
С- куртакланаётган											

Текширилаётган ачитки суспензиясидаги ўлик ҳужайралар сони:

$$X = B/A \cdot 100, \%$$

Текширилаётган ачитки суспензиясидаги куртакланаётган ҳужайралар сони:

$$Y = C/A \cdot 100, \%$$

6.3 Ачитқини ҳужайралари таркибида мавжуд бўлган захирадаги озуқа моддаларининг бўялиши

Гликогенни бўйаш. Ёш ачитқилар намуналарида захирадаги озуқа моддаси – гликоген катта микдорда йиғилиб қолади. Нормал “семиз” ачитқиларда 70% дан 75% гача ҳужайралар таркибида гликоген мавжуд бўлади. Саноатдаги ачитқилар таркибида гликогенли ҳужайраларнинг кам бўлиши ачитқини ҳужайраларининг қариллиги ёки уларга озикланиш етишмовчилигидан дарак беради.

Гликогенни аниқлаш учун предмет шишасига пипетка билан ачитқини суспензиясидан бир томчи томизилади, озроқ йод эритмаси қўшилади. Суспензия қопловчи шиша билан ёпилади, унга бир томчи кедр мойи

суртилади ва препарат иммерсион объектив орқали кўрилади. Гликоген кизил-кўнгир рангга бўялади, ачитқи хужайралари рангсиз бўлади.

Липидларни бўяш. Ачитқиларнинг қари намуналарида кўпинча липидларнинг катта миқдори тўпланиб қолади. Сахаромицет ачитқиларида липидлар синтези углеводли озуканинг кўплигида, интенсив аэрацияда ва озук муҳитида азот йўқлиги шароитида мавжуд бўлиши мумкин. Липидлар, шунингдек, муҳитда ингибиторлар мавжуд бўлганида синтезланади.

1-усул. Липидларни бўяш учун предмет шишасига пипетка билан ачитқи суспензиясидан бир томчи суртилади, унга бир томчи Судан III бўёғининг спиртли эритмасидан суртилади ва қопловчи шиша билан ёпилади. Шишанинг устига таёкча билан кедр мойи суртилади ва 90х объектив орқали микроскопда кўрилади. Мой томчилари сариқ рангда, ачитқи хужайралари рангсиз бўлади.

2-усул. Предмет шишасига 40% ли формалин эритмасининг кичик томчиси суртилади. Сиртмоқ билан томчига ачитқи намунаси киритилади. Формалин хужайраларни ўлдиради ва кобикни ўтувчанроқ қилиб қўяди. 5 дақиқадан сўнг кўк метилен, яна 10 дақиқадан сўнг Судан III дан бир томчи кўшилади. Препарат қопловчи шиша билан ёпилади. Ортиқча суюқлик филтёр коғози билан олиб ташланади ва иммерсион объектив орқали кўрилади. Цитоплазма кўк рангга, мой томчилари пушти-зарғалдоқ рангга бўялади.

Полифосфатларни Леффлер усулида бўяш. Полифосфатлар кўпинча метакроматин уруғлари ёки волютин уруғлари деб аталади. Полифосфатларни аниқлаш учун ачитқиларнинг фиксацияланган препарати тайёрланиб, у кўк метиленга бўялади. Вакуолиларда полифосфатлар кизил-бинафша рангга бўялади. Ачитқи хужайраларининг цитоплазмаси ҳаво рангга киради.

6.4 Ачитқиларда спораларнинг ҳосил бўлиши

Ноқулай шароитларда аскоспороген ачитқилар аскоспораларни ҳосил қилиши мумкин. Споралар ҳосил бўлиши учун маълум шароитлар мавжуд бўлиши керак:

- Намунанинг ёш бўлиши (1-2 сутка давомида тўйинтирилган мухитда ўстириш);
- Оч мухитларга (Городкова мухити) фаол ривожланувчи ачиткиларни экиш;
- Оч мухитларда оптимал ҳарорат (20-25 °C)дан паст ҳароратда 2-4 ҳафта давомида инкубация қилиб, ҳар ҳафта микроскопда кўриш.

Ачитки ҳужайрасида ёки аскада биттадан саккизтагача аскоспоралар ҳосил бўлади.

Ачитки спораларини бўйаш. Спораларни бўйаш учун *Saccharomyces cerevisiae* турдаги ачиткиларнинг олдиндан Городкова мухитида 2 ҳафта мобайнида ўстирилган намуналари олинади. Фиксацияланган препарат тайёрланади, унга Циль карбол фуксини қуйилади ва 2-3 дақиқа давомида буг ҳосил бўлгунича спиртовка оловида қиздирилади. Кейин препаратни 2% ли сут кислотаси ёки 1% ли концентрацияланган сульфат кислотаси бор 95% ли этанолга солиб, рангсизлантирилади. Препарат сув билан ювилади ва 3-5 дақиқа давомида кўк метиленининг 1% ли эритмасида қайта бўйялади, кейин яна сув билан ювиб, филтр қоғозда қуритилади. Препаратга иммерсион мой суртилади ва 90х объектив орқали кўрилади.

Етилган аскоспоралар қизил рангга, вегетатив ҳужайралар кўк рангга бўйялади.

Аскоспораларни ҳосил қилувчи *Городкова мухитининг* таркиби қуйидагича: 1 литр водопровод сувида (грамм): пептон-10, натрий хлор-5,0; глюкоза-1,0; агар-50. Мухитнинг рНни 7,3 қилиб ўрнатилади ва 0,1 МПа босим остида 15 дақиқа стерилланади.

Назорат саволлари

1. Ачиткиларнинг қандай турлри пиво, вино, нон ишлаб чиқаришда қўлланилади?

2. Ачитқиларнинг қандай турлари пиво ишлаб чиқаришда зараркунанда ҳисобланади?
3. Ёш, қари ва ўлик ачитқи хужайраларнинг қандай морфологик белгилари бор?
4. Ачитқи хужайралари цитоплазмасида захирадаги қандай озуқа моддалари мавжуд? Уларни қандай қилиб аниқласа бўлади?
5. Қандай шароитларда ачитқилар спораларни ҳосил қиладилар?

7. БАКТЕРИЯЛАР МОРФОЛОГИЯСИНИ ЎРГАНИШ

Ишдан мақсад: бактериялар морфологияси билан танишиш.

Бактериялар турини аниклаш (идентификация қилиш)да кўп белгилар, шунингдек, морфологик (грекча *morphus* – шакл) белгилар йиғиндисидан фойдаланилади. Уларга хужайраларнинг шакли ва ўлчами, Грам усули бўйича бўйш, ҳаракатчанлик (хивчинларнинг бўлиши ёки йўқлиги), эндоспора ва капсулаларни ҳосил қилиш қобилияти киради.

7.1. Бактерия шакллари

Ташқи кўринишига қараб бактерияларнинг 3та асосий шакли ажратилади: шарсимон (кокклар), таёқчасимон (цилиндрик) ва буралган (7.1-расм). Бактерияларнинг буралган шакллари ичида юқумли касалликларни кўзгатувчилари учрайди. Шунинг учун улар тиббий микробиологиянинг ўрганиш объектларига киради.

Шарсимон бактериялар тўғри шар кўринишига эга. Лекин уларнинг баъзилари шаклига кўра шам, ланцет, ловия, кофе уруғини эслатади. Хужайраларнинг жойлашишига кўра (бўлинишдан кейин) кокклар қуйидагиларга бўлинади:

Микрококклар (грекча *micros* – кичик) – якка ёки тартибсиз жойлашган хужайралар.

Диплококклар (грекча *diplos* – иккиланган) – жуфт-жуфт бўлиб жойлашади. Чунки хужайралар бўлинганидан кейин тарқалиб кетмайди (лактококклар).

Стрептококклар (грекча *streptos* – буралган, ўрилган) – думалок ёки чўзилган шаклда бўлиб, улар хужайраларнинг бўлиниши натижасида бир текисликда занжир ҳосил қилади ва орасидаги боғларни сақлайди.

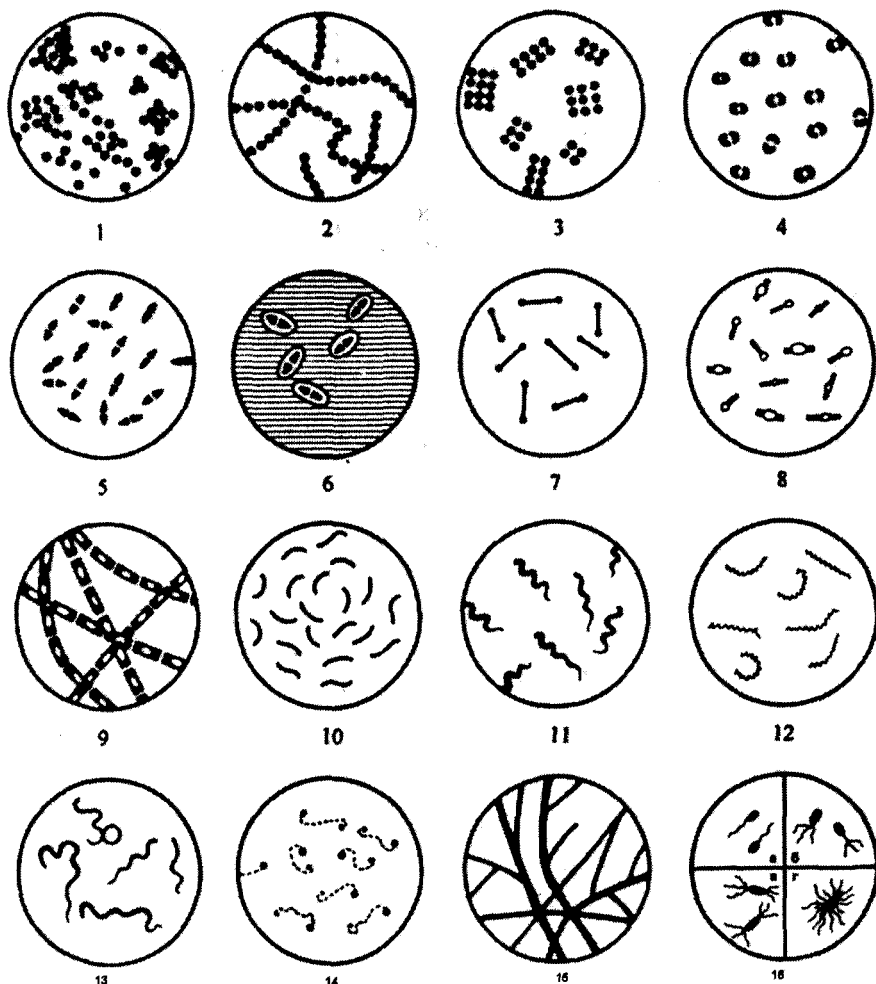
Тетракокклар (грекча *tetra* – тўрт) – тўртта коккнинг ўзаро бирикиши

Сарцинлар (грекча *sarcino* – бирлаштираман) – бўлиниш натижасида пайдо бўлган 8 та ёки ундан ортиқ ҳужайраларнинг 3 та ўзаро перпендикуляр текисликда жойлашувчи кокklar тўплами

Стафилококklar (грекча *staphyle* – узум шодаси) – турли текисликларда бўлиниш натижасида ҳужайраларнинг узум шодасига ўхшаб йиғилиши.

Гонококklar (гонореянинг қўзғатувчилари) кофе уруғи шаклига эга бўлиб, жуфт ва бир-бирига ботиқ томонлари билан қараган.

Пневмококк ва менингококklar – шаклига кўра шам шуласини эслатади ва жуфт-жуфт бўлиб кенг асослари билан ичкарига қараб жойлашган.



7.1-расм. Бактерияларнинг асосий шакллари (Воробьев ва бошқ., 1994):

1 – стафилококklar; 2 – стрептококklar; 3 – сарцина; 4 – гонококklar; 5 – пневмококklar; 6 – пневмококklar капсуласи; 7 – дифтериянинг коринебактериялари; 8 – клостридиялар; 9 – бациллалар; 10 – вибрионлар; 11 – спириллалар; 12 – трепонемалар; 13 – боррелиялар; 14 – лептоспиралар; 15 –

актиномицетлар; 16 – хивчинларнинг жойлашиши: а – монотрихлар; б – лофотрихлар; в – амфитрихлар; г – перитрихлар

Таёқчасимон бактериялар турли узунлик ва диаметрға, цилиндрик шаклга эга, хужайра учларининг шакли ва хужайраларнинг ўзаро жойлашишига кўра фарқланади. Таёқчаларнинг учлари кесилган (ўлат таёқчаси), учли (фузобактериялар), думалок (ичак таёқчаси), учлари кенгайган (дифтериянинг коринбактериялари).

Таёқчалар якка-якка, жуфт, занжир, панжара, розетка бўлиб жойлашиши муккин. Таёқчасимон бактериялар ичида эндоспоралар ҳосил қилувчи бацилла 8 (лотинча *bacillus* – таёқча) ва клостридиялар (грекча *closter* – чарх), спора ҳосил қилмайдиган (псевдомонадалар, ичак таёқчалари, сальмонеллалар, протей таёқчалари ва бошқ.) учрайди.

Коринбактериялар турига тегишли дифтерия қўзғатувчилари уруғлар таёқчалар учларида полифосфатларнинг мавжудлиги билан характерланади. Шохсимон шаклларни ҳосил қилувчи таёқчалар микобактериялар турига киради (туберкулёз микобактериялари, актиномицетлар, бифидобактериялар).

Буралган бактериялар. Буралган шаклларга куйидаги бактериялар киради:

Вибрионлар (лотинча *vibrio* – эгилган) – вергуль белгисини эслатувчи бироз эгилган таёқчалар (вабо эмбриони);

Кампилобактерлар – хужайраларда чағалай қанотига ўхшаш эгилган қисмлари бор;

Спириллар – кам эгилган шакллар, 3-5 та букилишга эга;

Спирохеталар – кучли эгилган шакллар – кўп букилган жойларга эга ингичка, узун эгилган хужайралар. Спирохеталар ичида инсон учун патоген бўлган турлар учрайди. Булар лептоспира (*Leptospira*), трепонема (*Treponema*), бореллий (*Borrelia*) турларининг намоёндалари.

7.2 Бактерияларни Грам усулида бўйш

Бу белги бўйича барча бактериялар 2 гуруҳга ажратилади:

- Грам усулида бўялувчи – граммулусбат.
- Грам усулида бўялмайдиган – грамманфий.

Ушбу усул бактерияларнинг кимёвий таркиби ва бактерия хужайра деворларининг турличалигига асосланган.

Бактерияларни Грам усулида бўйш техникаси

1. Ёғсизлантирилган предмет шишасининг 3 жойига 3 томчи сув томизилади ва турли хил бактерияларнинг 3 та суртмаси тайёрланади: четларида назоратдаги бактериялар (Грамм усулида бўйашга бўлган реакциясини аввалдан билган ҳолда), марказда – текширилаётган намуна суртмаси.

2. Суртма қурилади ва спиртовка оловида фиксация қилинади.

3. Суртмаларни бир дақиқа давомида генцианвиолет билан бўялади (предмет шишасига бўёқ шимдирилган филтёр қоғоз бўлаги қўйилиб, сув билан ҳўлланади)

4. Бўёқли қоғозни олиб ташлаб, препаратни сув билан ювмай унга Люголь эритмаси суртилади. Бир дақиқа давомида ушланади (суртма бутунлай қорайиб кетгунича).

5. Препаратни сув билан ювмай 96%ли спирт эритмаси билан 15-20 секунд давомида ишлов берилади. Бунда предмет шишасини тўхтамасдан силкитиб туриш керак. Рангсизлантириш вақтини аниқ сақлаш лозим. Чунки узокрок вақт рангсизлантиришда граммулусбат бактерияларнинг ранги ҳам ўчиб кетиши мумкин.

6. Препарат сув билан ювилади, унга Пфейфер фуксини шимдирилган филтёр қоғоз бўлаги қўйилади. Сув билан ҳўлланилади ва бир дақиқа вақт давомида бўялади.

7. Бўёқли қоғоз олиб ташланади. Препарат сув билан ювилади, филтёр қоғоз билан қурилади.

8. Препаратга кедр мойи суртилади ва иммерсион объектив орқали кўрилади.

Бундай ишловдан сўнг граммусбат бактериялар бинафша рангга, грамманфийлари кизил рангга бўялади.

Граммусбатлар микрококklar, стептококklar, стафилококklar, бациллалар, клостридиялар, сут бактерияларидаир. Грамманфийларига эса ичак таёкчалари, сальмонеллалар, бруцеллалар, дизентерия, вабо, уксус бактериялари, псевдомонадалар ва бошқалар киради.

7.3 Бактериялар Ҳаракатчанлигини аниқлаш

Бактерияларнинг кўпида хивчинларнинг бўлгани сабабли улар мустақил ҳаракат қила олиш қобилиятига эгадирлар. Хивчинларнинг жойлашиши ва уларнинг микдори бактериялар турини аниқлашда асосий диагностик белгилардан ҳисобланади.

Бактериялар ҳаракатчанлигини аниқлаш учун “осилган томчи” ва “эзилган томчи” препаратлари тайёрланади. Бунда бактерияларнинг ёш (1 суткали) бульон намуналари ишлатилади. Микроскоп орқали кузатишда кўриш майдонида алоҳида бактерияларнинг турли йўналишларида ва турли тезликдаги актив ҳаракатлари кўринади.

7.4 Бактериялар спораларини бўйаш

Ўзининг тузилиши туфайли бактерия споралари ташки муҳитнинг нобот тахсирларига нисбатан юқори чидамлилиқка эга. Препаратни кўк метилен билан бўйашда споралар бўялмай, рангсиз, думалоқ, овал ва эллипссимон таначалар бўлиб кўринади ва ёруғликни яхши синдиради. Бу споралар қобиғи юқори зичлиқка эга эканлиги, липидларнинг кўп бўлиши ва споранинг ўзида эркин сувнинг йўқлиги билан тушунтирилади. Спораларни бўйаш усуллари қуйдирувчи моддалар (кўпинча спора қобиғини бўшаштирувчи кислоталар)ни ишлатишга ва кейинчалик қиздирилишда суртманинг ранги ўзгаришига

асосланган. Споранинг ранг кирган протопласти бўёкни ҳужайра цитоплазмасига нисбатан кўпроқ ушлайди. Шунинг учун у цитоплазмадан фарқли ўлароқ кейинчалик кислота билан ишлов берилганида рангини йўқотмайди. Рангсилантирилган цитоплазма қўшимча равишда контраст бўёк билан бўялади.

Циль-Нильсен усули

1. Бактерияларнинг фиксацияланган препарати оддий усул билан тайёрланади.

2. Препаратга хром кислотасининг 5% ли эритмаси суртилади ва 5-10 дақиқа ушланади.

3. Кислота сув билан ювиб ташланади, препаратга бир бўлак филтр қоғози қўйилиб, у карбол фуксини балан яхшилаб ҳўлланади. Препарат спиртовка оловида буғ пайдо бўлгунича киздирилади (қайнашгача олиб борилмайди). Бу жараён 5-7 дақиқа мобайнида давом эттирилади. Бўёк буғланиб кетмаслиги ва қоғоз қуриб қолмаслиги муҳим.

4. Предмет шишаси совуганидан сўнг қоғоз олинади, препарат сув билан ювилади ва сульфат ёки хлорид кислота билан 15-30 секунд давомида ишлов берилади. Споралар ҳосил қилувчи *B. subtilis*, *B. mycoides* ёки *B. Mesentericus* таёкчалари препаратини тайёрлашда ҳужайралар цитоплазмасини 16-18 секунд давомида рангсизлантириш тавсия этилади.

5. Препарат кўк метилен билан 1-2 дақиқа давомида бўялиб, кейин бўёк ювилади, препарат филтр қоғоз билан қуририлиб, иммерсион объектив орқали қўрилади.

Препаратга бундай ишлов беришда споралар қизил рангга, вегетатив ҳужайралар кўк рангга бўялади.

Пешков усули

1. Тайёр фиксацияланган препаратга Леффлер кўк метилени қуйилади. Бунда шиша олов устида ушлаб турилади. Бўёқнинг қуриб қолишига йўл қўймасдан 15-20 секунд давомида қайнатилади

2. Суртма сув билан ювилади ва нейтрал қизилнинг 0,5% ли эритмаси билан 30 секунд давомида бўялади

3. Препарат ювилади, қуритилади ва иммерсион объектив орқали кўрилади.

