

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

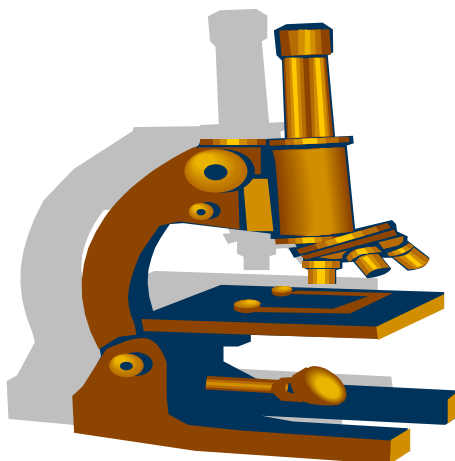
***JIZZAX POLITEXNIKA INSTITUTI***

***“KIMYO VA KIMYOVIY TEXNOLOGIYA”  
KAFEDRASI***

***“BIOTEXNOLOGIYA ASOSLARI” FANIDAN***

# ***LABORATORIYA ISHI***

***MAVZU : MIKROORGANIZMLAR SONINI HISOBGA OLISH VA  
O'STIRISH USULLARI***



***J I Z Z A X   -   2 0 1 0***

## **LABORATORIYA MASHG'ULOTI – № 4**

### **Mavzu : Mikroorganizmlar sonini hisobga olish va o'stirish usullari**

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

#### **1-tajriba. Mikroorganizmlar hujayrasini bevosita sanash**

**Hujayralarni hisoblash kamerasida sanash.** Goryaev, Tom-Seys, Byuker kamerasida yirik mikrob hujayralarini – achitqilarni, bir hujayrali suvo'tlari, sporalar, zamburug'lar, ayrim bakteriyalarni sanash mumkin. Goryaevning hisoblash kamerasi qalin buyum oynasi bo'lib, to'rtta chuqur chiziq bilan ko'ndalang joylashgan uchta maydonchaga bo'lingan. O'rtadagi maydoncha ko'ndalang chiziq bilan ikkiga bo'lingan. Har qaysi yarmi to'rsimon bo'lingan. Yon tomondagi maydonchalar o'rtasidagi 0,1 mm balandroq (kamera chuqurligi) bo'lib, uning ustiga qoplagich oyna zich yopiladi.

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

#### **2-tajriba. Achitqilarni sanash**

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

Non pishirish sanoati yarim fabrikatlar namunasini tayyorlashda G. M. Smirnova ishlab chiqqan usulga asoslanish mumkin: bunda 1 g namunani hovonchada 3-5 ml spirt bilan ezib (spirt oz-ozdan qo'shiladi). Keyin 100 ml hajmli kolbachaga solinadi va 40-50 ml ga etguncha suv qo'shiladi; to'xtovsiz chayqatib turib 1 ml 30% li natriy gidroksid (yoki kaliy gidroksid) eritmasi qo'shiladi. Keyin kolbacha 10 daqiqa  $70^\circ\text{C}$  issiq bo'lgan suv pammomiga botirib qo'yiladi. Hidroliz tugagandan keyin belgigacha suv o'shib, yaxshilab aralashtiriladi. Suspenziyadan 10 ml olib

probirkaga solinadi va 5 tomchi metilen ko'ki hamda 3-4 tomchi karbolli fuksin qo'shiladi. Achitqilar hujayrasi to'q binafsha rangga, bakteriyalar hujayrasi havo rangga bo'yaladi.

Kamera va maxsus silliqlangan qoplagich oynani yaxshilab yuvib quritiladi. Setkalar yuzasiga tayyorlangan kultura aralashmasidan kichik tomchi tomizib, qoplagich oyna bilan yopiladi. Oyna tagidagi suyuqlik kataklar bo'ylab bir tekis tarqalishi, pufakchalar hosil bo'lmasligi kerak. Suyuqlikning hajmi kameraning hisoblanadigan hajmiga mos kelishi uchun to Nyuton halqalar deb ataladigan halqalar paydo bo'lguncha qoplagich oyna kameraning yon maydonchasiga ishqalanaveradi. Qoplagich oynani oldin ishqalab, keyin pipetkada kamerani mikroorganizmlar suspenziyasi bilan to'ldirish ham mumkin. Hujayralar cho'kish va bir tekisda ko'rinishi uchun kamera to'ldirilgandan 3-5 daqiqadan keyin hisoblash boshlanadi. Mikroorganizmlarning harakatchan formalarini kataklarga tushirishdan oldin ularni isitib yoki suspenziyaga 0,5% formalin qo'shib nobud qilinadi. Kamerani mikroskopning buyum stolchasiga joylashtirib qo'yib, oldin 8x, keyin 40x ob'ektivda ko'riladi. Katta kvadratning ichidagi hujayralar ham, chekka chizig'idagi, lekin ko'proq qismi muayyan kvadrat ichida bo'lgan hujayralar ham – hammasi hisobga olinadi. Yarmidan ko'pi boshqa kvadratda bo'lgan hujayralar hisobga olinmaydi. Agar hujayralar chegara chiziq bilan teng ikkiga kesilib turgan bo'lsa, kvadratning ikkita yonma-yon (bir-biriga yaqin) tomonidagi, masalan, pastki va chap tomonidagi hujayralar hisobga olinadi.