Бўяшнинг бу усулида споралар ҳаворанг ёки кўк рангга, хужайра цитоплазмаси пушти рангга бўялади.

Бактерияларни идентификацияси учун споралар ҳосил қилиш турини (бацилляр, клостридиал ёки плектридиал), эндоспоранинг хужайрада жойлашишини (қутбли, марказий, эксцентрал) аниқлаш лозим. Бу мақсадда споралар ҳосил қилувчи бактерияларнинг 2 ёки 3 суткалик намуналари ишлатилади.

7.5 Бактериялардаги капсулаларни аниқлаш

Баъзи бир микроорганизмлар, айниқса углеводларга бой муҳитда ўсганида капсулалар ҳосил қилади. Капсулаларнинг мавжудлиги бактерияларни идентификация қилишда диагностик белги ҳисобланади. Бўяшнинг оддий усулларида капсулалар рангсизлигича қолади. Капсулаларни аниқлаш учун бўяшнинг махсус усули қўлланилади.

Капсулаларни Гинс-Бурри усулида бўйш. Суюқ қора тушъ дистилланган сув билан 1:10 миқдорда аралаштирилади. Бактериялар суспензиясининг бир томчиси предмет шишасида бир томчи тушли эритма билан яхшилаб аралаштирилиб, шиша юзасида юпка қатлам қилиб суртилади. Препарат ҳавода қуритилади ва иммерсион объектив орқали кўрилади. Препаратнинг тўқ фонида юбактериал хужайралар рангсиз капсулалар билан ўралган.

Назорат саволлари

1. Бактерия морфологиясини текшириш усулларида қайсиларини биласиз?

2. Бактерияларни Грам усулида бўяшнинг моҳияти ва техникаси қандай?

3. Бактериялар споралари қандай бўялади?
4. Бактериялар ҳаракатчанлигини қайси усуллар билан аниқласа бўлади?
5. Бактерияларда капсулаларни аниқлаш учун қандай усуллардан фойдаланилади?

8. БАКТЕРИЯЛАРНИНГ КУЛЬТУРАЛ ВА ФИЗИОЛОГИК – БИОКИМЁВИЙ БЕЛГИЛАРИНИ АНИҚЛАШ

Ишдан мақсад: турли озуқа муҳитларида ўстирилган бактерияларнинг культурал ва физиологик-биокимёвий белгиларини кўриш.

8.1 Бактерияларнинг культурал белгилари.

Бактерияларнинг культурал белгилари уларнинг турли ва зич озуқа муҳитларида ўсиш хусусиятларига қараб аниқланади. Микробларнинг ҳар қандай тури зич муҳитларда маълум ўлчамдаги ва шаклдаги колонияларни ҳосил қилади.

Колониялар ўлчами, шакли, профили, чегараларининг контури, юзаси, ранги, структураси ва концентрациясига қараб характерланади.

Колониялар *ўлчамли* унинг диаметри билан аниқланади. Диаметрига қараб нуктавий колониялар ажратилади: диаметри 1 мм дан кичик, майда-диаметри 1-2 мм, ўртача – 2 дан 9 мм гача, йирик – 10 мм ва ундан катта.

Колониялар шакли думалоқ, нотўғри, амёбасимон, розеткасимон, концентрик ва бошқача бўлиши мумкин (8.1-расм).

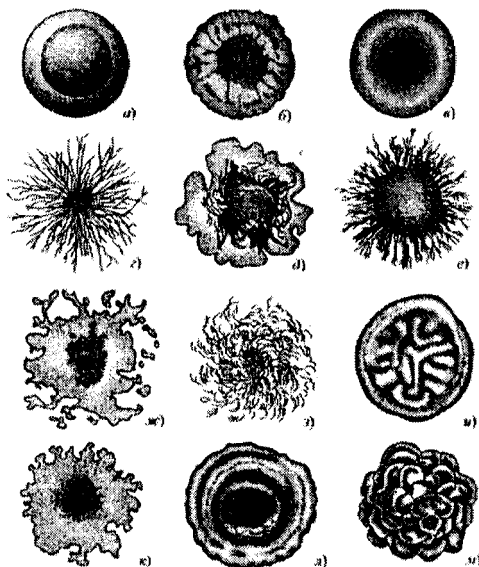
Колониянинг *профили* унинг озуқа муҳити устидан кўтарилганлиги ва вертикал кесимидаги контур шакли билан характерланади. Визуал ўрганишда колониянинг профили юқоридан ва ёндан аниқланади. Текис, кратерсимон, конуссимон, томчисимон колониялар фарқланади (8.2-расм).

Колониянинг *чегараси* уни лупа ёки микроскопда 8х катталаштириш орқали кўришда аниқланади. Колониялар четининг қуйидаги контурлари фарқланади: текис, тўлқинсимон, попукли, тишли, пистонли, ясси, *эшаксимон*, киприкчали, тукчали, шохли, ризонд ва бошқ.

Юза силлиқ ёки ғадир-будр, қуруқ ёки нам, эгатга ўхшаган, букланган, буришган, баркутга ўхшаган, дўнгалакли, концентрик айлана билан ёки радиал чизиклар чизилганда бўлиши мумкин.

Оптик хусусияти: шаффоф, яримшаффоф, ношаффоф, флуоросценцияланувчи.

Колония *ранги* микроорганизмнинг шу тури томонидан синтез қилувчи пигмент билан аниқланади. Ҳосил бўлувчи пигмент турига қараб микроорганизмлар колонияси кизил, пушти, сариқ, тилла-зарғалдоқ, сариқ-яшил, кўк, кора рангларга кириши мумкин.

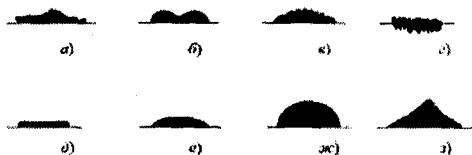


8.1-расм. Микроорганизм колониялар шакли: а-думалоқ, б-чети пистонли думалоқ; в-думалоқ, чети ёстиқчали; г,д-ризонд; е-думалоқ, чети ризонд; ж-амёбасимон; з-мицелиал; и-букланган; к-нотўғери; л-концентрик; м-мураккаб.

Колониялар *структураси* бир жинсли, майда ёки йирик уруғли, унсимон, пардали, агарга ўсиб кириб кетувчи бўлади.

Консистенция пастасимон – сиртмоқ билан осон олинувчи, қовушқоқ ёки шилимшиқ – сиртмоққа ёпишувчи ва чўзилувчи; зич; толасимон; хамирсимон; сметанасимон; курук, агар юзидан эластик парда кўринишида олинувчи; нозик – сиртмоқ билан текканда сочилиб кетувчи бўлиши мумкин.

Колониялар консистенциясини унинг юзасига сиртмоқ билан тегиб аниклаш мумкин:



8.2-расм. Микроорганизмлар колониясининг профили. а – *изогнутый*; б – *кратерсимон*; в – *бугристый*; г – *возрастающий в агар*; д – *ясси (текис) плоский*; е – *қабариқ*; ж – *томчисимон*; з – *конуссимон*

Микроорганизмларни *штрих* усули билан экишда ўсиш интенсивлиги (кўп, ўрта, паст), штрихнинг ўзига хослиги (чўзилган, шохли, дўнғалакли) юзанинг оптик хоссалари, ранги ва концентрацияси аниқланади.

Суюқ муҳитларда бактериялар ўсиш характеристикасини аниклаш учун намуналар яхши ўсишини таъминлайдиган гўшт-пептонли бульон ёки бошқа муҳитларга экилади. Ўсишни тавсифлаш учун стационар шароитларда ўстирилган 4-7 суткалик намуналар ишлатилади. Биринчи навбатда ўсиш интенсивлиги кўрилади (кам, ўртача, кўп). Кейин муҳитнинг хиралашишига аҳамият берилади (бир жинсли, *хлопьевидный*, ипаксимон тўлқинли), парданинг мавжудлиги (қалин ёки юпка, курук ёки шилимшиқ, силлиқ ёки букилган, халқасимон ёки сидирға). Агар намуна пигмент ҳосил қилмаса, муҳит ранги ўзгармай, чўкма ҳосил бўлса, у кўпинча кулранг-оқ ёки сарғимтир жигарранг бўлади. Кўпинча микроорганизмларнинг суюқ муҳитда ўсиши хид, газ ажралиши билан боради. Газ ҳосил бўлиши пуфакчалар ва кўпик пайдо бўлишидан билинади.

8.2 Бактерияларнинг физиологик-биоокимёвий белгилари

Бактерияларнинг физиологик-биоокимёвий белгиларини ўрганишда уларнинг кислородга бўлган муносабатини, ферментатив фаоллигини,

метоболизмнинг маълум маҳсулотларига бой турли углеводларни парчалаш қобилиятини ўрганилади.

Ҳаводаги кислородга бўлган муносабат. Кислородга нисбатан микроорганизмлар облигат аэроблар, микроаэрофиллар, факультатив анаэроблар ва облиган анаэробларга бўлинади. Бактерияларнинг кислородга бўлган муносабати ҳақида намунани укол билан озуқавий агар устунига экишдаги ўсишига қараб ҳулоса чиқарилади. Аэроблар уколнинг юқори қисмида, анаэроблар – қуйи қисмида, факультатив анаэроблар эса – бутун укол бўйича текис ривожланади.

Намунанинг биокимёвий хоссалари ичида уларнинг ферментатив фаоллигини аниқлаш жуда муҳимдир.

Углеводлар ва спиртларнинг микроорганизм намуналари томонидан ишлатилиши 0,1-0,2 см³ текширилувчи хужайралар суспензиясининг суюқ ёки ярим суюқ муҳитли пробиркага экиш билан аниқланади. Ушбу муҳитда углевод ва индикатор мавжуд бўлади. Углеводларнинг парчаланишида газнинг ҳосил бўлишини аниқлаш учун суюқ муҳитга поплавоқлар туширилади. Углеводлар ва индикаторли муҳитлар йиғиндиси Гисснинг “рангли” қатори дейилади. “Рангли” номи хужайралар ферменти таъсирида баъзи углеводлар кислота ёки ишқорнинг йиғилиши билан парчаланишига боғлиқ. Бу жараён натижасида индикатор ва муҳитнинг ранги ўзгаради, бошқа углеводлар парчаланмайди ва муҳитнинг ранги ўзгармайди. Гисснинг қисқа қатори таркибида глюкозали, лактозали, сахарозали, мальтозали ва маннитли муҳитлар бор. Узун қаторга қўшимча сифатида арабиноза, ксилоза, рамноза, галактозали муҳитлар, шунингдек, полисахаридлар (инулин, крахмал, декстрин) ва спиртлар (глицерин, дульцит, инозит) қўшилади.

Экилган пробиркаларни термостатга оптимал ҳароратда қўйилади. Натижа 2-4 суткадан кейин ҳисобланади (секин ўсувчи микроорганизмлар учун 7-10 суткадан кейин). Индикатор рангининг ўзгариши ёки муҳит ранги

ўзгармаслиги шунингдек поплавокда газнинг пайдо бўлиши ёки йўқлиги аникланади.

Олинган натижалар асосида бактерияларнинг текширилаётган намунаси қандай углеводларни ассимиляция қилиши ҳақида ҳулоса қилиш мумкин.

Протеолитик фаоллик. Протеолитик фаолликка эга микроорганизмлар желатинни суюқтирдаи, сутни пептонизация қилади. Бу белгини аниқлаш учун текширилаётган бактериялар намунасини укол билан желатинли пробиркага экилади ва ҳона ҳароратида 4-10 сутка давомида культивация қилинади. Бунда суюлиш тезлиги ва унинг характери аникланади: қатламма-қатлам, гирдобсимон, пуфаксимон ва ҳ.к.з (8.3-расм).



8.3-расм. Желатиннинг текширилаётган бактериялар протеазалари билан суюлиши характери.

Каталаз фаоллик. Каталаза ферментини кўп аэроб микроорганизмлар ҳосил қилади. Текширишларни амалга ошириш учун 10% водород пероксиди эритмаси томчисини 24 секунд давомида зич муҳитда Петри чашкасида ўсган микроорганизмлар колониясига суртилади. Кислороднинг газ пуфакчалари кўринишида ажралиши бактерия ҳужайраларида каталаза мавжудлигидан дарак беради.

Сутда ўсиш характери. Ёғсизлантирилган сут сув билан 4:1 муносабатда аралаштирилади, қирмизи бромкрезол индикатори қўшилади (1,6 % спиртли эритманинг 2см³ миқдори 1 дм³ сутга) ёки лакмус (4%ли эритманинг 10см³ миқдори 1 дм³ сутга), 8-10 см³ ҳажмли пробиркаларга қуйилади ва автоклавларда 0,05 МПа босим остида 20 дақиқа давомида стерилланади.

Сутли пробиркаларга текширилувчи бактериялар намунаси экилади ва оптимал ҳароратда 6-14 сутка давомида культивация қилинади. Лактоза парчаланишида микроорганизмларнинг кислота ҳосил қилиши индикатор рангининг ўзгаришидан билинади. Агар кислота қўп миқдорда ҳос бўлса, қуйқа ҳосил бўлади. Фаол протеазаларга эга бактериялар сутнинг пептонизациясини келтириб чиқариб, казеинни парчалайдилар.

Индолнинг ҳосил бўлиши. Баъзи микроорганизмлар индол ҳосил қилиб триптофан аминокислотасини парчалаш қобилиятига эга. Бу ҳол ҳам бактериялар турини аниқлашда диагностик белги бўлиб ҳисобланади. Индолни аниқлаш учун Морель усули қўлланилади. 0,01% ли триптофан қўшилган 8-10 см³ ҳажмдаги стерил (ёки усиз) пептон бульонили пробиркага текширилувчи бактериялар намунаси экилади. Пахта тикин тагига **шавель** кислотаси шимдирилган филтр қоғози бўлаги ўрнатилади. Пробиркалар 24 с давомида оптимал ҳароратда инкубация қилинади. Индол ҳосил бўлганида қоғознинг таг қисми пушти рангга киради.

Аммиакнинг ҳосил бўлиши. Микроорганизмлар ферментлари таъсирида оксил моддаларнинг аммонификацияси аммиак ажралиши билан боради. Бактерияларнинг бу хусусияти текширилувчи намуналарни гўшт бульонга экиб, 2-3 сутка давомида 37°C ҳароратда термостатда инкубация қилиб аниқланади. Аммиакнинг ҳосил бўлиши тикин ва пробиркага бўйинчаси орасида маҳкамланган махсус қоғозининг ранги ўзгаришига қараб аниқланади. Бунда лакмус қоғози озуқа муҳитига тегмаслиги лозим. Аммиакнинг ажралиши лакмус қоғозининг ранги кизилдан қўкка ўзгаришидан билинади.

Водород сульфидининг ҳосил бўлиши. Микроорганизмлар томонидан олтингугуртли аминокислоталарини (цистеин, метиоцин) парчалашида водород сульфиди ҳосил бўлади. Водород сульфидининг ҳосил бўлганини аниқлаш учун гўшт-пептонли бульонли пробиркага текширилаётган бактерия намуналари экилади. Тикин тагига қўрғошин ацетати эритмаси шимдирилган филтр қоғоз бўлаги бириктирилади. Экилган пробиркалар термостатга оптимал ҳароратда 7-

10 суткага қўйилади. Водород сульфидининг ажралиши қўрғошин сульфиди ажралиши натижасида қоғознинг қорайиб қолишидан билинади.

Ажратилган намунанинг морфологик, культурал ва физиологик-биокимёвий белгилари асосида бактерияларнинг Берджи аниқлагичидан фойдаланиб уларнинг қайси турга мансублиги билинади.

Бактерияларни идентификация қилиш бўйича тадқиқотлар протокол шаклида расмийлаштирилади (8.1-жадвал).

Керакли ҳолларда бошқа белгилар масалан, нитратларни қайта тиклаш хусусияти, оксидазанинг ҳосил бўлиши кабилар ўрганилади.

8.1-жадвал

Намунанинг морфологик, культурал ва физиологик-кимёвий белгиларига қараб характеристикаси.

Тест ёки белги	Натижа
Морфологик белгилар Хужайраларнинг шакли ва жойлашиши Грам усулида бўйаш Эндоспораларнинг ҳосил бўлиши Капсулаларнинг ҳосил бўлиши Ҳаракатчанлик	
Культурал белгилар: Колониялар морфологияси Гўшт- пептон бульонда ўсиш характеристикалари Сутда ўсиш характеристикалари	
Физиологик-биокимёвий белгилар: Ҳаво кислородига бўлган муносабат Каталазанинг мавжудлиги Протеолитик активлик Водород сульфидининг ҳосил бўлиши Аммиакнинг ҳосил бўлиши	

Индолнинг ҳосил бўлиши Глюкста Лактоза Сахароза Мальтоза Маннит мавжуд бўлган Гис муҳитида ўстириш	
---	--

Назорат саволлари

1. Бактериялар турини аниқлашда қандай белгилар ишлатилади?
2. Зич озук муҳитидаги бактерия колониялари қандай белгиларига қараб характерланади?
3. Суюқ муҳитдаги бактерия қандай характерланади?
4. Бактерияларнинг протеолитик фаоллиги қандай аниқланади?
5. Бактерияларнинг шакларни бижғитиш хусусияти қандай аниқланади?
6. Бактериялар сутда ривожланишида қандай ўзгаришлар кузатилиши мумкин ва улар қандай тушунтирилади?
7. Қандай белгилар бактерияларнинг аммиак, водород сульфиди, индол ҳосил қилганидан дарак беради?

9 СУТ БАКТЕРИЯЛАРИНИНГ ТОЗА НАМУНАСИНИ АЖРАТИШ

Ишдан мақсад: табиий субстратлардан (карам ва бодринг тузламасининг суви, ўсимликлар, мевалар, бозор сут маҳсулотлари) мезофил лактококклар ва лактобациллаларнинг тоза намуналарини ажратиш ва уларнинг хусусиятларини аниқлаш.

Текширилаётган материалдан микроорганизмларнинг тоза намунасини ажратиш 3 босқични ўз ичига олади:

1. Йиғувчи намунани олиш.
2. Тоза намунани ажратиш
3. Ажратилган намунанинг тозалигини аниқлаш

9.1 Йиғувчи намунани олиш

Йиғувчи намуна деб ўзида бир гуруҳ ёки бир турдаги микроорганизмларни мужассамлаштирган намунага айтилади. Йиғувчи намунани олиш учун асосан ажратилаётган микроорганизмлар гуруҳи ривожланишини таъминлайдиган *электив* шароитлар яратиб бериш керак.

Сут бактериялари (СБ) озуқа манбаларига жуда талабчандир, ва уларнинг ҳамма намоёндалари ҳам сут каби тўйимли муҳитларда ўсавермайди. СБ бошқа бактериялардан фарқли равишда спиртта чидамли бўлгани сабабли улар учун *электив* муҳит бўлиб 10-15% этил спирти мавжуд бўлган *хмелланмаган сусло* хизмат қилиши мумкин.

Мезофил СБларнинг йиғувчи намунасини олиш мақсадида ажратиш манбаини ёғсизлантирилган стерил сут пробиркага солиб, 24 соат давомида $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ҳароратда инкубация қилинади. Инкубациядан сўнг ивиган сутдан фиксацияланган бўялган препарат тайёрланади, текширилади ва микроскопик манзарада СБлар учун хос хужайралар мавжуд бўлса, тоза намуна олиш учун ишлатилади. Кўпинча сут бактерияларининг йиғувчи намунасини олиш учун стерил ёғсизлантирилган пробиркага 2-3 *пассаж* қилинади.

9.2. Тоза намунани ажратиш

СБларнинг тоза намунасини ажратиш учун Кох усули билан йиғувчи намунадан экилади. Усулнинг моҳияти тоза намунани бир хужайранинг авлоди ҳисобланган изоляцияланган колонияни олишдир.

СБларнинг изоляцияланган колониясини олиш мақсадида стерил физиологик эритмада йиғувчи намунанинг 10 карра суюлтирилган эритмаси тайёрланади. Шундан сўнг стерил пипетка билан бу намунанинг мос аралашмаси (10^{-3} ёки 10^{-4}) бир томчисини Петри чашкасидаги зич озуқа муҳити юзасига суртилади (гидролизланган сут 1,5% агар ёки сусло-агар билан). Материал эҳтиёткорлик билан шиша шпатель воситасида муҳитнинг бутун юзаси бўйлаб суртиб ташланади. Аралашма шундай ҳисоб билан қилинадики, бир чашкада 20-30 колониядан кўп колония ўсиб чиқмасин. Кейин худди шу шпатель билан 2-чашкада зич муҳитнинг юзаси артилади. Экилган чашкалар термостатда $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ҳароратда 2-3 сутка давомида ушланади. Шундан кейин ўсиб чиққан колониялар кўрилади ва таҳлил қилинади.

Колонияларнинг ташки кўриниши ва тузилиши микроорганизмлар турини аниқлашда муҳим культурал белги ҳисобланади. Чунки ҳар бир турга ўзининг типик шакли ҳосилдир. Колониялар оддий кўз билан ўтаётган ва қайтган ёруғликда ва микроскопнинг кам катталаштириши (8х) ёрдамида кўрилади.

Ўтувчи ёруғликда колониялар чашка туби тарафидан кўрилади. Колонияларнинг катталиги (нуқтавий-1мм.дан кичик, майда-1-2мм., ўрта-2-4мм., йирик-4-5мм. ва ундан катта), уларнинг шакли (тўғри, думалок, нотўғри, ясси, сферик) ва шаффофлиги аниқланади. Қайтган ёруғликда колонияларни қопқоқ томонидан кўриб, ранги, юзасининг характери (силлик, дўнгалакли, ялтироқ, сидирға), колониялар профили (қабарик, ясси, эзилган) аниқланади.

Колонияларнинг типини аниқлаш жуда муҳим. Бактериал намуна колонияларининг иккита асосий типи мавжуд:

а) Силлик колониялар-думалок ва кабарик шакл, силлик юза, нам консистенция билан характерланувчи *S*-тип(инглизча *smooth*-силлик)

б) Ғадир-будир колониялар – ғадир будур юза, нотўғри чегаралар, қурук консистенция билан характерланувчи *R*-тип (инглизча *rough* – ғадир-будур). Бу тип силлик *S* – шакллардан мутация натижасида пайдо бўлади.

Юкоридаги икки асосий колониялар типидан ташқари шилимшиқ *M*-тип ҳам мавжуд бўлиб (лотинча *mucis* – шилимшиқ), у чўзилувчан, шилимшиқ консистенция билан характерланади; бактериал намуналарнинг диссоциацияси жараёнида ҳосил бўлади.

Битта изоляцияланган колония бўйича тоза намуна билан кенгайишларини олиб бориш учун СБни стерилланган, ёғсизлантирилган сутли пробиркаларга экилади. Экилган намуналар оптимал ҳароратда 18-24 соат термостатда ушланади (48 соатдан кўп эмас).

Изоҳ. Баъзида изоляцияланган колонияларни олиш учун зич муҳитга бир матра экишнинг ўзи етарли бўлади. Лекин кўпинча зич муҳитга экиш 2-3 маротаба амалга оширилади. Бунда экиш материали сифатида чашкада ўстирилган алоҳида колониялар ишлатилади.

9.3 Ажратилган намунанинг тозалигини аниқлаш

Ажратилган намунанинг тозалиги бир неча усулда аниқланади: визуал, микроскопик ва озуқа муҳитларига экиш билан.

Визуал усулда зич муҳитда колониялар ўсиши бир типдаги характерга эгаллиги кўрилади.

Намуна тозалигини микроскопик текшириш учун фиксацияланган бўйланган препаратлар тайёрланади ва улар иммерсион объектив орқали кўрилади. Микроскопик препаратда морфологик ва тинкториал жиҳатдан бир хил хужайралар топилиши керак.

Ажратилган СБ намунаси тозалиги шунингдек сусло, гидролизланган сут, бўр ёки кальций цитрати қўшилган агар каби озуқа муҳитларига экиб текширилади.

9.4 Сут бактериялари ажратилган намунасини идентификация

Ўилиш

СБлар ажратилган намуналарининг идентификацияси уларнинг морфологияси, хар бир турга хос бўлган культурал, биокимёвий ва бошқа белгиларни ўрганиш билан амалга оширилади.

Бозор сут маҳсулотлари – творог ва сметандан одатда мезофил лактококклар ажратиб олинади.

Карам ва бодринг тузламаси сувида лактобациллаларнинг доминант турлари қуйидагилар: *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. Buchneri*.

Морфологик белгилар: СБлар хужайралари шарсимон ёки таёқчасимон бўлади. Шарсимон хужайралар якка-якка, жуфт (диплококклар), узун ёки қиска занжир кўринишида жойлашиши мумкин. Таёқчаларнинг узунлиги ва қалинлиги турлича бўлади. СБлар граммусбат, асосан ҳаракатчан, спора ва капсулалар ҳосил қилмайди.

Културал ва физиологик-биокимёвий белгилар. Зич озуқа муҳити юзасида *Lactococcus lactis* майда (диаметри 1-2 мкм), томчисимон, ялтироқ, рангсиз, чегаралари текис колониялар ҳосил қилади. Чуқур колониялар қайик ёки чечевица кўринишига эга. *Lactococcus cremoris* уруғсимон думалок колониялар ҳосил қиладилар. Гидролизланган сутли ва лимон кислотали кальцийли агарда *Lactococcus diacetylactis* колониялар атрофида ёритилган зоналар ҳосил қилади. Бу ҳол ароматик модда ҳосил қилувчи лактококклар учун характерли бўлган цетиритаза ферменти мавжудлигидан дарак беради.

Лактококкларни энтерококклардан (ичак келиб чиқишига эга сут кокклари) ажратиш мақсадида қатор қўшимча тестлар ўтказилади. Энтерококклардан фарқли равишда лактококклар ва лейконостоклар таркибида

6,5% ли NaCl мавжуд бўлган гидролизланган сутта 45°C да муҳитнинг pH миқдори 9,5 бўлганида ўсмайди (9.1-жадвал).

9.1-жадвал.

Лактококклар ва энтерококкларнинг фарқловчи белгилари.

Белгилар	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus cremoris</i>
45°C ҳароратда ўсиши	+	-	-
30 дақиқа ушланганида 65°C ҳароратдаги терморезистентлик қобиляти	+	-	-
Сутнинг 3%ли намуна киритилгандаги ивиш вақти, соат.	20-27	5-7	6-8
6,5% ли NaCl да ўсиши	+	-	-
pH 9,6 бўлган муҳитда ўсиши	+	-	-
Мальтозанинг бижғиши	+	+	-
Маннитолнинг бижғиши	+	-	±

Мезофилъ лактококклар ва лактобациллалар кўпайиши учун оптимал ҳарорат 28 дан 32°C гача. Лактококкларнинг фаол штаммлари сутни оптимал ҳароратда 5-7 соатда текис, зич қўйқа ҳосил қилиб иватади.

Сутдаги кислотали муҳитнинг чегаравий миқдорини аниқлаш 0,1 н. сутнинг NaOH билан титрлаш йўли билан амалга оширилади. Бу унинг текширилаётган намуна билан 7 сутка давомида оптимал ҳароратда ферментацияланганидан кейин бажарилади. Лактококкларда кислотали муҳитнинг чегаравий миқдори 115-120°C дан ошмайди, мезофил лактобациллаларда у 160-180°C ни ташкил этса, термофил лактобациллаларда 250-300°C га етиши мумкин.

Сут бактериялари факультатив анаэроблардир. Уларда каталаз ферменти бўлмайди, лекин ҳаво кислороди мавжуд бўлганида ўсиши мумкин.

Баъзи турдаги лактококкларнинг культурал ва биокимёвий белгилари 9.2-жадвалда келтирилган.

9.2-жадвал

Лактококклар ва лейконостоккларнинг асосий культурал ва биокимёвий белгилари

Белгилар	Lac.lact is	Lac.crem oris	Lac.diac etylactis	Leu.cre moris
4%ли NaClли мухитда ўсиш	+	-	+	-
NH ₃ нинг аргининдан ҳосил бўлиши	+	-	+	-
CO ₂ нинг глюкозадан ҳосил бўлиши	-	-	-	+
Диацетилнинг ҳосил бўлиши	-	-	+	+
Сутнинг ивиш вакти, соат	5-7	6-8	16 дан кўп	24 дан кўп
Лкмусли сутда ўсиши	ТИ*	ТИ*	ТИ*	ўзгари шсиз
Сутдаги кислотали мухитнинг чегаравий миқдори, °T	115- 120	110-115	80-100	50-80

*ТИ – тиклайди, ивитади

Ажратилган лактобактерияларнинг гомо-ёки гетеро- ферментатив гуруҳга тегишлилигини билиш учун улар глюкоза ва лактозали мухитга экилади ва термостатда турганидан сўнг поплавокдаги газнинг бор ёки йўқлиги аниқланади.

L. plantarum туридаги лактобациллалар стрептобактерияларнинг кичик турига киради. Улар сутни 2-3 суткада ивитади, кислотали мухит ҳосил бўлишининг чегаравий миқдори 160-180°С ни ташкил этади. Бу турдаги

лактобациллалар 6% ли NaCl ва 20% ўт пуфаги суюқлиги бўлган гидролизланган сутда ўсади, лакмусли сутни қайта тиклайди ва иватади, аргининдан аммиак ҳосил қилмайди. Глюкозани асосан сут кислотаси ҳосил қилиб гексодифосфат йўл билан парчалайди.

Лактобациллаларнинг баъзи турларида учрайдиган культурал ва биокимёвий белгилар 9.3 жадвалда келтирилган.

L. brevis, *L. fermentum*, *L. Buchneri* лар гетероферментатив сут бижғишини келтириб чиқарадиган бетабактериялар турига мансуб. Бижғиш жараёнида сут ва уксус кислотаси, этанол ва углерод диоксиди ажралади.

9.3 жадвал

Лактобациллаларнинг асосий культурал ва биокимёвий белгилари.

Белгилар	<i>L. Plantarum</i>	<i>L.brevis</i>	<i>L.fermentum</i>	<i>L.buchneri</i>
6%ли NaCl ли муҳитда ўсиш	+	-	-	-
NH ₃ нинг аргининдан ҳосил бўлиши	-	+	+	+
CO ₂ нинг глюкозадан ҳосил бўлиши.	-	+	+	+
Сутнинг ивиш вақти	2-3 сутка	Ивимайди	Ивимайди	Ивимайди
Лакмусли сутда ўсиши	ТИ	П*	П	П
Сутдаги кислотали муҳитнинг чегаравий миқдори, °T	160-180			

*ТИ – тиклайди, иватади; *П – пушти рангга кириши (қисман тикланиш)

Бетабактериялар сутни ивитмайди, лекин унга ачитки автолизати қўшилганда улар тезроқ ривожланади ва кислотали муҳитнинг чегаравий миқдори 150 дан 160°T гача ташкил этиши мумкин. Бетабактерияларнинг кўп турлари аргининдан аммиак ҳосил қиладилар, лакмусли сутни ивитмайдилар ва уни фақатгина қисман тиклайдилар (пушти рангга кириш).

10 МИКРООРГАНИЗМЛАРНИ МИҚДОРИЙ ҶИСОБЛАШ УСУЛЛАРИ

Маҳсулот бирлик ҳажми ёки массасидаги микроорганизм хужайралари сонини уларни бевосита микроскоп остида кўриб ҳисоблаш, ёки маҳсулот намуналарини экишда озука мухитларида ўсиб чиққан колонияларни санаш, ёки бошқа усуллар билан амалга ошириш мумкин.

Бундан ташқари микобиологик амалиётда кўпинча биомасса аниқланади. Биомасса – озука мухитининг маълум ҳажмида ўсиб чиққан, граммларда ифодаланган хужайралар қуруқ моддасининг массасидар. Хужайраларни бевосита ҳисоблаш камераларида, фиксацияланган бўялган суртмаларда ва мембранали фильтрларда бажарилади. Микроорганизмларни микроскоп остида бевосита ҳисоблашда ҳам тирик, ҳам ўлик хужайралар ҳисобга олинади. Бу субстратдаги тирик хужайралар сони ҳақида нотўғри маълумот олишга сабаб бўлиши мумкин.

10.1 Микроорганизм Ҳужайраларини Горяев камерасида

Ҷисоблаш

Ишдан мақсад: Ачитқи суспензияси хужайраларини Горяев камерасида ҳисоблаш.

Горяев, Том-Цейс ва бошқа камераларда микроорганизмларнинг фақат катта хужайраларини ҳисоблаш мумкин. Бу микроорганизмлар – ачиткилар, бир хужайрали сув ўтлари, замбуруғ клонидиялари ва баъзи йирик бактериялар.

Горяев ҳисоблаш камераси 4 та кесим билан 3 та қўндаланг майдончага бўлинган қалин предмет шишасидан иборат. Марказий майдонча кесим билан 2 га бўлинади. Ҳар бир қисмида тўрсимон ячейкалари ўйиб чиқилган. Тўр квадрати майдони ва камера чуқурлиги предмет шишасида кўрсатилган ва мос равишда $1/25 \text{ мм}^2$ га (катта квадрат) ва $1/400 \text{ мм}^2$ (кичик квадрат) га тенг. Камера чуқурлиги 0,1 ёки 0,2 мм ни ташкил этади.

Ачитқи суспензиясини ҳужайраларини санашдан аввал керакли концентрацияда сув билан аралаштирилади. Горьев камераси тўрнинг юзасига текширилаётган микроорганизмлар суспензиясидан кичикроқ томчи суртилади, махсус шлифовкаловчи коловчи шиша билан ёпилади ва у четки майдончаларида Ньютон халқалари пайдо бўлгунча босиб турилади. Ҳужайраларни санашни камера тўлганидан 3-5 дақиқа кейин бошлаш тавсия қилинади. Ҳужайралар битта текисликда жойлашиб қолмаслиги керак. Ҳужайралар 8х ёки 40х объектив орқали саналади. Аниқ натижалар олиш учун ҳисоблаш тўрнинг 10 та катта ва 20 та кичик квадратларида амалга оширилади. Бунда квадратларни диагональ бўйича суриш лозим. Катта квадратда ҳужайралар сони 20 тадан, кичигида 10 тадан ортмаслиги лозим. Акс ҳолда суспензияни водопровод суви билан аралаштириш керак.

1 см³ суспензиядаги ҳужайралар сони қуйидаги формула орқали ҳисобланади:

$$C = a \cdot 1000 \cdot n / h \cdot S,$$

C – 1 см³ суспензиядаги ҳужайралар сони; a – тўр квадратидаги ҳужайраларнинг ўртача сони; 1000 мм² = 1 см³; n – бошланғич суспензиянинг аралашмаси; h – камеранинг чуқурлиги, мм; S – тўр квадратининг юзаси, мм²;

10.2 Микроскоп остида Ҳужайраларни бевосита санаш (Виноградский – Брид усули)

Ишдан мақсад: сут маҳсулотидagi лактобациллалар ҳужайраларини санаш.

Ҳужайраларни ҳисоб камерасида санашдан кўра афзалроқ бўлган бу усулда кичик ўлчамдаги микроорганизмлар ҳужайраларини текшириш имконияти бор. Чунки ҳисоблаш иммерсион объективни қўллаган ҳолда бажарилади.

Препарат қуйидагича тайёрланади. Яхшилаб ёғсизлантирилган предмет шишаси 4 см² юзали квадрат белгиланган миллиметр қоғозига қўйилади ва унга

стеклограф ёки тушь билан чизилади. Микроорганизмлар суспензияси тайёрланади. Бунинг учун 1 см^3 сут махсулотини 9 см^3 физиологик эритмали пробиркага солинади ($n=10$). Кейин предмет шишасига микропипетка билан текширилаётган микроорганизмлар суспензиясининг аниқ миқдори суртилади (кўпинча $0,01$ ёки $0,02 \text{ см}^3$). Суспензия бактериологик сиртмоқ билан шишада белгиланган квадрат юзаси бўйлаб яхшилаб тақсимланади. Препарат ҳавода қуритилади, спиртовка оловида фиксация қилинади, 2 дақиқа давомида кўк метилен билан бўялади, сув билан ювилади ва филтр қоғоз билан қуритилади. Препаратга кедр мойининг 1 томчиси суртилади ва иммерсион объектив орқали кўрилади. Натижа аниқ бўлиши учун ҳужайралар сонини санаш камида 20 та кўриш майдонида амалга оширилиши керак. Саналган ҳужайраларнинг умумий миқдори 600 дан кам бўлмаслиги керак. Суртмада микроорганизмлар нотекис тақсимланади.: марказида улар четларига нисбатан кўпроқ бўлади. Шунинг учун ўртача қийматни олишда ҳисобни кўриш майдонини диаметрининг бир бошидан бошқа бошига суриб, суртманинг бутун диаметри бўйлаб амалга оширилади.

1 см^3 суспензиядаги ҳужайралар сони қуйидаги формула орқали ҳисобланади:

$$C = a S n/s V,$$

Бу ерда C – 1 см^3 суспензиядаги ҳужайралар сони; a – битта кўриш майдонида ҳужайраларнинг ўртача сони; S – тайёрланган суртманинг юзаси (400 мм^2); n – бошланғич суспензиянинг аралашмаси; s – кўриш майдонининг юзаси ($0,02 \text{ мм}^2$) ва V – предмет шишасига суртилган микроорганизмлар суспензиясининг ҳажми ($0,01$ ёки $0,02 \text{ см}^3$)

10.3 Микроорганизмлар миқдорини усул билан бевосита

Ҳисоблаш

Флуоресцент микроскопия баъзи биологик объектларнинг люминесценцияси, яъни ультрабинафша ёки кўк ёруғликда ёритилганда ўзидан

ёруғлик тарқатиш ҳоссасига асосланган. Бунга сабаб люминесценция ёруғлигининг ютилган ёруғликка нисбатан каттарок тўлқин узунлигига эга эканлигидир (Стокс қоида). Бунда объектлар сариқ-яшил ёки зарғалдоқ рангдаги нур таркатадилар. Бу хусусий ёки бирламчи люминесценциядир. Кўп микроорганизмлар хусусий люминесценцияга эга бўлмаганлиги учун уларни люминесцент микроскопда кўриш мақсадида қайта ишлашнинг бир неча усуллари мавжуд. Энг биринчи усул – бу уларни махсус бўёқлар – флуоресценцияланувчи бўёқлар эритмалари билан эритилган флуорохром билан бўйаш. Синтетик флуорохромлардан энг яхши натижани сариқ ёки зарғалдоқ акридин, кори́фосфин, примулин, родаминлар беради. Люминесценциянинг бундай тури бирламчидан фарқли равишда келтирилган (иккиламчи) люминесценция деб аталади.

Люминесцент микроскопия оддий микроскопияга нисбатан куйидагиларга имкон беради:

- рангли тасвир ва объектлар контрастлигини уйғунлаштириш;
- ҳам шаффоф, ҳам ношаффоф тирик объектларни ўрганиш;
- микроорганизмларни ҳам тирик, ҳам ўлик ҳужайралари морфологиясини ўрганиш;
- турли флуорохромларни танлаб, ютувчи ҳужайравий микроструктураларни ўрганиш ҳамда ҳужайраларнинг функционал – морфологик ўзгаришларини аниқлаш;
- турли ҳаётий жараёнларни уларнинг ривожланиш динамикасида ўрганиш.

Микроб ҳужайралари зарғалдоқ акрединга бўялади ва улар центрифугалаш ёки филтрлаш усули билан филтрларда тўпланади. 450 нм. тўлқин узунлигидаги ўтувчи ёруғликда тирик бактериялар яшил нур сочади, ўликлари эса – зарғалдоқ-қизил. Микроскоп остида кўриш жараёни бактериал ҳужайраларининг сонини ҳисоблаш бир вақтнинг ўзид алоҳида морфологик белгилар бўйича олиб борилади. Бу микроорганизмларнинг таркиби ҳамда

текширилаётган объектдаги микроорганизмлар сонини (кл/см^3) аниқлаш имконини беради.

Люминесцент микроскопия тиббий микробиологияда туберкулёз, дифтерия, гонорея, тиф кўзгатувчиларини аниқлашда кенг қўлланилади.

Мезофил аэроб ва факультатив анаэроб микроорганизмлар сонини аниқлашнинг люминесцент усули. Ҳозирги даврда тадқиқотлар учун люминесцент микроскопларининг қуйидаги турлари қўлланилади: ЛЮМAM 3–8, МЛД–2, ЕС БИМAM P–11, ЕС БИМAM P–13.