Har bir tomchida 10 ta katta kvadratdagi hujayralarni sanash tavsiya etiladi. 1 mm dagi hujayralar soni  $x_{qa} \cdot 25 \cdot 104$  ga teng.

Juda quyuq suspenziyalarda hujayralarni sanash qiyin, shuning uchun ularni suyultirish kerak. Yaxshisi shunday suyultirish kerakki, bitta yirik kvadratdagi hujayralar soni 16 tadan oshmasin. 1 ml dagi hujayralarni hisobga olishda suyultirishni hisobga olish kerak.

### **3-tajriba. Fiksirlab keyin bo'yalgan mazoklardagi hujayralarni sanash**

**(Vinogradskiy-Shulgina-Brid usuli).** Bu usulning mohiyati shundan iboratki, ma'lum miqdordagi tekshirilayotgan suspenziyani bevosita mikroskopda ko'rib, mikroorganizmlar hujayrasining soni sanaladi.

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

yuviladi. Preparat suv tiniq bo'lib qolguncha bir necha marta yuviladi. Tayyor bo'lgan preparat havoda quritiladi.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **4-tajriba. Qattiq ozuqa moddali muhitga ekish usuli bilan mikroorganizmlar miqdorini aniqlash (Kox usuli)**

Tabiiy va ishlab chiqarishdagi substratlardagi (suv, tuproq, xom ashyo, yarim tayyor va tayyor mahsulotlardagi) mikroorganizmlar miqdorini aniqlashda mazkur usul keng qo'llaniladi. Har qanday tirik hujayra qattiq muhitga ekilganda koloniya hosil qiladi, deb hisoblaymiz. Buni tahlil qilish uch bosqichda amalga oshiriladi: namunali suyultirish, Petri likobchasidagi qattiq muhitga ekish va o'sib chiqqan koloniyalarni sanash.

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

1-suyultirishda hosil qilingan suspenziya sterillangan pipetka bilan yaxshilab aralashtiriladi. Buning uchun suspenziya bir necha marta pipetkaga tortib, yana chiqarilaveradi. So'ngra shu pipetkada 1 ml suspenziya olib, ichiga 9 ml suv quyilgan ikkinchi probirkaga qo'shiladi – bu ikkinchi suyultirish -1:102. Yana boshqa pipetka olib, xuddi yuqoridagi usulda uchinchi marta suyultiriladi - 1:103, so'ngra dastlabki materialdagi mikroorganizmlar miqdoriga qarab 10 martagacha suyultirilaveradi.

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

Ekish uchun sterillangan o'lchov pipetkasidan foydalaniladi. Unda suyultirilgan tegishli suspenziyadan ma'lum hajmda: 0,05, 0,1, yoki 0,2 ml (0,5 ml dan oshmasligi kerak) olib likopchalardagi muhitga qo'shiladi. Keyin sterillangan shpatel bilan qattiq muhit yuzasiga tekis qilib yoyiladi. Agar suyultirilgan suspenziyada mikroorganizmlar kontsentratsiyasi yuqori bo'lsa, shu shpatel bilan ikkinchi, ba'zan uchinchi likopchadagi ozuqa muhitning yuzasiga ham surkaladi. Agar kontsentratsiyasi past bo'lsa, faqat bitta likopchaga shpatelda suyultirilgan suyuqlik yuqtiriladi. Ketma-ket suyultirilgan kamida uchta suspenziyadan olib ekiladi. Parellel ekishda bitta pipetkadan foydalanilaveradi. Boshqa suyultirilgan suspenziyadan foydalanishda sterillangan yangi pipetka ishlatiladi. Har xil darajada suyultirilgan suspenziyalardan olib ekishda bitta pipetkadan foydalanish

mumkin, lekin ekishni eng ko'p suyultirilgan suspenziyadan boshlash kerak. Har qaysi suyultirilgan suspenziya uchun albatta sterillangan yangi shpatel olinadi.

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

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

#### ***Mustaqil tayyorlanish uchun savollar :***

1. Aerob va anaerob mikroorganizmlar to'g'risida tushuncha bering va ularning o'stirish yo'llarini bayon eting.
2. Tashqi muhit omillari mikroorganizmlarga qanday ta'sir etishini tushuntiring.
3. Tajriba uchun mo'ljallangan preparat qanday tayyorlanadi?
4. Kox usulini bayon eting.