Люминесцент микроскопиянинг камчилиги майда (1 $\mu\text{м}$ дан кичик) бактериал ҳужайраларни санашдаги кичик ажратиш қобилиятидир. Уларнинг кўп қисмини кўриш имконияти йўқ, кичик ҳужайраларни санашда кўз зўриқади, шунингдек микроскопда кўриш шароитининг қорнғулиги кўришга ҳалакит беради.

10.4 Оқувчан цитометрия усули

Оқувчан цитометрия (ОЦ) ҳужайра параметрлари унинг органеллалари ва унда кечаётган жараёнларни оптик жиҳатдан тез ўрганишнинг замонавий технологиясидир. ОЦ усулининг моҳияти ҳар бир алоҳида ҳужайранининг флуоресценцияси ва ёруғлик сочишига асосланган. Флуоресцент бўёқ билан аввалдан белгиланган ҳужайра суспензияси босим остида орасидан сув оқувчи ячейкадан ўтказилади. У ерда ҳужайралар гидродинамик фокусланиш ҳисобига ламинар оқимда бир-бирининг кетидан занжир бўлиб жойлашадилар. Ҳужайра лазер нури билан кесишган вақтда юқори сезгирликка эга детекторлар унинг флуоресценцияси интенсивлиги ва сочилган лазер нурланишини қайд қиладилар. Текширув вақтида ҳужайра таркибига кирувчи кимёвий бирикмаларнинг флуоресценция даражаси ҳисобга олинади (аутофлуоресценция). Олинган сигнал компьютерга узатилади, қайта ишланади ва олинган натижалар турли график ёки гистограммалар қўринишида акс этади.

ОЦни ўтказиш учун мўлжалланган аппарат хужайранинг ўлчами, ферментларнинг фаоллиги, оксилларнинг миқдори, ДНК, липидлар, антиген моддалар каби 5-10 та турли параметрларни аниқлаш имконини беради.

ОЦ усулини турли мақсадларда қўллаш мумкин: хужайраларни оддий ҳисоблаш ва уларнинг ҳаётга чидамлилигидан бошлаб иммунология, онкология, цитология, гематология, фармакологиядаги мураккаброк тадқиқотларгача.

10.5 Микроорганизмлар миқдорини мембранали филтрлаш усулида аниқлаш.

Усулнинг моҳияти куйидагидан иборат: текширилувчи намунанинг (ичимлик суви, алкогольсиз ичимликлар, пастеризацияланган пиво) маълум ҳажми тешиклари 0,15 мкм дан 0,25 мкм гача бўлган мембранали филтрлардан ўтказилади (10.3 бўлимга қаранг). Филтрда қолиб кетган микроорганизмлар бўялади ва микроскоп остида окуляр тўрсимон микрометрни қўллаган ҳолда бир неча кўриш майдонларида препаратнинг маълум юзасида саналади. Микроскопда кўриш жараёнида бактериал хужайраларнинг сонини ҳисоблаш бир вақтнинг ўзида алоҳида морфологик гуруҳлар бўйича олиб борилади. Бу микроблар тўпланмасинини таркиби, шунингдек (барча натижаларни кўриб чиққандан кейин), текширилувчи объектдаги микроорганизмларнинг умумий миқдорини характерлаш имконини беради.

10.6 Микроорганизмлар миқдорини колонияларини ҳисоблаш усулида аниқлаш (чашкали усул)

Ишдан мақсад: озик-овқат маҳсулотида мезофил аэроб ва факультатив анаэроб микроорганизмлар миқдорини аниқлаш.

Чашкали усул микроорганизмлар тирик хужайраларининг турли табиий субстратларида ва лаборатория намуналаридаги сонини аниқлашда кенг

қўлланилади. Ушбу усул Кох принципига асосланиб, унга кўра ҳар бир колония битта хужайранинг авлоди бўлади. Лекин шуни ҳисобга олиш керакки, занжир ёки хужайраларнинг бошқа тўпланмасини ҳосил қилувчи микроорганизмлар учун натижалар доим бир оз камайтирилган бўлади. Шунинг учун чашкали усулни қўллашда натижа хужайраларнинг масса ёки ҳажм бирлигида эмас, балки *колония ҳосил қилувчи бирликлар* (КХҚБ) миқдорида ўлчанади. Хужайраларни микроскоп остида бевосита санаш усулидан фаркли равишда ушбу усул фақат тирик хужайралар сонини аниқлаш имконини беради.

Бактерияларни ҳисоблаш учун озука муҳити сифатида гўшт -пептон ағари ишлатилади. Унда фақат сапрофит аэроб ва факультатив анаэроб бактериялар ўсиши мумкин. Лекин қатъий анаэроблар ўса олмайди. Ачитки ва мицелиал замбуруғлар кўпинча сусло агарда ўстирилади.

10.7 Тирик микроорганизмларни чегаравий аралашмалар усулида Ҳисоблаш.

Чегаравий аралашмалар усули алоҳида физиологик гуруҳлар (сут, уксус бактериялари, ичак таёқчалари ва бошқ.) микроорганизмларининг миқдорини аниқлаш учун қўлланилади. Ушбу усулнинг моҳияти: текширилувчи материал бир неча бор аралаштирилади. Эритмалар бактерияларнинг текширилувчи объектдаги тахминий миқдорига қараб шундай тайёрланади-ки, охириги аралашмада ушбу бактериялар намоёндалари бўлмасин. Тайёрланган аралашмадан олинган материал озука муҳитли маълум сондаги пробиркаларга экилади. Оптимал ҳароратдаги инкубациядан сўнг текширилувчи материалнинг канча миқдорида ушбу гуруҳ микроорганизм намоёндалари борлиги визуал равишда аниқланади.

Масалан, сут маҳсулотиде сут бактериялари миқдорини аниқлаш учун унинг 10^{-4} дан 10^{-10} гача миқдордаги қатор аралашмалари тайёрланади. Ҳар бир аралашмадан 3 та стерил ёғсизлантилган пробиркага 1 см^3 дан экилади.

Пробиркалар термостатда оптимал ҳароратда 18-24 соат мобайнида ушланади. Шундан сўнг қайси пробиркада сут кислотасининг бактериялари тўпланиши ҳисобига қуйка ҳосил бўлганлиги аниқланади. Параллел экилган пробиркаларда ҳужайраларнинг текширилувчи пробадаги нотекис тақсимланиши натижасида бир хил натижа чиқмаслиги мумкин. Кейинчалик титр махсус ҳисоб жадваллари ёрдамида аниқланади.

Агар тирик микроорганизмлар сонини аниқлаш учун бульонли озуқа муҳити ишлатилса, микроорганизмлар кўпайган пробиркалар инкубациядан сўнг хира бўлиб, эритма экилган пробиркаларда эса тирик микроорганизмлар қолмай шаффоф бўлиб қолади.

Текширилаётган аралашма намунасини экишда хира бўлиб қолган пробиркалар улуши эритилмаган намунадаги тирик ҳужайралар сонига боғлиқ. 3 та кетма-кет аралашмалар суспензияси экилган хира пробиркалар сонига қараб мос жадваллар ёрдамида микроорганизмлар ҳужайраларининг эҳтимоллиги энг катта бўлган сони (ЭЭС) аниқланади.

10.8 Биомассанинг аниқлашнинг нефелометрик усули

Биомассанинг аниқлашнинг нефелометрик (турбидиметрик) усули лаборатория микробиологик тадқиқотларида кенг қўлланилади. Чунки бу усул микроорганизмлар суспензиясидаги ҳужайралар концентрациясини тез ва анча аниқ ҳисоблаш имконини беради.

Нефелометрик усул ёруғлик дастасининг суяқ фазадаги заррачалар томонидан сочилишига асосланган. Ушбу усул ўсиши муҳитнинг бир текисда хиралашишини келтириб чиқарувчи микроорганизмлар учунгина ярайди. Бунда мицелий, парда ва бошқа тўпланмалар ҳосил бўлмаслиги лозим. Микроорганизмлар культивация қилинаётган озуқа муҳити оптик шаффоф бўлиши керак.

Озука бульонида ўсган микроорганизмлар сабачи бўлган ёруғлик сочилишини фотоэлектроколориметр (ФЭК)да ёки спектрофотометрда ўлчаш кулайдир. Ўлчашлар берилган суспензия томонидан ёруғликнинг ютилиши минимал бўладиган тўлқин узунлиги – 540 нм дан 650 нм гача интервалда амалга оширилади.

Тушаётган ёруғликнинг интенсивлиги (I_0) ва ўтган ёруғликнинг интенсивлиги (I) (яъни, намуна томонидан сочилмаган ёруғлик) орасидаги боғлиқлик бактерияларнинг кичик концентрациясида Ламберт Бер қонунига бўсунади:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon lc}$$

Бу ерда ϵ – экстинкция коэффиценти, l – суспензия қатлами қалинлиги, c – бактериялар концентрацияси. Бу тенгламадан қуйидагини оламиз:

$$\lg(I_0/I) = \epsilon lc.$$

$\lg(I_0/I)$ нинг c (бактериялар концентрацияси)га боғлиқлик графиги тўғри чизик кўринишига эга. Бу чизикнинг оғиш бурчаги ϵl кўпайтма билан аниқланади. Шундай қилиб, бактериялар концентрацияси бир бирликка ўзгариши туфайли оптик зичликнинг ўзгариши суспензия қатлами қалинлиги l га ва ϵ билан характерланувчи суспензия хоссаларига боғлиқ бўлади.

Бактерияларнинг юқори концентрациясида Ламберт-Бер қонуни ўз қучини йўқотади.

Бактериялар сонини нефелометрик усулда аниқлаш учун ёруғлик сочилиши катталиги ва ҳужайралар сони (ёки муҳитнинг бирлик ҳажмдаги курук биомасса) орасидаги калибровка чизиклари чизилади. Калибровка чизигини чизиш учун ФЭК ёки спектрофотометрда турли миқдордаги ҳужайралар сонига эга суспензияларнинг ёруғлик сочилиши катталиги ўлчанади ва уларнинг ҳар бирида ҳужайра ва биомасса миқдори аниқланади.

Олинган боғлиқлик график кўринишида бўлиб, ордината ўқида ФЭКнинг кўрсаткичлари абсциссалар ўқида 1 см^3 суспензиядаги ҳужайралар сони ёки 1

дм³ культурал муҳитдаги биомасса белгиланади. Ҳар бир микроорганизм учун ўзининг калибровка чизигини тасвирлаши керак.

Назорат саволлари

1. Турли объектлардаги микроорганизмлар миқдорини аниқлашнинг қандай усуллари биласиз?
2. Текширилувчи объектнинг эритмалари қандай мақсадда тайёрланади? КХҚБ нимани англатади.
3. Текширилувчи маҳсулотда бор бўлган барча бактерияларни чашкали усулда аниқласа бўладими?
4. Маҳсулотдаги бактериялар ва замбуруғлар (ачитқилар ва моғор) миқдорини аниқлаш учун қандай озуқа муҳитлари ишлатилади?
5. Микроорганизмларни ҳисоблашнинг флуоресцент усулининг афзалликлари ва камчиликлари нималардан иборат?
6. Оқувчан цитометрия усулининг моҳияти нимадан иборат?
7. Суспензиядаги бактериялар ёки биомасса миқдорини нефелометрия усули нимага асосланган?

11. ХОНА ҶАВОСИ МИКРОФЛОРАСИНИ ТЕКШИРИШ

Ишдан мақсад: хона ҳавосини микробиологик текшириш усуллари билан танишиш.

Керакли жиҳоз ва реактивлар: Кротов аппарати, стерил Петри чашкалари, озуқа муҳитлари – гўшт -пептон агар, сусло-агар.

Озиқ-овқат ишлаб чиқариш саноати корхоналар ҳоналаридаги ҳаво хом ашё ва тайёр маҳсулотнинг бегона микроорганизмлар билан зарарланишига сабачи бўлиши мумкин. Ҳавода асосан турли микрококklar, сарцинлар, спора ҳосил қилмайдиган таёқчалар, ачитқилар, бактерия ва мицелиал замбуруғ споралар, шунингдек турли касалликлар келтириб чиқарувчи микроорганизмлар учрайди.

1 м³ ҳавонинг микробиологик текширувида микроорганизмларнинг умумий микдори, моғор замбуруғлар микдори, керак бўлса, санитар намунавий микроорганизмлар: гемолитик стрептококklarнинг (қонли агарга экиш) ва олтинранг стафилококк (сарик-тузли агарга экиш)нинг умумий микдори аниқланади.

Ҳаводаги микроорганизмларнинг микдорини аниқлаш учун турли усуллар қўлланилади. Энг кўп тарқалган усуллар – бу седиментацион ва аспирацион усуллардир.

11.1 Седиментацион усул.

Седиментацион усул (Кох усули) чанг зарралари ва томчиларнинг микроорганизмлар билан бирга очик Петри чашкаларидаги озуқа муҳитлари юзасига тушишига асосланган. Ҳоналар ҳавосини текшириш қуйидагича амалга оширилди. Иккита стерилл Петри чашкаси тайёрланади. Унинг биттасига эритилган гўшт пептонли агар (ГПА) бошқасига сусло-агар (СА) солинади. Агар совиганидан кейин, чашкалар текширилувчи хонага олиб кирилади, копкақлари очилиб, четга шундай сурилиб қўйилади-ки, озуқа муҳитининг юзаси бутунлай очик бўлсин. Чашкалар ҳавонинг ифлосланганлиги даражасига

боғлиқ равишда 5, 10 ёки 15 дақиқа очик ҳолда туради. Кейин чашкалар ёпилади, тескариси ўгирилиб, термостатга қўйилади.

Диққат! Агар чашкалар ўгирилмаса, агарли муҳитдан кўтарилган конденсацион намлик қопқокнинг ички томонидан муҳит юзасига тушади ва микроорганизмлар колониясини сув билан аралаштириб юборади.

ГПАли чашкалар 37⁰С ли ҳароратда 24 соат, САли чашкалар эса 30⁰С ҳароратда 48 соат давомида ушланади.

1 м³ ҳаводаги микроорганизмлар миқдорини аниқлаш учун В.Л. формуласидан фойдаланилади. Унга кўра 100см² чашкага 5 дақиқа давомида 10 дм³ ҳавода қанча микроорганизм бўлса, шунчаси тушади:

$$X = a \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100 / ST,$$

Бу ерда а – чашкада ўсиб чиққан колониялар сони; 100 – чашка юзасининг 100см² миқдорини ҳисобга олиш; 5 – Омелянски бўйича чашка экспозицияси, дақиқа; 100 – 1м³ ҳавонинг ҳисоби; S – Петри чашкасининг юзаси 78,5см²; T – очик чашканинг экспозиция вақти;

11.2 Аспирацион усул.

Аспирацион усул (Кротов усули) Ю.А.Кротовнинг тиркишли аппаратини қўллашга асосланган. Ихчам қутига жойлаштирилган асбоб қопқоксиз Петри чашкаси жойланадига махсус майдончали пробани сакловчи қисмдан, электромотор, вентилятор ва ротаметрдан иборат. Вентилятор минутига 4-5 минг маротаба айланиб, ҳавони сўриб олади. Ҳаво оқими Петри чашкасидаги озуқа муҳитига урилиб, унинг юзасида микроорганизмларни қолдиради. Ҳаво асбобдан ротаметр орқали чиқади. Микроорганизмлар муҳит юзасида текис тақсимланиши учун чашкали диск бир дақиқада 60 маротаба айланади. Бактерияларнинг умумий сонини аниқлашда ўтказилга ҳавонинг миқдори 100 дм³ ни ташкил этиши керак. Экилган чашкалар аппаратдан олинади, қопқоклари ёпилади, термостатда 37⁰С ҳароратда 24 соат сақланиб олинади ва

хона ҳароратида 24 соат қолдирилади. Ўсиб чиққан колониялар солни ҳисобланиб, 1 м^2 ҳаво учун берилади:

$$X = a/100 V,$$

Бу ерда a – чашкада ўсиб чиққан колониялар сони; V – асбоб орқали ўтган ҳавонинг ҳажми; 100 – ҳавонинг текширилаётган ҳажми, дм^3 .

Ҳаво микрофлорасининг миқдорий характеристикасидан ташқари сифат характеристикаси ҳам берилади. Бунинг учун Петри чашкаларида ўсиб чиққан бактерия колониялари тавсифланади ва улардан микроскопик препаратлар тайёрланади. Колониялар 5.3 бўлимда кўрсатилганидек тавсифланади.

Тадқиқот натижалари 11.1 жадвал шаклидаги жадвалга киритилади:

11.1-жадвал

**ГПА да ўсиб чиққан бактерия колониялари морфологиясини
ўрганиш**

Колониялар характеристикаси						
Ўлчам	Шакл	Профиль	Чегараси	Юзаси	Ранги	Структура

Сусло-агарли Петри чашкаларида ўсиб чиққан моғор замбуруғлари визуал равишда 8х объективли микроскопда кўрилади. 5-бўлимда келтирилган замбуруғлар таърифларидан фойдаланиб, улар қайси турга мансублиги аниқланади.

Текширилувчи хонанинг санитар ҳолати санитар норма ва қоидаларига кўра баҳоланади.

11.2-жадвалда озиқ-овқат саноати корхоналарида ишлатиладига санитар-биологик назорат журналининг шакли келтирилган.

11.2-жадвал

Корхонадаги санитар-микробиологик назорат

Текширув	Микробиологик	Йўл қўйиладиган	Назорат
----------	---------------	-----------------	---------

объекти	аниқлаш	норма	даврийлиги
Цех хавоси	Умумий микроблар сони	ГПАли чашкадаги 200 та колония седиментацион усул билан 20 дақиқа эспозиция килинганидан сўнг; 150 та колония Кротов аппарати билан 100 дм ³ ни тортиб олганидан сўнг.	1 ойда 2 марта
Цех хавоси	Моғор замбуруғларининг споралари	САли чашкада 20 та колония 20 дақиқа экспозиция килинганидан сўнг ва 15 та колония Кротов усули билан.	1 ойда 2 марта

11.2-жадвалда келтирилган жадвал натижаларидан фойдаланиб текширилувчи хона ҳавосининг микробиологик тозалиги ҳақида хулоса бериши керак

Назорат саволлари:

1. Хона ҳавосининг микробиологик текшируви қандай усулларда олиб борилади?
2. Озиқ-овқат саноати корхоналарининг ишлаб чиқариш хоналаридаги ҳавосини баҳолаш мезонлари қандай?

3. Хона ҳавосида қайси микроорганизмлар энг кўп учрайди?

12. СУВНИ САНИТАР-БАКТЕРИОЛОГИК ТЕКШИРИШ

Ишдан мақсад: ичимлик суви ва табиий сув хавзаларидаги сувнинг санитар-бактериологик ҳолатини баҳолаш усулларини ўрганиш.

Озик-овқат саноати корхоналарида ишлатилувчи сув норматив ҳужжатларга кўра ичимлик сувига қўйиладиган талабларга жавоб бериши керак. Сувнинг эпидемиологик жиҳатдан хавфсизлиги унинг маълум ҳажмидаги микроорганизмлар ва ичак таёқчалари гуруҳидаги бактериялар сонига қараб аниқланади.

Марказлашган сув таъминоти тармоқлари сувининг сифати санитар қоидалар ва нормаларга асосан аниқланади. Ичимлик суви эпидемиологик ва радиацион жиҳатдан, кимёвий таркибига кўра хавфсиз бўлиши ва яхши органолептик хусусиятларга эга бўлмоғи лозим.

12.1-жадвал

Ичимлик сувининг эпидемиологик жиҳатдан хавфсизлиги.

(микробиологик ва паразитолдогик кўрсаткичлар бўйича)

СанПин 2.1.4.1074-01

Кўрсаткичлар	Бирлик	Нормативлар
Умумий микроблар сони (УМС)	КОЕ нинг 1 см^3 даги сони	50 дан кам
Термотолерант колиформ бактериялар	100 см^3 даги бактериялар сони	Йўқ
Умумий колиформ бактериялар	100 см^3 даги бактериялар сони	Йўқ
Колифаглар	100 см^3 даги ПХҚБ* лар	Йўқ
Сульфит редуцирловчи бактериялар споралари	20 см^3 даги споралар сони	Йўқ
Лямбляларнинг цисталари	50 дм^3 даги цисталар сони	Йўқ

ПХҚБ*-пилак ҳосил қилувчи бирликлар.

12.1. Пробаларни танлаш ва уларни анализга тайёрлаш.

Санитар-бактериологик назорат учун олдиндан қоғоз пакетларда стерилланган, пахта-дока тикили, устидан қоғоз қопқоқ билан беркитилган бутилкаларга 500 см^3 миқдорда солинади.

Пробани олишдан аввал кран ёки трубанинг четки қисмлари спирт шимдирилган пахтали тампонни ёкиб куйдирилади. Кран очилиб, 10-15 дақиқа давомида сув туширилади, кейин намуна олинади. Сувни намуна олинганидан сўнг 2 соатдан кўп бўлмаган муддат ичида текшириш мумкин.

Очиқ сув хавзалари – қудуқлар, бассейнлар, дарёлар, қўллардаги сув намуналари туби массив қўрғошинли металл каркасдан иборат батометрлар ёрдамида олинади. Металл каркасга бутилка ўрнатилган. Батометр керакли чуқурликка туширилади ва қопқоғига бойланган ип тортилиб, бутилка очилади. Бутилка тўлганидан кейин батометр сувдан тортиб олинади ва стерил тикин билан беркитилади.

Хлорланган сув пробалари дехлораторли флаконларга солинади. Чунки хлор таъсирида сувдаги микроблар ҳалок бўлади. Дехлоратор сифатида серноватисткий натрий текширилаётган сувнинг 500 см^3 га 10 мг ҳисобида ишлатилади.

Сувнинг танланган пробаларига керакли натижалар кўрсатилган ҳужжатлар берилади. Ичимлик суви пробаларини етказиш контейнер – музлаткичларда 4°C дан 10°C гача ҳароратда амалга оширилади.

12.2 Сувдаги умумий микроблар сонини аниқлаш

Умумий микроблар сони (УМС) – бу гўшт пептон агарга 1 см^3 экилган, кейинчалик $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ҳароратда 48 соат давомида инкубация қилинадиган, ушбу агарда мезофилл аэроб ва факультатив-анаэроб микроорганизмлар сонидир. УМС 50 КОЕ см^3 дан ошмаслиги керак.

Зарарланганликнинг тахминий даражасидан келиб чиқиб камида 2 та турли ҳажмдаги сувни экиш шундай ҳисоб билан олиб бориладики, чашкаларда 30 тадан 300 тагача колониялар ўсиб чиқиши керак. Водопровод ва артезиан сувлари аралаштирилмаган ҳолда 1см³ дан экилади. Ифлосланган сувларнинг бактериологик текширувларда сув эритмалари экилади. Эритма 8.3 бўлимда кўрсатилганидек тайёрланади.

Текширилувчи намунадан ва унинг эритмалари солинган пробиркалардан микроблар билан тахминий зарарланганлик даражасини билган ҳолда 1см³ микдор олиниб, стерил Петри чашкаларига солинади ва устидан 10-12см³ микдордаги эритилган ва 45⁰С гача совитилган гўшт-пептон ағари қуйилади. Қўлнинг айланма ҳаракатлари билан чашкалар столнинг горизонтал юзаси бўйлаб айлантирилиб, уларнинг ичидаги аралашма чашкалар тубида текис тақсимланади. Агар совиганидан сўнг экилган чашкалар 24 соатга 37⁰С ҳароратда қўйилади. Инкубациядан сўнг ўсиб чиққан колониялар сони ҳисобланади.

12.3 Сувдаги колиформ бактериялар миқдорини аниқлаш.

Эпидемиологик нуқтаи назардан сувдаги патоген микроорганизмлар – ичак инфекциялари кўзгатувчилари (қорин тифи, дизентерия, вабо ва бошқалар)ни аниқлаш жуда муҳим ҳисобланади. Лекин патоген микроорганизмларни аниқлаш жуда мураккаб бўлганлиги сабабли бактериологик текширувларда санитар – кўрсаткич микроорганизмлари (СТМ) деб аталувчи микроорганизмларни аниқлаш билан чегараланилади. Санитар-кўрсаткич микроорганизмларга инсон ва ҳайвонлар танасида доимо мавжуд бўлган микроорганизмлар кириди. СКМларнинг ташқи муҳит объектларида бўлиши уларнинг инсон томонидан зарарланганлигидан дарак беради. СКМлар ташқи муҳитда қанчалик кўп бўлса, юқумли касалликлар махсус кўзгатувчиларининг бўлиши эҳтимоллиги шунчалик катта бўлади.

СКМлар сифатида ичак таёқчалари гуруҳи бактериялари (ИТГБ) энг катта аҳамиятга эга. Ичак таёқчалари гуруҳига *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*. туридаги колиформ бактериялар киради.

СКМларнинг сувдаги микдорини аниқлашда қуйидаги характеристикалар ишлатилади:

- коли-титр – битта ичак таёқчаси топилган сувнинг энг кичик ҳажми. Тозаланган ичимлик суви учун ичак таёқчасининг титри 300 см^3 дан кам бўлмаслиги керак.
- коли-индекс – ичак таёқчаларининг 1 дм^3 даги микдори. Ичимлик суви учун учун коли-индекс 3 дан ортмаслиги керак.

Колиформ бактериялар сувда мембрана филтрлари усули ёки бижғитиш усули билан аниқланади.

Бижғитиш усули. Бижғитиш усулининг моҳияти текширилувчи сувнинг маълум ҳажмларини экиш, экилган намуналарни тўпланган муҳитларда (кейинчалик Эндо муҳитига экиш билан) 37°C да инкубация қилиш, ўсиб чиққан колонияларни аниқлаш ва 1 дм^3 сувдаги ИТГБларнинг энг катта эҳтимолликка эга микдорини топишдан иборат.

Марказий сув таъминоти тармоғи сувини текширишда текширилувчи материал икки марта учта ҳажмга экилади: $100, 10$ ва 1 см^3 . Дарё, қўлларнинг сувини текшириш учун ўн каррали эритмалар тайёрланади: $1:10$, $1:100$, $1:1000$ ва эритмасдан яна 10 см^3 ва 1 см^3 экилади.

Сув Эйкманнинг глюкоза-пептон муҳити тўлдирилган бижғитиш идишлари (колбалар, бутилкалар, поплавокли пробиркалар) га экилади. Экилган намуналар термостатда 37°C ҳароратда 24 соат давомида инкубация қилинади.

Текширув натижаларини ҳисоблаш. Инкубация тугаганидан сўнг экилган намуналар кўриб чиқилади ва қуйидаги хулосалар қилинади:

а) газ ҳосил бўлмаса ва муҳит ранги ўзгармасм, сувнинг текширилаётган ҳажмида ИТГБлар йўқ, деган хулоса берилади. Ушбу хулоса текширувларни 24 соатдан кейин тўхтатиш ҳукуқини беради;

б) кислота ва газни текширишда бижғитиш идишларидаги материалларни Эндо муҳитига экиш амалга оширилади. Экиш изоляцияланган колонияларни олиш учун бактериалагик сиртмоқда зич штрих усули билан амалга оширилади. Экилган намунали чашкалар 37°C ҳароратда 24 соат давомида инкубация қилинади. инкубациядан сўнг намуналар кўриб чиқилади. Эндо муҳитида ичак таёқчаларига ҳос бўлган колонияларнинг йўқлиги рад жавобини беришга ва текширувларни тугатишга асос бўлади;

в) Эндо муҳитида лактоза мусбат тўқ-қизил ялтироқ ёки ялтирамайдиган колониялар топилса, ўсиб чиққан микроорганизмларнинг ичак бактериялар оиласига кириши ёки кирмаслиги текширилади. Бу мақсадда колониядан олинган препарат микроскоп орқали кўрилади ва *оксидаз* тест ўтказилади.

Оксидаз тест *Enterobacteriaceae* оиласидаги бактерияларни *Pseudomonodaceae* оиласидаги грамманфий бактериялардан ва ичак бактериялардан фарқли равишда оксидаза ферментини ишлаб чиқарувчи сув сапрофитларини ажратиш учун тавсия этилган.

Оксидаз тестни ўтказиш учун Эндо муҳитидан сиртмоқ билан ҳар бир типдан 2-3 та колония олинади. Микроб масса маҳсус реактив шимдирилган филтър қоғозга штрих қилиб суртилади. Реактивни тайёрлаш: 30 грамм α -д-нафтол 2,5 см³ этанолда эритилади, 7,5 см³ дистилланган сув ва 40 мг диметил-парафенилендиамин қўшилади. Эритма бевосита текширувдан олдин тайёрланади.

Оксидаз тестда кутилган бактериялар чикмаса, қоғоз колонияга теккизилганда рангини ўзгартирмайди. Агар колонияга теккизилган қоғоз 1 дақиқа давомида кўк рангга кирса, оксидаз тест мусбат ҳисобланади.

Препаратни грамманфий спора ҳосил қилмайдиган, оксидаз фаолликка эга бўлмаган таёқчаларнинг мавжудлиги сувда ИТГБлар борлиги ҳақида тез маълумот бериш имконини яратади.

Эндо муҳитида пушти ва рангсиз колониялар топилса, улар саналади ва ҳар бир турдан 2-3 та колония Эйкман глюкоза-пептон муҳитига экилади.

Экилган намуналар 37°C ҳароратда 3-4 соат давомида инкубация қилинади. кислота ҳосил бўлса (муҳит рангининг ўзгариши) ва поплавокда йиғиладиган газ ҳосил бўлса, натижа мусбат ҳисобланади. Кислота ёки газ ҳосил бўлмаса, тескари натижа қайд қилинади.

Текшириш тугаганидан сўнг охириги натижалар (мусбат ва манфий) ҳар бир экилган ҳажм бўйича лаборатория журналига ёзилади ва коли-титр, коли-индекс аниқланади.

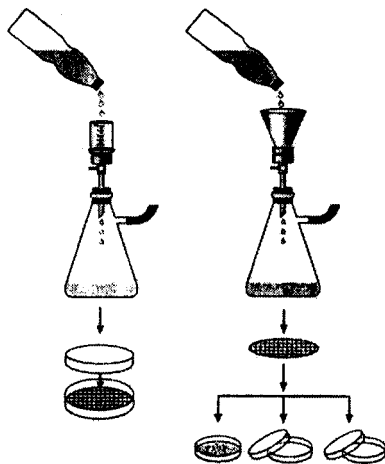
Мембрана филтрлари усули. Ушбу усулнинг моҳияти сувнинг маълум ҳажмидаги бактерияларни мембрана филтрларида йиғишдан иборат. Кейинчалик улар эндомуҳиtida 37°C ҳароратда ўстирилади, ўсиб чиққан колониялар аниқланиб, 1 см³ сувдаги ИТГБлар миқдори ҳисобланади.

Мембрана филтрларини тайёрлаш. Сувни филтрлаш учун №3 рақамли мембрана филтрлари танланиб, улар 80°C гача қиздирилган дистилланган сувга солинади ва қайнатиш учун пастроқ оловга қўйилади. Қайнатиш 3 маротаба 10 дақиқадан амалга оширилади. Биринчи ва иккинчи қайнатишдан сўнг сув тўкиб ташланиб, учинчисидан кейин филтрлар сувда ишлатилгунича қолдирилади.

Филтрлаш аппаратини тайёрлаш. Филтрлаш аппарати автоклава стерилланади ёки спиртда ҳўлланган пахта тампони билан артилади ва стериллаш мақсадида қуйдирилади. Филтрлаш аппаратининг столчасига стерил пинцет билан мембрана филтри қўйилади. Филтрнинг синишини олдини олиш учун унинг тагига думалок стерил филтр қоғози қўйилади. Филтрлаш столчасига филтрлар қўйилиб, асбобнинг юқори қисми воронка ўрнатилади (12.1-расм).

Сувни филтрлаш ва микроорганизмларни ўстириш. Филтрлаш аппаратининг воронкасига стерил қилиб текширилатган ҳажмдаги сув қуйилади ва сув насоси ёрдамида қабул қилувчи идишда вакуум ҳосил қилинади. ичимлик суви тармоғига келаётган сувни текширишда 333 см³ дан кам бўлмаган сув ҳажмини олиш керак. Филтрлаш тугаганидан сўнг мембрана

филътри фламбирланган пинцет билан Петри чашкасидаги озукa мухити юзасига кўйилади. Ҳозирги вақтда мос озукa мухитлари шимдирилган филътрлар ишлаб чиқарилмоқда. Экилган намуналар термостатда 37°C хароратда 18-24 соат давомида инкубация қилинади.



12.1-расм. Микроорганизмлар микдорини мембрана филътрлари усулида аниқлаш

Текширув натижаларини қайта ишлаш. Инкубация тугаганидан кейин экилган намуналар кўриб чиқилади ва қуйидагича хулосалар қилинади:

а) филътрларда микроблари ўсиб чиқмаса, ёки уларда ИТГБга хос бўлган колониялар бўлмаса, текширишларни шу босқичда ушбу сув ҳажмида ИТГБлар йўқлигини тасдиқлаб якунласа бўлади.

б) Филътрларда ИТГБга хос колониялар топилса, текширишлар давом этади. Ҳар бир типдаги бир нечта колониялардан суртмалар тайёрланиб, улар Грам усулида бўялади ва микроскопда бўялади. Суртмаларда майда грамманфий споралар ташимайдиган таёқчаларнинг йўқлиги текширишларни тугатиб, ушбу сув ҳажмида ИТГБлар йўқлигини тасдиқлашга асос бўлади.

с) Суртмаларда ичак таёкчаларига морфологик жиҳатдан ўхшаш грамманфий таёкчалар мавжуд бўлса, оксидаз проба ўтказилади. Мембрана филтрларида оксидаза ишлаб чиқармайдиган бир типдаги лактоза мусбат колониялар (тўқ қизил ялтироқ ёки ялтирамайдиган) топилса, сувни текшириш шу босқичда тугатилади ва мембрана филтрларида ўсиб чиққан ичак таёкчалари колониялари саналади. Натижа сувнинг 1 дм³ миқдорига ҳисобланиб, коли-индекс кўринишида берилади.

д) Мембрана филтрларида пушти ва рангсиз колониялар топилса, уларнинг сони ҳисобланади ва ҳар бир типдан 2-3 та изоляцияланган колония олиниб, Эйкман глюкоза-пептон муҳитига экилади. 37⁰С ҳаролратда 3-4 соат мобайнида инкубация қилинганидан сўнг кислота ҳосил бўлиши ва поплавоқда газ ҳосил бўлиши ҳисобига муҳит рангининг ўзгариши қайд этилади. Бу ҳолда ИТГБлар мавжуд деб ҳисобланади. Агар муҳитда ўзгариш кузатилмаса, ИТГБлар йўқлиги тасдиқланади.

Коли индексини аниқлаш учун мисол. 3 та 100 см³ ҳажмга эга сув намунаси филтрланган. Биринчи ва иккинчи филтрларда 3 тадан колония, учинчисида 9 та колония ўсиб чиққан. Ҳаммаси бўлиб 15 та колония ўсиб чиққан. Шундай қилиб, текширилувчи намунанинг коли-индекси $(1000 \times 15) : 300 = 50$. Коли-индекс коли-титрга қуйидагича ўтказилади: $1000 : 50 = 20$

Назорат саволлари

1. Ичимлик сувининг эпидемиологик хавфсизлик кўрсаткичларидан қайси бирини биласиз?
2. Умумий микроблар сони, коли-титр ва коли-индекс нима?
3. Микроорганизмларнинг қандай турлари ИТГБлар қаторига киради?
4. Колиформ бактериялар қандай усуллар билан аниқланади?
5. Ичимлик сувида колиформ бактериялари мавжудлигини аниқлашнинг асосий мезонлари қандай?

6. Оксидаза мавжудлигини аниқлаш учун тест нима мақсадда ўтказилади?

13. ТУПРОҚНИНГ САНИТАР МИКРОБИОЛОГИК ТЕКШИРУВИ

Ишдан мақсад: озиқ-овқат махсулотларини бегона микроорганизмлар контаминацияси манбаи бўлган тупрокни микробиологик жихатдан ўрганиб чиқиш.

Тупроқда микроорганизмлар жуда кўп миқдорда бўлади. Унда Ерда учрайдиган барча шаклдаги микроорганизмлар мавжуд: бактериялар, вируслар, актиномицетлар, ачиткилар, замбуруғлар. 1 г тупроқдаги умумий микроблар сони (УМС) 1,0 дан 10 млрд.гача бўлиши мумкин. Тупроқнинг турли қатламларида микроорганизмлар миқдори турлича. Энг энг юқори қатламда (0,5 см) микроорганизмлар жуда кам. 1-5 см чуқурликдан 30-40 см гача микроорганизмлар сони максимал бўлади – 1 г да ўртача 10 млн дан 50 млн гача. 30-40 см дан кейин УМС секин аста камаяди ва чуқурроқ қисмларда минимал бўлади.

Тупроқ морфологияси 2 гуруҳга бўлинади:

- 1) Аутоторф – минерал моддалар билан озиқланади.
- 2) Гетероторф – органик моддалар билан озиқланади

Иккала гуруҳ тупроқларининг ўзини-ўзи тозалаш жараёнларида уларнинг минерализациясида қатнашади. Аммо гетеротроф микроорганизмлар гуруҳида патоген микрофлора мавжуд бўлиши мумкин. Тупроқнинг ичак таёқчалари билан зарарланга инсон чиқиндилари билан ифлосланишида ўсимликлар дизентерия, вабо, қоринг тифи, сальмонеллёз, энтеровируслар қўзғатувчилари билан контаминация қилиши мумкин. Инсон ва ҳайвонларнинг ичак инфекциялари билан касалланиш даражаси ва тупроқ санитар ҳолатининг ёмонлиги орасида бевосита боғланиш мавжуд. Тупроқ орқали ўлат, газли гангрена, қоқошол ва бошқа касалликларнинг қўзғатувчилари тарқалиши мумкин.

Тупроқнинг санитар-микробиологик текширувида умумий микроблар сони, колититр, перфрингенс-титр, нитрификация қилувчи бактериялар титри ва протейлар, термофилл бактериялар миқдори ҳисобланади. Микроблар сони

тупроқнинг органик моддалар билан зарарланганлиги билан ифодалайди. Тупроқда ичак таёқчаларининг мавжудлиги унинг инсон чиқиндилари билан ифлосланганлигидан дарак беради. Тупроқда *Clostridium perfringens* таёқчасининг мавжудлиги ҳам шундай ифлосланишга мисол бўлади. Тупроқда *Proteus* туридаги бактерияларнинг мавжуд бўлиши уни хайвонларнинг органик моддалари ёки инсон чиқиндилари билан зарарланган деб ҳисоблашга асос бўлади. Термофил микроорганизмларнинг мавжудлиги тупроқ гўнг ёки компостлар билан ифлосланганлигидан дарак беради. Тоза тупроқларда термофилл микроорганизмлар кўпинча топилмайди.

Тупроқ намунасини олиш. Тупроқнинг юқори қатламларини микробиологик текширишларда намуналар 15-20 см чуқурликдан олинади. Бунда юқоридаги 2 см калинликдаги қатлам олиб ташланади (текширилаётган худунинг турли қисмларидан камида 10 та намуна). Намуналар кичкина темир куракча ёки ҳокандоз билан стерил, қоғозга ўралган, ёрлиғи мавжуд бўлган оғзи катта банкаларга солинади. Ҳар бир олинган намуна 200-300 г оғирликда бўлиши керак, аралашган намуна (ўрта проба) эса, 1 кг дан кам бўлмаслиги керак.

Тупроқни текширишга тайёрлаш. Тупроқ намуналари катта бўлақлардан ажратилади, майдаланилди, стерил 3 мм ли элакдан ўтказилади. Кейин намуна стерил қоғозга солиб яхшилаб аралаштирилади ва 10 г миқдори тарозида тортилади. Тарозида тортилган тупроқ 90 см^3 стерил водопровод суви солинган 250 см^3 ҳажмга эга колбага солинади. 1:10 миқдордаги аралашма олинади. Бу текширилаётган тупроқнинг 0,1 г миқдорига мос келади. Бу текширилаётган тупроқнинг 0,1 гр. миқдорига мос келади. Колба 10 дақиқа давомида силкитилиб, тупроқнинг йирик заррачалари 30 сек. давомида жойлашади ва тупроқнинг ифлосланганлик даражасига қараб 3 тадан 6 тагача ўн каррали аралашмалар тайёрланади.

13.1 Тупроқдаги микроблар сонини аниқлаш

Иккита стерил Петри чашкасига қопқоғини озгина очиб қўйиб, 1 см^3 дан 10^{-4} ва 10^{-5} микдорда ралаштирилган тупрок суспензияси солинади ва унинг устига эриган 45°C га совитилган озук ағари (ГПА ва картошка-глюкоза ағари) солинади. Ағар қотганидан кейин чашкалар термостатга $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ ҳароратда 24-48 соатга қўйилади. Кейин шунча вақт давомида хона ҳароратида сақланади. Чашкаларда ўсиб чиққан колониялар сони ва экилган аралашмани ҳисобга олган ҳолда тупрокнинг 1 граммидаги микроблар сони ҳисобланади.

13.2 Тупроқ коли-титрини аниқлаш.

Ичак таёқчалари гуруҳидаги бактерияларнинг мавжудлиги тупрокнинг инсон чиқиндилари билан ифлосланганлигидан дарак беради. Ичак таёқчасининг титри (колититр) деб ичак таёқчалари топилган тупрокнинг энг кичик микдорига айтилади (граммларда). Бир гармм тупрокдаги ичак таёқчаларининг микдори колииндекс деб аталади.

Колититрни аниқлаш учун 1 см^3 эритилган тупрок суспензиясининг 10^{-1} дан 10^{-5} микдорини Кесслер муҳити солинган ва поплавоклари бор бўлган пробиркаларга экилади. Экилган намуналар термостатда 37°C ҳароратда 18-24 соат давомида ушланади. Шундан кейин поплавокларда газнинг йиғилганлиги аниқланади.

13.3 Тупроқнинг перфрингенс – титрини аниқлаш

Перфрингенс-титр – сульфидларни тикловчи граммусбат облигат-анаэроб споралар ҳосил қилувчи таёқчалар титридир. *C. Perfringens* (спорали шакллар) нинг мавжудлиги инсон чиқиндилари билан аввал ифлосланганликдан дарак беради.

Перфрингенс-титрни аниқлаш учун темир-сульфат ағар (Вильсон-Блэр муҳити) қўлланилади. Ушбу муҳитда *C. Perfringens* нинг топилиши бу микроорганизмларнинг $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ни Na_2S га айлантириш қобилятига асосланган.

Na₂S хлорли темир билан таъсирлашиб қора рангга эга бўлган темир сульфати (FeS) ҳосил бўлади.

Тупроқ суспензияси аралашмалари солинган пробиркалар 80-85⁰С ҳароратли сув ҳаммомида 15 дақиқа давомида иситилади. Кейин пробиркалар хона ҳароратигача совитилиб, 1см³ тупроқ суспензияси аралашмасининг 10⁻¹ дан 10⁻⁴ гача бўлган миқдори эритилган ва 45⁰С гача совитилган Вильсон-Блэр муҳити солинган пробиркаларга жойланади. Пробиркалар кафт орасида айлантрилиб, тупроқ суспензияси муҳитда бир текис тақсимланади. Шундан сўнг пробиркалао оқаётган водопровод сувида агар қотгунича совутилади. Эқилган намуналар 43⁰С ҳароратда 18-24 соат давомида инкубация қилинади. *C. Perfringens* борлигидан муҳит солинган пробиркаларда қора колониялар пайдо бўлиши дарак беради.

13.4 Тупроқдаги термофил микроорганизмлар миқдорини аниқлаш

Термофил бактериялар индексини аниқлаш учун стерил Петри чашкаларига 1 см³дан тупроқ суспензияси аралашмасидан 10⁻¹ дан 10⁻³ гача миқдорда солиниб, устига эриган ва 45 ⁰С гача совутилган ГПА солинади. Агар совиганидан сўнг чашкалар 60⁰С ҳароратда 24 соат давомида инкубация қилинади. шундан сўнг ўсиб чиққа колониялар сони ҳисоблаб чиқилади ва эритманинг ҳисобини олиб, 1 грамм тупроқдаги термофил бактериялар миқдори топилади.

13.5 Тупроқдаги протей таёқчаларини аниқлаш

Proteus туридаги бактериялар тупроқдан озик-овқат маҳсулотларига ўтиб, кулай шароитларда ривожланиши мумкин. Протей таёқчаларининг ҳаётий фаолияти маҳсулотлари ошқозон-ичак фаолиятининг бузилишига олиб келади.

Шукевич усули билан тупроқдаги протей таёқчаларини топиш учун янги ГПАнинг конденсацион сувига тупроқ суспензияси аралашмасининг 0,1 см³

микдори солинади. Пробиркалар 37°C ҳароратда 24-48 соат давомида термостатда ушланади. Шундан сўнг агарнинг юзасида юпка тўрсимон парда ҳосил бўлади ва протейлар ўсиши қайд қилинади. Шундай парда ҳосил бўлса, унинг юзасидан микроскопик препарат тайёрланади, Грам усулида бўялади, ҳаракатчанлик ва H_2S ни ҳосил қилиш хусусияти аниқланади.

Тупрокнинг санитар-микробиологик текшириш натижалари анализ қилинади ва 13.1 жадвалда келтирилган катталиклардан фойдаланиб тупрокка баҳо берилади.

13.1 жадвал

Тупрокнинг санитар ҳолатини микробиологик кўрсаткичларга қараб баҳолаш схемаси.

Тупрок категорияси	Титр (грамм)			Термофил микроорганизмлар индекси, КОЕ/грамм
	ИТГБ	Нитрификация қилувчи бактериялар	Перфрингенс	
Тоза	1,0 ва ундан катта	0,1 ва ундан катта	0,01 ва ундан катта	$10^2 - 10^3$
Ифлосланган	0,9 дан 0,01 ва ундан кам	0,09 – 0,0001	0,09 – 0,0001	$10^3 - 10^5$
Кучли ифлосланган	0,009 ва ундан кам	0,00009 ва ундан кам	0,00009 ва ундан кам	$10^5 - 4 \cdot 10^6$

Назорат саволлари

1. Тупрокнинг қандай қатламларида микроорганизмлар кам бўлади?
2. Тупрокда микроорганизмларнинг қандай гуруҳлари мавжуд?
3. Тупрокда қандай юкумли касалликларнинг қўзғатувчилари учраши мумкин?

4. Тупроқ пробасини олиш ва уни текширишга тайёрлаш қандай амалга оширилади?
5. Тупроқ колититри ва колииндекси деб нимага айтилади?

14. ОЗИҚ-ОВҚАТ МАҲСУЛОТЛАРИНИНГ АЙНИШИГА САБАБЧИ БЎЛАДИГАН БАКТЕРИЯЛАРНИНГ ХАРАКТЕРИСТИКАСИ.

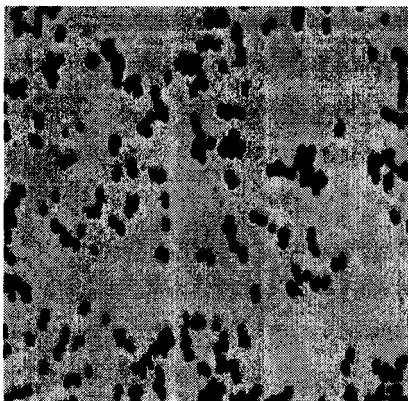
Ишдан мақсад: озиқ-овқат маҳсулотларида ривожланиб, уларнинг айнашига сабабчи бўладиган бактерияларнинг морфологик ва физиологик белгилари билан танишиш.

14.1. *Micrococcus* тури

Micrococcus турининг намоёндалари диаметри 0,5-2,0мкм. Бўлган сферик ҳужайраларга эга бўлиб, улар ёлғиз ёки нотўғри тўпланмалар бўлиб жойлашади. Микрококкларнинг баъзи турларида ҳужайраларнинг тетрадаларга бирлашиши кузатилади. Микрококклар граммусбат, ҳаракатсиз, споралар ҳосил қилмайди.

Облигат аэроблар. Каталазмусбат. Бу турнинг кўп намоёндалари пигмент ҳосил қилиб, бунинг натижасида колониялар оқ, сариқ, зарғалдоқ, пушти, тилла рангга киради.

Micrococcus luteus тури.(14.1 расм) Ҳужайралари йирик, диаметри 1,5мкм.гача, ёлғиз жойлашган. Зич муҳитда думалок бўртган, сариқ рангдаги ялтироқ юзали тўғри шаклдаги колонияларни ҳосил қилади.



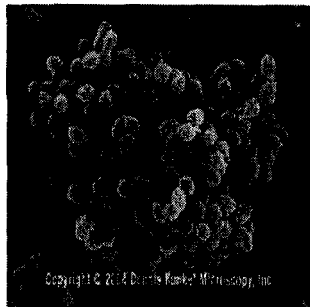
14.1 расм *Micrococcus luteus* тури

Микрококклар ўсиши учун оптимал ҳарорат 25° дан 30°C ни ташкил этади. Баъзи турлари 63 дан 65°C да 30 дақиқа давомида қиздиришга ва $72-75^{\circ}\text{C}$ ҳароратда қисқа муддатли пастеризацияга бардош беришлари мумкин.

Микрококклар кўпинча хавода учрайди ва ундан озиқ-овқат маҳсулотларига ўтади. Микрококкларнинг сутда интенсив равишда ривожланиши унда аччиқ таъмининг ҳосил бўлиши ва паст кислотали муҳитда ивиб қолишига сабаб бўлади ($40 - 60^{\circ}\text{T}$). Бу уларнинг сичуга ферменти каби фермент ишлаб чиқариши қобилятига боғлиқ. Шакар солинган қуйилтирилган сутда аччиқ таъм билан бирга турли нарсалар ҳосил бўлади, ёки маҳсулот қуйилиб қолади. Озиқ-овқат маҳсулотлари юзасида ривожланиш жараёнида микрококклар турли рангдаги пигмент доғларини ҳосил қилади.

14.2 Enterococcus тури

Замонавий тизимлашга кўра *Enterococcus* тури *Enterococcaceae* оиласи, *Lactobacillales* тартибига киради. Энтерококклар деб ичак келтиб чиқишига эга бўлган стрептококкларга айтилади. Улар инсон ва ҳайвонлар ичаклари нормал микрофлорасининг намёндаларидир. Ҳозирги вақтда энтерококклар ичак таёкчалари санитар кўрсаткичли микроорганизмлар ҳисобланади. Энтерококклар ҳужайралари сферик ёки овал бўлиб, диаметри 0,6 дан 2,5 мкм гача. Улар жуфт ёки занжир бўлиб жойлашадилар (14.2-расм). Граммусбат, ҳаракатсиз, капсула ва споралар ҳосил қилмайди.



14.2-расм. *Enterococcus faecalis*

Ҳаво кислородига нисбатан энтрококклар факультатив анаэроблар ҳисобланади. Зич озуқа муҳитлари юзасида майда, бўртган, рангсиз колониялар ҳосил қиладилар. Чуқур колониялар қайиқчани эслатади. Ушбу турнинг типик вакиллари: *Enterococcus faecalis*, *E. Faecies*.

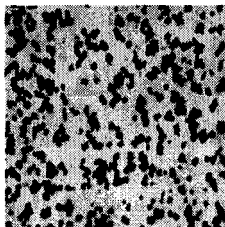
Энтрококклар бижғитиш туридаги метобализмни амалга оширадилар. Углеводларни асосан сут кислотаси ҳосил қилиб, бижғитадилар. Энтрококклар ўсишининг оптимал ҳарорати 30-37°C, ўсишнинг ҳарорат диапазони 10°C дан 45°C гача. Энтрококклар ташки муҳит факторлари таъсирига чидамли, 75-80°C гача қиздиришга бардош беради, 6,5% натрий хлоридли ва pH 9,6 ли муҳитда ўсиши мумкин. Энтрококклар оксилларни аччиқ пептидлар ҳосил қилиб парчалайдилар. Бу озиқ-овқат маҳсулотларида аччиқ таъмининг ҳосил бўлишига олиб келади.

14.3 *Sarcina* тури

Sarcina тури *Peptococcaceae* оиласига киради. Хужайралар деярли сферик, 1,5 – 3,0 мкм диаметрга эга, саккизта ёки кўпроқ кокклар тўпланган пакетлар (кублар) га йиғилган, чунки хужайраларнинг бўлиниши 3 та ўзаро перпендикуляр текисликда содир бўлади.

Граммусбат, ҳаракатсиз, эндоспоралар ҳосил қилмайди. Фақат хивчинлилар мавжуд ва спора ҳосил қилувчи *Sporosarcina urea* тури бундан истисно.

Озиқланиш тури – хемоорганотрофлар. Типик тури – *Sarcina ventriculi*.



14.3-расм. *Sarcina ventriculi*.

Зич муҳитнинг юзасида Петри чашкаларида сарцинлар ўрта ўлчамдаги, четлари текис, силлиқ ёки ғадир-будур, уруғсимон структурали, сарик, лимон-

сарик, баъзида пушти ёки оқ рангдаги қабарик колониялар ҳос қилади. Озиқ-овқат маҳсулотларининг пигментациясига сабачи бўлади.

14.4. *Staphylococcus* тури

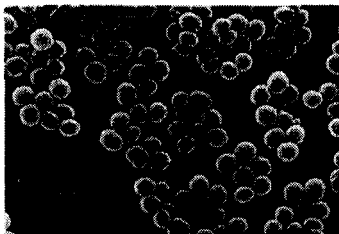
Стафилококклар асосан иссиқ қонли ҳайвонларнинг тери қатламларида ва шиллиқ пардаларида учрайди. Лекин улар ҳаво, озиқ-овқат маҳсулотларидан ҳам олиниши мумкин. Баъзи турлари инсон ва ҳайвонларда оппортунистик инфекциялар чакириши мумкин.

Staphylococcus туридаги бактериялар 0,5 – 1,5 мкм диаметрга эга сферик шаклда бўлади, якка-якка ёки жуфт ҳолда учрайди. Шунингдек узум шингилига ўхшаш нотўғри тшпланмалар ҳосил қилади. Бунга сабаб ҳужайраларнинг учта ўзаро перпендикуляр текисликларда бўлинишидир.

Стафилококклар граммусбат, ҳаракатсиз, спора ва капсулалар ҳосил қилмайди.

Факультатив анаэроблар. Булар метобализмнинг нафас ва бижғитувчи типига эга хемоорганотрофлардир.

Зич муҳитда стафилококклар думалок, сарик ёки тилларанг қабарик колониялар ҳосил қилади. Бу турнинг асосий намоёндалари: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. aureus* (тилларанг стафилококк).



14.4-расм. *Staphylococcus aureus*

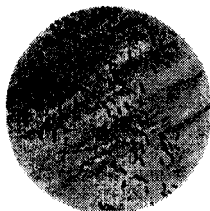
Стафилококклар ўсишининг оптимал ҳарорати 30-37°C. Бу турнинг намоёндалари – учлари думалок майда грамманфий таёқчалар бўлиб, уларнинг ўлчамлари (0,5-0,7)х(2,0х3,0) мкм. Суртмаларда тартибсиз жойлашади.

Хивчинларининг перитрихал жойлашишлари ҳисобига суюқ муҳитларда ҳаракатчандирлар. Кўпчилигида *туқчалар* учрайди. Спора, циста ва капсулалар ҳосил қилмайди. Типик тури – *Escherichia coli*.

Escherichia coli – ичак таёқчаси (14.5-расм) – факультатив анаэроб, оддий озуқа муҳитларида 37⁰С оптимал ҳароратда яхши ўсади. Гўшт пептон агаридagi колониялари силлиқ, ялтирок, четлари текис, озгина қабарик, қулранг.

Ичак таёқчаларининг озик-овқат маҳсулотларида кўпайиши уларга хос бўлмаган таъмга, шишлар ҳосил бўлишига олиб келади.

Ичак таёқчасининг озик-овқат маҳсулотларида мавжудлиги ишлаб чиқаришда санитар тартибнинг бузилишининг кўрсаткичи ҳисобланади.



14.5-расм. *Escherichia coli*

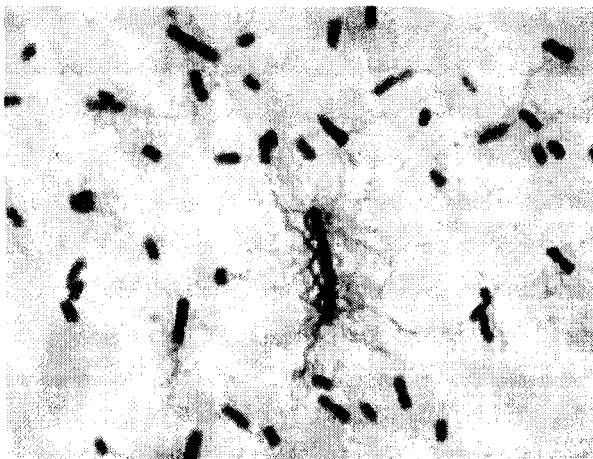
14.6. *Proteus* тури

Proteus тури *Enterobacteriaceae* оиласига мансубдир. Ушбу турнинг намоёндалари инсон ва ҳайвонлар ичакларида, гўнгда, тупроқда ва ифлосланган сувларда учрайди. Протейларни уларнинг тўдаланиш хусусиятлари борлиги учун осон аниқлаш мумкин. Протейларни тўдаланиши зич озуқа муҳитининг юзасида тўрсимон парданинг ҳосил бўлишига олиб келади. Типик вакили – *Proteus vulgaris*.

Proteus vulgaris (протеус таёқчаси). Протейлар хужайралари майда (0,4 – 0,6)х(1,0-3,0) мкм ўлчамдаги грамманфий таёқчалардир.

Эндоспора ва капсулалар ҳосил қилмайди. Жуда ҳаракатчан – перитрихлар (14.6-расм).

Факультатив анаэроблар. Метоболитзмнинг нафас в бижгитувчи турига эга хемоорганотрофлар. Ўсишнинг оптимал харорати 37°C.



14.6-расм. *Proteus vulgaris*

Протей таёқчаси актив протеазаларга эга бўлиб, гўшт ва гўшт махсулотлари, балик, сут махсулотларининг чириб айланишига сабаб бўлади. Оксилларнинг парчаланишида водород сульфид, аммиак ва индол ҳосил бўлади. Протейларнинг махсулотларда кўпайиши ошқозон-ичак системаси касалликларига олиб келиши мумкин.

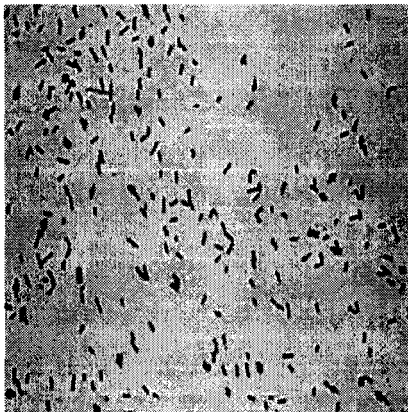
14.7 *Pseudomonas* тури

Pseudomonas тури *Pseudomonadaceae* оиласига мансуб. Псевдомонадалар табиатда кенг тарқалган. Улар тупроқда, сувда, озик-овқат махсулотларида топилади. Псевдомонадалар хужайралари майда грамманфий (0,5-1,0)х(1,5-5,0) мкм ўлчамга эга таёқчалар. Спора ва капсулалар ҳосил қилмайди, битта ёки бир нечта қарама-қарши жойлашган хивчинлар ҳисобига ҳаракатчандир.

Қатъий аэроблар. Зич муҳитларда думалоқ ёки нотўғри шаклдаги колониялар ҳосил қилади. Улар текис ва қабарик, шилимшиқ, кўпинча пигментацияланган. Метоболизмнинг фақат нафас тури. Бунда кислород

электронларнинг охирги акцептори сифатида ишлатилади. Ҳароратнинг 4 дан 43°C гача бўлган диапазонида ўсиши мумкин.

Pseudomonas fluorescens (флюоресценцияланувчи таёқча). Озуқа агариди сариқ ёки сариқ-яшил рангдаги шилимшиқ колониялар ҳосил қилиб, улар кўпинча флюоресценцияланади (14.7-расм).



14.7-расм. *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas aeruginosa (кўк йирингил таёқча) муҳитга кўк пигмент – пиоцианин чиқаради. Шунинг учун унинг колониялари кўк ранга бўлган. Шартли – патоген микроорганизм ҳисобланади.

Кўп псевдомонадалар озиқ-овқат маҳсулотларини сақлашнинг паст ҳароратларида (2-4°C) ривожлана оладиган психрофиллар ҳисобланади. Псевдомонадалар актив протеолитик ва липолитик ферментларга эга бўлиб, оксил ва ёғларнинг парчаланишига сабаб бўладилар. Бу эса ўз навбатида гўшт, сут ва балиқ маҳсулотларининг тез айнишига олиб келади.

14.8. *Bacillus* тури

Bacillus тури *Bacillaceae* оиласига мансубдир. Ушбу турдаги бактериялар турли узунлик ва қалинликдаги таёқчалардан иборат. Улар граммусбат, кўпинча ҳаракатчан, эндоспоралар ҳосил қилади. Аэроб ва факультатив

анаэроблар. Хемоорганотрофлар, метоболизмнинг нафас ёки бижғиш турига эга.

Bacillus subtilis (пичан таёқчаси) – ингичка, қисқа (0,5-2,5)х(3,0-5,0) мкм катталикдаги граммусбат таёқчалар. Хужайралар перитрихиял равишда жойлашган хивчинлар ҳисобига ҳаракатчандир. Споралар овал, ўлчамлари 0,6 дан 0,9 мкм гача, хужайранинг ичида марказий ўринда турадилар (14.8 а-расм).

Ўғш-пептон агариди *B. Subtilis* қуруқ буришган ёки барқутсимон чегаралари текис, рангсиз ёки пуштироқ колониялар ҳосил қилади.

Пичан таёқчаси споралари ҳароратга чидамли, қисқа муддатли стериллашни кўтарди. Ўсишнинг оптимал ҳарорати 25-37°С. Пичан таёқчаси чиритувчи бактерияларга мансуб бўлиб, у сут, ўғш оксилларини айнитувчи актив протеазаларга, шунингдек, ноннинг “картошка касаллиги”ни келтириб чиқарувчи амилазаларга эга.

Bacillus megaterium – (ер таёқчаси, лотинча *terra* – ер) – йирик, учлари думалок (5-7)х(1,2-1,5) мкм ўлчамдаги уруғсимон таёқчалар. Улар узун занжир бўлиб жойлашган. Споралар эллиптик бўлиб, хужайра марказида жойлашган (14.8 б-расм).

Зич озуқа муҳитида йирик, силлик, сидирға ёки ялтироқ колониялар ҳосил қилади. Уларнинг чегаралари тўлқинсимон – попукли, кулранг-ок. Фаол протеазалир мавжуд, углеводларни парчалаб, кислота ҳосил қилади.

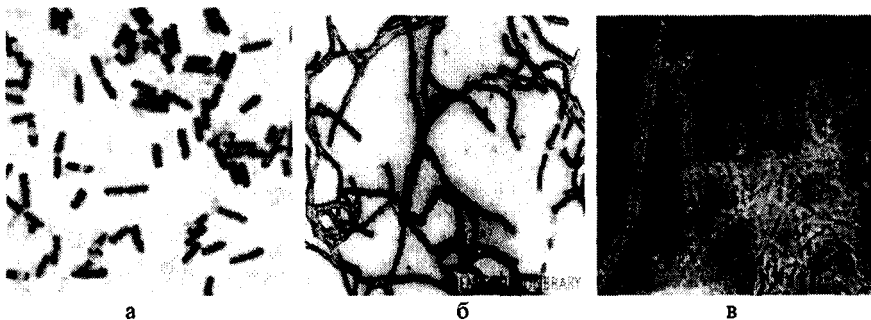
Bacillus mycoides (замбуруғсимон таёқча) – (5-7)х(0,8-1,2) мкм ўлчамдаги майда таёқчалар. Цитоплазмада вакуоли ва захирадаги озуқа моддаларининг гранулалари бор. Споралар овал шаклда (14.8 в-расм)

Озуқа агариди замбуруғ ўсишини эслатадиган колониялар ҳосил қилади. Резоид ёки мицелисимон бўлиб, агар юзаси бўйлаб тақсимланади. Замбуруғсимон таёқча актив протеазаларга эга, аччиқ пептидлар ҳосил қилиб, оксилларни парчалайди.

Bacillus cereus (лотинча – *cera* – мумли) – (3-5)х(1,0-1,5) мкм ўлчамдаги калта семиз хужайралар, яқка ёки занжир бўлиб жойлашган. Споралао овал

(1,5x0,9) мкм, субтерминал равишда жойлашган (марказдан хужайра четига силжиган).

Озука агаридаги колониялар мумсимон, семиз, тахланган марказли, сидирға ва ризоид тўлкинсимон чегаралари бор. Баъзида майда ғадир-будр попукли чегаралари бор, улардан ингичка иплар тарқалади.



14.8-расм. *Bacillus* тури:

a – *Bacillus subtilis*; *б* – *Bacillus megaterium*; *в* – *Bacillus mycoides*

B. cereus ҳавfli микроб саналади. Чунки у билан контаминация бўлган озиқ-овқат маҳсулотлари ошқозон-ичак системасининг зарарланишига олиб келиши мумкин.

14.9. *Clostridium* тури.

Clostridium тури *Clostridiaceae* оиласига киради. Таёкчасимон бактериялар, граммусбат, ёшлигида кўпинча ҳаракатчан (перитирхлар). Хужайра диаметридан катта эндоспоралар ҳосил қилади.

Қатъий анаэроблар. Клостридияларнинг баъзи намоёндалари **сахаролитик** бўлиб, улар ёғли-нордон ва ацетон-бутил бижғишда шакарларни парчалайди. Бошқалари протеолитик бўлиб, чириш жараёнларини келтириб чиқаради. Баъзи клостридиялар озиқ-овқатдан захарланишга олиб келади: ботулизм – кўзгатувчиси *Clostridium botulinum*, токсико-инфекциялар – кўзгатувчиси *Clostridium perfringens*. Кластридиялар орасида инсон учун патоген (*Clostridium*

septicum, *C. perfringens*, *C. novyi*) – газли гангрена қўзғатувчиси ва қокшол қўзғатувчиси - (*Clostridium tetani*) учрайди.

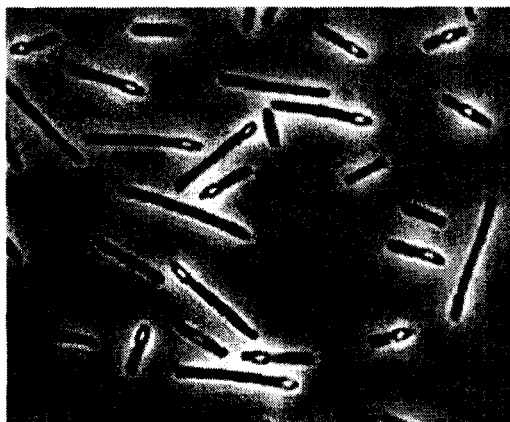
Clostridium butyricum – ёғли нордон бактериялар. (0,5-1,5)х(5-12) мкм ўлчамдаги йирик таёкчалар, гарммусбат, спора ҳосил бўлгунича ҳаракатчан. Споралар терминал ёки субтерминал равишда жойлашган. Спорали хужайралар гурзи, теннис ракеткаси ёки қошиқ кўринишига эга.

Ёғли нордон бактериялар сахаролитик клостридиялар гуруҳига кирадilar; улар углеводларни ёғ, уксус, чумоли кислотаси ва кўп миқдорда газ ҳосил қилиб бижғитади. Шунинг учун улар озик-овқат маҳсулотларида аччиқ таъм, консерваларнинг ичида газ тўпланиб қолиши, пишлоқнинг шишиб қолишини келтириб чиқаради.

Clostridium perfringens – (1-2)х(5-8) мкм ўлчамдаги йирик таёкча, клостридиялар ҳаракатсиз, инсон ва хайвонлар танасида капсулалар ҳосил қиладилар. Споралар терминал ёки субтерминал равишда жойлашган (14.9-расм).

Хемоорганотрофлар, бижғиш туридаги метаболизмга эга.

Зич муҳитларда бактериялар майда, силлиқ ёки тишчали чегараларига эга думалоқ колониялар ҳосил қилади. Қонли агарда ўсиш жараёнида перфрингенс таёкчалари колониялари думалоқ, силлиқ, кулранг, кейинчалик яшил тусга кирувчи ва β - гемолиз зонаси билан чегараланган. Бу турдаги бактериялар агрессивлик ферментлар синтез қилади: лецитиназа, кологеназа, гиалуронидаза ва бошқалар.



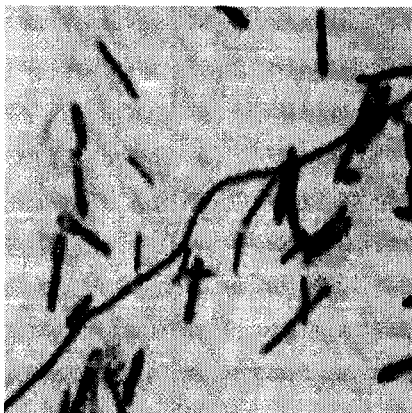
14.9-расм. *Clostridium perfringens*

Перфрингенс таёқчаси сахаролитик клостридиялар турига киради. Бу тур сутнинг куйка ҳосил қилиб ивишига сабаб бўлади. Споралар ҳароратга чидамли 2 соат давомида қайнатишга бардош беради. Сульфитредутцирловчи хусусиятга эга. Бу турнинг баъзи серологик кўринишлари (А ва С) эндотоксинлар ҳосил қилади, шунинг учун озик-овқат токсикoinфекцияларини келтириб чиқариши мумкин.

Clostridium putrificum – ҳужайра учиди жойлашган овал спораларга эга йирик гарммусбат таёқча. Микроб протеолитик бактериялар гуруҳига киради, оксилларни водородсульфид ва аммиак ҳосил бўлиши билан парчалайди “чириётган пишлоқ” ҳидини беради.

Clostridium sporogenes – узунлиги 3-4 мкм ва диаметри 0,9 мкм, учлари думалоқ ҳаракатчан таёқча. Йирик овал споралар ҳужайра марказида жойлашган. Спораларнинг тез ҳосил бўлиш хусусияти мавжуд (ўсишнинг дастлабки суткаларида). Углеводларни кислота ва газ ҳосил қилиб бижғитади.оксилларни парчалашда кўп микдорда водород сульфидининг ажралиши кузатилади.Ўсишнинг оптимал ҳарорати 35⁰С дан 40⁰С гача, минимал ҳарорат 8⁰С. Гўшт, балиқ, сабзавот консерваларининг айланишига сабабчи бўлади.

Clostridium botulinum-(3,4-8,6)х(1,0-1,3) мкм. ўлчамдаги йирик таёқчалар, граммусбат,спора ҳосил бўлгунига қадар ҳаракатчан, капсула ҳосил қилмайди. Споралар терминал равишда жойлашган. Спорали хужайралар теннис ракеткаси,қайиқча, қошиқ кўринишига эга(14.10 расм).



14.10 расм. *Clostridium botulinum*

C. botulinum *C. Botulinum* иккита экзотоксин: нейротоксин ва гемолизин ҳосил қилади. Озиқ-овқат маҳсулотларида нейротоксиннинг йиғилиб қолиши оғир заҳарланишга, ҳатто ўлимга олиб келиши мумкин.

Назорат саволлари.

1. Юқори протеолитик фаолликка эга бактериялар озиқ-овқат маҳсулотларининг қандай турдаги айнишларига сабабчи бўлади?
2. Таърифи келтирилган бактериялардан қайсилари озиқ-овқатдан заҳарланишга олиб келади?
3. Бацилла ва клостридиялар ҳаво кислородига қандай муносабатда бўладилар.
4. Эндоспоралар ҳосил қилувчи ва ҳосил қилмайдиган бактериялар турларини айтинг
5. Кўрсатилган турларнинг қайсилари *Enterobacteriaceae* турига мансуб?

15. ОЗИҚ-ОВҚАТ МАҲСУЛОТЛАРИНИНГ МИКРОБИОЛОГИК ТЕКШИРУВИ

15.1. Мезофил аэроб ва факультатив анаэроб микроорганизмлар миқдорини аниқлаш (МАФАНММ)

Озиқ-овқат маҳсулотларининг микробиологик текшируви МАФАНММни аниқлаш мақсадида уларни Петри чашкаларидаги озуқа муҳитлари (гўшт-пептон агар)га экиш ёки микроорганизмларнинг алоҳида гуруҳларини селектив озуқа муҳитларига экиш билан амалга оширилади. Микроорганизмларнинг миқдори 1 см³ суюқ маҳсулотда ёки 1 гр. зич маҳсулотда аниқланади.

Ўрта пробиркани танлаш. Маҳсулот партиясини текширишда ўрта проба танланади. Турли озиқ-овқат маҳсулотлари учун танланадиган ўрта пробалар нормаси ва уларни танлаш қоидалари ўрнатилган. Лекин барча ҳолларда текшириладиган маҳсулот бегона микроорганизмлар билан контаминация қилинишига йўл қўймаслик учун барча шароитлар яратилиши керак.

Текшириш жараёнида суюқ ва яримсуюқ маҳсулотлар (сут, сметана, соуслар ва бошқ.) яхшилаб аралаштирилади ва стерил идишга 50-100 см³ ҳажмдаги стерил чўмич билан олинади. Зич маҳсулотлар (гўшт, колбаса, балиқ, кулинария маҳсулотлари ва бошқ.) пробалари маҳсулотларнинг турли қатламларидан олинади. Текширилувчи жойларнинг юзаси аввал қиздирилган пичоқ билан куйдирилади ва шу из бўйича стерил скальпель билан кесилади. Кесилга жой стерил пинцет билан очилиб, стерил қайчи билан маҳсулотнинг кичкина бўлаги олинади. Шундай тарзда турли қисмлардан олинган намуналар майдаланиб, стерил идишга солинади ва улардани ўрта проба тузилади.

Сариёғ, творог, пишлок каби маҳсулотларнинг ўрта пробасини танлашда маҳсулотнинг бир четидан бошқа четига чуқур ва қиялатиб киргизиладиган стерил шпатель – ичи ковак стержендан фойдаланилади. Кейин стерил скальпель билан танланган пробанинг бир неча жойида бўлакчалар олиниб, майдаланади ва ва стерил идишга солинади.

Пробани текширишга тайёрлаш. Зич маҳсулотларни текширишда ўрта пробадан 1 грамдан 10 грамм микдоргача намуна олиниб стерил хавончага солинади ва яхшилаб эзилади. Агар маҳсулот жуда зич бўлса, у олдин киздирилган кварц куми солинган ховончада эзилади. Эзилган маҳсулот 90 дан 99 см³ гача микдордаги физиологик эритма (0,5% ли натрий хлорид эритмаси) солинган колбага солинади. Колба 5 дақиқа давомида эҳтиёткорлик билан чайқатилади. Колбада маҳсулотнинг биринчи аралашмаси (1:10) ҳосил бўлади. Ундан кейинги аралашмалар тайёрланади.

Сариеғ намунаси 45⁰С дан юкори ҳароратда сув хаммомида эритилади. Шундан сўнг 9см³ физиологик эритмага стерил пипетка билан 1 см³ маҳсулот солиниб, 1:10 аралашма тайёрланади.

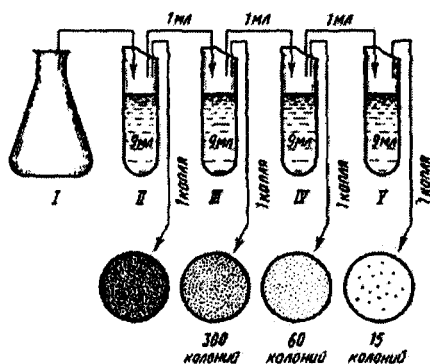
Суюк ва яримсуюк маҳсулотларни текшириш учун олинган ўрта пробадан яхшилаб аралаштирилгандан сўнг стерил пипетка билан 1 см³ маҳсулот олиниб, 9 см³ стерил физиологик эритмаси бор бўлган пробиркага солинади.

Маҳсулотнинг биринчи аралашмаси янги стерил пипетка билан яхшилаб аралаштирилади. Бунда олинга эритма пипеткага олиниб ва ундан чиқарилиб турилади. Бу жараён 3-5 мартаба бажарилиб, худди шу пипетка билан 1 см³ суспензия олинади ва 9см³ стерил физиологик эритмали иккинчи прообиркага солинади. Шундай қилиб иккинчи аралашма ҳосил бўлади. Пипетканинг устидаги микроорганизмлар ювилиб кетмаслиги учун уни суюқликка ботириб бўлмайди.

Янги стерил пипетка билан иккинчи эритма яхшилаб аралаштирилади, эритмадан 1 см³ олиниб, 9 см³ стерил сув солинган кейинги пробиркага ўтказилади ва учинчи эритма ҳосил қилинади (1:1000). Худди шу услуда керакли натижа олингунича кейинги аралашмалар тайёрланади.

Диққат! Ҳар бир эритмани тайёрлаш учун алоҳида стерил пипетка ишлатилади. Бу қонунга риоя қилмаслик нотўғри натижага олиб келиши мумкин.

Петри чашкаларига экиш. МАФАНММни аниклаш учун зич мухитларга чуқурлатиб экиш усули қўлланилади. Экиш схемаси 15.1-расмда келтирилган. Чашкалар қопқоқларида стеклограф билан текширилаётган вариант ва аралашма белгиланади. Ҳар бир аралашма камида 2-3 та параллел чашкаларга экилади. Аралашмалар шундай танланиши керак-ки, чашкада 30 дан 300 тагача колониялар ўсиб чиқсин. Стерил пипетка билан мос аралашма суспензиясидан 1 см³ олиниб, 2-3 та стерил Петри чашкаларига солинади. Эритма суспензияси солингандан сўнг чашкаларга 15 минутгача бўлган муддатда озуқа мухитлари солинади. Бунинг учун спиртовка олови устида ичида аввал қиздириб, кейин 45-50°С гача совтитлган озуқа мухити солинган пробирка ёки колбанинг тикини олиб ташланиб, четлари куйдирилади. Кейин чашканинг қопқоғи колба бўйни кирадиган қилиб очилади ва эҳтиёткорлик билан 10-15 см³ озуқа агари солинади. Унинг қатлами 5 мм қалинликда бўлиши керак. Чашка қопқоқ билан ёпилади ва шу заҳоти айланма ҳаракатлар билан экилган материал солинган озуқа мухити аралаштирилади ва мухит совуши учун 10-15 дақиқа горизонтал ҳолда қолдирилади. Экилган намунали чашкаларнинг тескариси ўчирилади ва 37±1°С ҳароратда 24-48 соат мобайнида термостатда сақланади.



15.1-расм. МАФАНММни аниклаш учун маҳсулотни экиш схемаси.

Ўсиб чиққан колонияларни ҳисоблаш. Инкубациядан кейин 30 тадан 300 тагача колониялар ўсиб чиққан чашкалар ташланади, улар визуал тарзда ёки

колонияларни ҳисобловчи маҳсус асбоб ёрдамида саналади. Колонияларни ҳисоблашда чашкалар ўтаётган ёруғликда кўрилади ва саналган колониялар сийёҳ ёки туш ёрдамида белгиланади. Агар максимал аралашмали чашкада 300 тадан ортиқ колония ўсиб чиқса, уларни лупа ёки оргстеклодан ясалган 1 см томонли квадрат тўр ёрдамида ёнлама ёритилганликда кўриш мумкин. Колонияларни ҳисоблаш камида 20 квадратда амалга оширилади, уларнинг 1 см²даги ўртача сони топилади ва муҳитнинг чашкадаги юзаси катталигига кўпайтирилади.

1 см³ (ёки 1 г) маҳсулотдаги микроорганизмлар миқдори МАФАнММ ўсиб чиққан колониялар сонининг аралашма кўрсаткичи (n) га кўпайтмасига тенг:

$$\text{МАФАнММ} = N \cdot 10^n \text{ КОЕ/см}^3$$

Изоҳ. Анаэроб микроорганизмлар чашкали усул билан аниқланмайди, чунки уларни ўстириш учун анаэроб шароитлар яратиш керак. Анаэроблар культивацияси анаэрозатларда амалга оширилади (4.1-расмга қаранг) ёки редуцирловчи моддалари мавжуд бўлган озук муҳитлари ишлатилади.

15.2. Озиқ-овқат маҳсулотларида ичак таёқчалари гуруҳи бактериялари (ИТГБ)ни аниқлаш.

Озиқ-овқат маҳсулотларида ИТГБни аниқлаш ГОСТ Р 50474-93 га кўра аниқланади. Озиқ-овқат маҳсулотлари. Ичак таёқчалари (колиформ бактериялари) гуруҳи бактериялари тури ва сонини аниқлаш усуллари. ИТГБларни аниқлаш усули маҳсулот маълум миқдори суюқ озук муҳитларига экилганида газ ва кислотанинг ҳосил бўлишига асоаланган. Бу муҳитлар таркибида лактоза бўлиб (Кесслер муҳити), кейинчалик ўсиб чиққан микроорганизмлар морфологик ва культурал белгиларига кўра ичак таёқчалари гуруҳига кириши тасдиқланади.

ИТГБ мавжудлигини текшириш бир неча боскичда боради:

I-босқич – маҳсулот аралашмаларини тайёрлаш. Агар маҳсулот зич бўлса (колбаса, пишлоқ, сариёғ, творог ва бошқ.), натижада унинг маълум массасида (грамм) ИТГБ йўқлиги таасдиқланади. Агар маҳсулот суюқ бўлса (сут, сут-катиқ ичимликлари, сок ва бошқ.) унда ИТГБлар унинг маълум ҳажмида бўлиши керак (см^3 ёки дм^3).

II-босқич – маълум миқдордаги маҳсулот ёки унинг аралашмасини Кесслер муҳитига экиш. Кесслер муҳити поплавок (бир учи кавшарланган шиша найча) солинган пробирка ёки колбаларга солинади. Стериллашдан сўнг поплавок муҳит билан тўлдирилади.

Кесслер муҳити мавжуд пробиркаларга маҳсулотнинг мос аралашмалари (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}) 1 см^3 миқдорда солинади ва $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ҳароратда термостатга қўйилади. 24 соат инкубация қилинганидан сўнг намуналар кўриб чиқилади ва поплавокда газ ҳосил бўлиши, муҳитнинг бинафшарангдан сариқ-яшил рангга ўзгариши қайд этилади. Қайси аралашмаларда газ ҳосил бўлгани ёзиб олинади.

III-босқич – Кесслер муҳитида ўсиб чиққан микроорганизмлар ИТГБга тегишли эканини тасдиқлаш. Кесслер муҳити солинган пробиркалардан бижғитилганларини танлаб, сиртмоқ билан изоляцияланган колониялар олиш учун Эндо зич муҳитига экилади. Бунинг учун Петри чашкалари тубини қалам билан 4-8 та секторларга бўлинади. Ҳар бир пробиркадан алоҳида секторга намуна экилади. Бактериологик сиртмоқ билан пробиркадан текширилаётган материалнинг минимал миқдори олинади ва секторда зигзагсимон штрих усули билан экилади. Бунда сиртмоқ агар юзасидан узилмайди ва унинг бутунлиги бузилмайди. Петри чашкаларига керакли ёзувлар ёзилиб, $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ҳароратда 18-24 соат термостатга қўйилади (копқоклари устида).

Инкубациядан сўнг чашкалар кўриб чиқилади. Ичак таёқчаси гуруҳидаги бактериялар Эндо муҳитида ялтироқ ёки ялтироқ бўлмаган қизил ёки пушти колониялар ҳосил қилади. Бактериялар ўсишининг бундай табиати фуксин индикаторини тиклайдиган кислота ҳосил бўлиши ва лактозанинг бижғиши

билан тушунтирилади. Фуксин индикатори колонияларни кизил рангга киритади.

Типик колониялардан Эндо муҳиtida препаратлар тайёрланади, улар Грам усулида бўялади ва микроскопда кўрилади. Агар препаратда майда грамманфий спора ҳосил қилмайдиган таёқчалар топилса, бир вақтнинг ўзида оксидаз тест ўтказилади. Маҳсулотда топилган микроорганизмлар ИТГБга мансуб эканлиги ҳақида ҳулоса экилган намуналарда гармманфий, споралар ҳосил қилмайдиган, лактозани $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ҳароратда кислота ва газ ҳосил қилиб бижғитадиган, тестга жавоб бермайдиган таёқчалар топилиши асосида қилинади. Бунда маҳсулот массаси (граммларда) ёки ҳажми (cm^3 ларда) кўрсатилади. Эндо муҳиtida ИТГБларга хос бўлган колониялар бўлмаса, маҳсулот ичак таёқчалари билан зарарланмаган деб ҳисобланади.

15.3. Ачитқи ва моғор миқдорини аниқлаш.

Озиқ-овқат маҳсулотларида ачитқи ва моғор миқдорини аниқлаш учун мос аралашмаларни Петри чашкаларига солиб, устида эриган ва $45-50^{\circ}\text{C}$ гача совитилган сусло-агар (СА) ёки Сабуро муҳити қуйилади.

Чашкалардаги аралашма айланма ҳаракат билан аралаштирилади ва 10-15 дақиқа совитилади. Шундан сўнг $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ ҳароратдаги термостатга 2-3 сутка қуйилади. Инкубациядан сўнг ўсиб чиққан моғор ва ачитқи колониялари миқдори ҳисобланади. Натижа $\text{КДЕ}/\text{cm}^3$ (ёки грамм)ларда ифодаланади.

Назорат саволлари

1. МАФАнММ нима?
2. Микроорганизмлар миқдорини аниқлашда нима учун озиқ-овқат маҳсулотининг аралашмаси тайёрланади?
3. МАФАнММ, ачитқи ва моғорларни аниқлаш учун қандай озука муҳитлари ишлатилади?

4. Озиқ-овқат маҳсулотларида ИТГБни аниқлаш қандай босқичлардан ташкил топган?
5. Озиқ-овқат муҳитларида ИТГБни аниқлашда қандай муҳитлар ишлатилади?
6. ИТГБнинг Кесслер муҳитида ўсиши қайси белгиларга кўра аниқланади?
7. Эндо муҳитида ИТГБ колониялари қандай кўринишга эга?
8. Қайси ҳолда озиқ-овқат маҳсулотида ИТГБ мавжуд деган хулоса берилади?

ИЛОВАЛАР

Микробиологик амалиётда ишлатиладиган озуқа муҳитлари ва реактивлар

Кўп озуқа муҳитларининг асоси – гўшти суви, ачиткилар учун пиво суслоси, озикланишга муҳтож сут бактериялари учун – гидролизланган сут, баъзилари учун – жигар қайнатмаси, Хоттингер қайнатмаси ва бошқ.

1. Мезофил ва термофил аэроб ва факультатив-анаэроб микроорганизмларни культивация қилиш учун муҳитлар.

1.1. Гўшт-пептон бульон (ГПБ)

ГПБни тайёрлаш учун аввал гўшти суви тайёрланади. Бу мақсадда суяк, ёғ, пайлари олиб ташланган мол гўшти майдаланади ёки киймалагичдан ўтказилади. Майдаланган гўштга 500 грамм гўшт – 1дм³ суви ҳисобида суви қуйилади ва 12-18 соатга музлатгичга қўйилади. Эртасига аралашма оловда секин қиздирилади ва 15-20 дақиқа давомида вақти-вақти билан аралаштирилиб, қайнатилади. Совиган масса пахта-докали филтрдан ўтказилади ва бошланғич ҳажмгача яна суви қуйилади. Олинган гўшти суви 1% пептон, 0,5 % натрий хлорид, керакли микдорда рН олиш учун тўйинган натрий гидрокорбонат ёки 10%ли натрий гидроксиди эритмаси қуйилади. 121±1⁰С ҳароратда 15-20 дақиқа давомида стерилланади.

1.2. Гўшт-пептонли агар (ГПА)

1 дм³ микдордаги ГПА га стериллашдан олдин 20 грамм агар қўшиб, агар бутунлай эриб кетгунича паст оловда қиздирилади. Иссиқ ГПА пахта-докали филтёр орқали ўтказилади, рН 7,2-7,4 оралиғида ўрнатилади, колба ёки пробиркаларга солиниб, 20 дақиқа давомида 121±1⁰С ҳароратда стерилланади.

ГПАни микробиологик саноат корхоналарида ишлаб чиқариладиган куруқ озука агаридан тайёрласа бўлади. Бунинг учун 50 грамм куруқ озука ағари кукуни 1дм³ совуқ водопровод суви солинган ёпиқ идишга солинади ва паст оловда агар бутунлай эриб кетгунича 1-2 дақиқа давомида аралштирилиб қайнатилади.

1.3.Глюкоза ва ачитқи экстракти гўшт пептонли агар.

1дм³ гўшт пептон бульони (агар)га стериллашдан олдин 10 грамм глюкоза ва 2 грамм ачитқи экстракти (ёки 10 см³ эритмаси) қўшилади. Мухит рН 7,0 дан 7,2 гача оралиқда ўрнатилади ва 121±1°С ҳароратда 20 дақиқа давомида стерилланади.

1.4.Ачитқи экстракти

100 грамм прессланган нон ачиткиси майдаланиб, устидан 500 см³ микдордаги қайнаб 60°С гача совитилган водопровод суви қуйилади. Аралашма 58-60°С ҳароратдаги термостатга 72 соатга қўйилади ва ҳар куни 1-2 маротаба силкитиб турилади. Бунда ачитқи ҳужайраларининг автолизи содир бўлади, ҳужайра ферментлари мураккаб моддаларни гидролизлайди ва ачитқи массаси суюлади. Ачитқи экстракти филтрланади озгина порцияларга ажратиб қуйилади ва 121±1°С ҳароратда 15 дақиқа давомида стерилланади. Ишлатишга тайёр экстрактни музлатгичда сақлаган маъқул.

2. Ачитқи ва моғор замбуруғларини культивация қилиш учун муҳитлар

Озик-овқат маҳсулотларидаги ачитқи ва моғор замбуруғларини аниқлаш ва микдорий ҳисоблаш учун озука муҳитлари ишлатилдан. Уларнинг селективлигига рНнинг паст микдори ва бактериал флорани камайтириш учун кенг таъсирли антибиотиклар (тетрациклин, левомисетин, неомицин ва бошқалар)ни киритиш билан эришилади.

2.1. Сабуро мухити

1 дм³ дистилланган сувга 18 грамм агар қўшилади ва уни 30 дақиқага қолдириб, сўнг 40 грамм глюкоза ва 10 грамм пептон қўшилади. Аралашма паст оловда агар бутунлай эриб кетгунича қиздирилади. Эриган мухит пахта-докали филтрдан ўтказилиб, рН шундай ўрнатилади-ки, стериллашдан кейин унинг микдори 6,5-6,6 ни ташкил этсин. Колбаларга қуйилади ва $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ҳароратда 15 дақиқа давомида стерилланади.

Сабуро мухити антибиотикли мухитлар тайёрлашга асос сифатида ишлатилади. Антибиотиксиз мухит консерва маҳсулотларининг саноатдаги стериллигини текширишда қўлланилиши мумкин.

2.2. Хмель солинмаган пиво суслоси.

Тайёр хмель солинмаган пиво суслоси қуруқ моддалар улуши 7-8% бўлгунича сув билан аралаштирилади. Колба ёки пробиркаларга солинади ва 116 ± 1 ҳароратда 20 дақиқа давомида стерилланади.

2.3 Сусло-агар

1дм³ пиво суслосининг сув билан аралашмасига 20 гр агар қўшилади. Мухит сув ҳаммомида эритилади ва пахта-докали филтр орқали ўтказилади. Филтрдан ўтказилган аралашма колба ёки пробиркаларга солиниб 116°C ҳароратда 15 дақиқа давомида стерилланади.

3. Ичак таёқчаси гуруҳи бактерияларини культивация қилиш учун мухитлар.

3.1 Эндо мухити.

100см³ гўшт – пептонли агар (рН-7.4) эритилиб, 70°C ҳароратга совитилади. Стерил пробиркада озгина дистилланган қайнаган сув билан эритилган 1 гр лактоза қўшилади.

Алоҳида пробиркаларда 2-3 см³ асосий фуксиннинг тўйинган спиртли эритмаси, 10% ли натрий сульфит эритмасининг 10см³ микдори тайёрланади.

Стерил пробиркага 1 см³ фуксин ўлчаб солинади ва фуксининг ранги ўчгунича (оч пушти ранг) натрий сульфат эритмаси қўшилади. Тайёрланган аралашма эриган агарга қуйилади, яхшилаб аралаштирилиб, чашкаларга солинади. Иссиқ агар оч пушти рангда бўлиб, қотганида рангсиз бўлиб қолади.

Эндо мухити микробиологик саноатда курук кукун кўринишида ишлаб чиқарилади. Мухит ишлатиладиган кунда ёрликда кўрсатилганидек тайёрланади.

3.2 Эйкманнинг глюкозопептон мухити.

100см³ сувда 10 гр пептон, 5 натрий хлорид эритилади, аралашма қайнагунича киздирилади, филтрланади, 10 гр глюкоза қўшилади, рН 7.4-7.6 микдорда ўрнатилади, поплавоклар пробирка ёки флаконларга қуйилади ва 0.05 МПа босим остида 20 дақиқа давомида стерилланади.

3.3 Кесслер мухити.

1 дм³ 10 гр пептон, 50см³ бука ўт пуфаги суюклиги қўшилади. Аралашма пептоннинг тўлиқ эригунича аралаштириб қайнатилади, пахта орқали филтрланади, 2.5 лактоза эритилади, ҳажм 1дм³ гача оширилади ва мухит реакцияси ўрнатилади (рН 7.4-7.6). кейин 2 см³ гецианвиолет қўшилади, поплавокли пробирка ёки колбаларга қуйилади ва 121⁰С ҳароратда 15 дақиқа давомида стерилланади.

Кесслер мухити микробиологик саноатда курук кукун кўринишида ишлаб чиқарилади. У лабораторияда ёрликда кўрсатилганидек тайёрланади.

3.4 Симмонс мухити

Бу мухит энтеробактерияларнинг цитратларни йўқотиш қобилитини аниқлашга мулжалланган.

Мухит таркиби.....г/дм³
Аммони фосфати1.6

Динатри фасфат.....	1.1
Магний сульфат.....	0.2
Натрий цитрат.....	3.2
Натрий карбонат.....	0.05
Кўк бромтимол (сувда эрувчи).....	0.05
Натрий хлорид.....	6.0
Агар.....	9.0

Тайёрлаш мухит компонентлари дистирланган сувда эритилади, агар тўлиқ эригунича 2-3 дақиқа давомида қайнатилади. Мухитнинг рН микдори 7.0-7.2 . мухит пробиркаларга 4 см³ микдорда солиниб, 112 °С ҳароратда 20 дақиқа давомида стерилланади. Ишлатишдан аввал агар сув ҳаммомида пробиркаларда эритилади ва эгилган ҳолда совитилади. Тайёр мухитнинг ранги яшил зайтун рангида бўлади.

Экиш ва натижаларни ўрганиш. Симмонснинг цитратли агарига микроорганизмлар ўстирилган мухит мавжуд бўлмаган экиш материалнинг кичик микдори қўшилади. Назорат пробиркасига ҳеч нарса экилмайди. Экилган намуналар 37°С ҳароратда инкубация қилинади. натижалар ҳар 24 соатда 5 сутка давомида қайд қилиб борилади. Цитратларни йўқотиш қобилятига эга бўлган микроорганизмлар Симмонс мухитида ўсади ва унинг рангини яшилдан кўкка ўзгартиради (мусбат реакция) , цитратларни йўқотиш қобилятига эга бўлмаган микроорганизмлар бу мухитта ўсмайди ва унинг рангини ўзгартирмайди (манфий реакция).

3.5 Мак-Конки агари.

Мухит *Enterobacteriaceae* оиласи бактерияларини аниқлаш учун ишлатилади. Мухитта мавжуд бўлган ўт суюқлиги ўт тузлари ва кристалл бинафшаранг микрофлоранинг ўсишини камайтиради.

Мухит таркиби

Пептон	1,5
Желатиннинг панкреатит гидролизати	17,0
Лактоза	10,0
Натрий хлорид	5,0
Ўт кислоталарининг тузлари	1,5
Кристалл бинафшаранг	0,001
Нейтрал қизил	0,03
Агар	13,5

Тайёрлаш ингредиентлар сувда аралаштирилиб, 1 дақиқа давомида қайнатилиб, эритилади. Мухит рН миқдори 7.1 ± 0.2 қилиб ўрнатилади. Мухит қолбаларга солинади, пахта-докали тиқинлар билан беркитилади, устидан қоғоз қопқоқлар ёпилади ва 121°C ҳароратда 15 дақиқа давомида стерилланади.

Экиш ва натижаларни ўрганиш. Изоляцияланган колонияларни олиш учун экиш штрих усули билан амалга оширилади. Петри чашкалари 37°C ҳароратда 24 соат давомида инкубация қилинади.

Escherichia coli – колониялари қизил; *Klebsiella mobilis* – пушти; энтерококклар – қизил майда, думалок; стафилококклар – оч пушти; ношаффоф; *Pseudomonas aeruginosa* – яшил-жигарранг, флюоросценцияланувчи.

4. Анаэробларни культивация қилиш учун мухитлар.

4.1. Вильсон-Блер мухити. Мухит мезофил анаэроб микроорганизмларнинг хусусиятини, хусусан озиқ-овқат маҳсулотларидаги *Clostridium perfringens*ни аниқлаш учун ишлатилади.

Мухит асосининг таркиби см^3

Темир аммонийли аччиқтош – 50дм^3 концентратияли эритма.....1

Натрий сульфиди – 200 дм ³ концентратияли эритма.....	10
10 дм ³ глюкоза солинган гўшт-пептонли агар	100

Тайёрлаш. Темир аммонийли аччиқтош ва натрий сульфити эритмалари стерил дистилянган сувда тайёрланади. Натрий сульфити эритмаси оқувчан бўгда 1 соат давомида стерилланади. Глюкоза қўшилган 10 мл эриган ва 80°С ҳароратгача совитилган ГПАга 10 мл натрий сульфити ва 1 мл темир аммонийли аччиқтош эритмаси қўшилади. Мухит рН миқдори 7,5-7,8 қилиб ўрнатилади. Мухит Петри чашкаларига қуйилади.

Экиш ва натижаларни ўрганиш. Инфицирланган материални экиш ва йиғувчи мухитдан экиш икки қатламли усул билан амалга оширилади. Сульфитредуцирловчи клостридиялар темир сульфиди ҳосил бўлиши натижасида қора колониялар ташкил қилади.

5. Грам усули билан бактерияларни бўйаш учун бўёқлар ва реактивлар.

5.1. Бинафшаранг генцианнинг фенолли эритмаси. Бинафшаранг генциан – 1 грамм; 96%ли этанол – 10 см³; кристаллик фенол – 2 грамм; дистилянган сув – 100 см³ гача.

5.2. Люголь эритмаси. Калий йодит – 2 грамм; кристаллик йод – 1 грамм; дистилянган сув – 300 см³ гача. Аввал 5 см³ сувда калий йодитининг концентратияланган эритмаси тайёрланиб, унда йод эритилади. Кейин 300 см³ гача сув қўшилади.

5.3. Пфейфер фуксини. Циль фуксинининг сувли эритмаси; Циль карбол фуксинидан 1 см³ ва 9 см³ дистилянган сув.

5.4.Циль фуксини. Циль фуксинини тайёрлаш учун 1 грамм асосий фуксин 96% ли этанолнинг 10см³ миқдорида эритилади ва сувда эритилган 5 грамм фенол ва бир неча томчи глицерин қўшилади. Дистилянган сув билан эритма ҳажми 100 см³ гача қўпайтирилади ва бир неча кунга қолдирилади. Ишлатишдан аввал у филтрдан ўтказилади.

АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ

1. Слюсаренко Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. – М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. – 208 с.
2. Красникова Л.В., Гунькова П.И. Общая и пищевая микробиология: Учеб. пособие. Часть I. – СПб.: Университет ИТМО, 2016. 134 с.
3. Артемьева С.А. и др. Микробиологический контроль мяса животных, птицы, яиц и продуктов их переработки: Справочник.–М.: КолосС, 2003.–288 с.
4. Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства: Справочник. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.
5. Ганина В.И., Королева Н.С., Фильчакова С.А. Техническая микробиология продуктов животного происхождения: Учеб. пособие. – М.: ДеЛи принт, 2008. – 352 с.
6. Зимоглядова Т.В., Карташова И.А., Шабалдас О.Г. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие. – М.: Колос; Ставрополь: АГРУС, 2007. – 148 с.
7. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. Пер. с англ. /Под ред. Дж. Хоулта и др. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
8. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для вузов / Под ред. В.К. Шильниковой. 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.

