

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

**MIRZO ULUG‘BEK NOMIDAGI  
O‘ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI**

**V.B.FAYZIYEV, B.J.AXMADALIYEV, U.M.JO‘RAYEVA,  
A.H.VAHOBV**

# **TUPROQ MIKROBIOLOGIYASI**

**FANIDAN  
AMALIY MASHG‘ULOTLAR UCHUN  
USLUBIY QO‘LLANMA**

Toshkent - 2019

Ushbu uslubiy qoʻllanma Mikrobiologiya va virusologiya magistratura mutaxassisligining oʻquv rejasidagi "Tuproq mikrobiologiyasi" fani uchun tayyorlangan boʻlib, unda tuproq mikrobiologiyasi tadqiqotlari uchun zarur boʻlgan asbob-uskunalar bilan tanishish, mikroorganizmlarni ajratish, koʻpaytirish uchun zarur boʻlgan ozuqa muhitlari, tuproqni mikrobiologik tahlil qilish, tuproq mikroorganizmlarining toza kulturasini olish va saqlash, ularning xususiyatlarini oʻrganish, tuproq mikroorganizmlarining oʻzaro va boshqa organizmlar bilan aloqalari toʻgʻrisidagi laboratoriya ishlar batafsil bayon etilgan. Adabiyotlar roʻyxati yangi adabiyotlar bilan toʻldirilgan.

Uslubiy qoʻllanma Mikrobiologiya va virusologiya magistratura mutaxassisligi magistr talabalari hamda biologiya taʼlim yoʻnalishida taʼlim olayotgan talabalari uchun moʻljallangan.

Данное пособие подготовлено по предмету «Микробиология почвенной микробиологии» в учебной программе специальности «Микробиология и вирусология», которая включает в себя ознакомление с необходимым оборудованием для исследований почвенной микробиологии, выделение микроорганизмов, питательные вещества, необходимые для размножения, микробиологический анализ почвы, культивирование чистых культур почвенных микроорганизмов и изучение их свойств, изучение лабораторных исследований по взаимодействию почвенных микроорганизмов друг с другом и другими организмами. Список литературы пополнен более новыми публикациями.

Методическое пособие по микробиологии и вирусологии магистерская программа предназначена для студентов, обучающихся в магистратуре и биологическом направлении.

**Tuzuvchilar:**

Fayziyev V.B.  
Ahmadaliyev B.J.  
Joʻrayeva U.M.  
Vahobov A.H.

**Taqrizchilar:**

**b.f.n., dots. Ibodov K.I.** –  
OʻzMU Mikrobiologiya va  
biotexnologiya kafedrası  
dotsenti;  
**b.f.n. dots. Sattorov M.E.** –  
I.Karimov nomidagi TDTU  
Biotexnologiya kafedrası  
dotsenti

Mazkur uslubiy qoʻllanma Mikrobiologiya va biotexnologiya kafedrası majlisida muhokama qilindi va nashr etishga tavsiya qilindi («22» yanvardagi 2019 yil 13-sonli majlis bayonnomasi).

Mazkur uslubiy qoʻllanma Mirzo Ulugʻbek nomidagi Oʻzbekiston Milliy universitetining Biologiya fakulteti Kengashida muhokama qilindi va nashr etishga tavsiya qilindi («06» mart 2019 yil 7-sonli majlis bayonnomasi).

## Kirish

Mikroorganizmlar dunyosi hayotning ko‘zga ko‘rinmas tiriklik shakli hisoblanib, yer yuzida juda katta ahamiyat kasb etadi. Ularning shakli tayoqchasimon, sharsimon, buralga vibrionsimon, spiralsimon bo‘lib, 4 xil: ya‘ni suv, havo, tuproq va tirik organizmlar kabi muhitlarda hayot kechirib yer yuzida modda va energiyaning davriy aylanishida juda muhim ahamiyat kasb etadi. Yuqorida sanab o‘tilgan muhitlardan tuproq mikroorganizmlar keng tarqalgan muhit hisoblanib, bu mikroorganizmlarning faoliyati tufayli tuproq unumdorligini yaxshilash, o‘simliklarni turli kasalliklardan himoya qilish, mineral o‘g‘itlar ishlatishni kamaytirish kabi muammolarni hal qilinishida tuproq mikroorganizmlarini ishlatish bugungi kundagi tuproq bilan bog‘liq bo‘lgan ekologik muammolarni hal qilinishida muhim hisoblanadi. Shularni e‘tiborga olib tuproq mikrobiologiyasi kursi Mikrobiologiya va virusologiya magistratura mutaxassisligi o‘quv rejasiga kiritilgan bo‘lib, bu fan bo‘yicha bugungi kungacha o‘zbek tilida o‘quv adabiyotlarning mavjud emasligi talabalarga bir qator qiyinchiliklarning paydo bo‘lishiga olib kelmoqda. Bu muammo ushbu kurs bo‘yicha o‘zbek tilida o‘quv adabiyotlarini tayyorlashini talab etadi. Shuning uchun ushbu tayyorlangan o‘quv adabiyoti talabalar biliminining chuqur bo‘lishi uchun muhim ahamiyat kasb etadi.

Ushbu uslubiy qo‘llanma Mikrobiologiya va virusologiya magistratura mutaxassisligi magistr talabalari uchun tayyorlangan bo‘lib, unda mikrobiologik tadqiqotlar uchun zarur bo‘lgan asbob-uskunalarning tuzilishi va ishlash mexanizmi, sterillash usullari, ozuqa muhitlari va ularni tayyorlash, tuproq namunasini olish, mikrobiologik tadqiqotlar uchun tayyorlash, ozuqa muhitiga ekish texnikasi, tuproq mikroorganizmlarini sonini aniqlash, ularning tuproqdagi boshqa mikroorganizmlarga antogonistik ta‘siri, o‘simliklarga salbiy va ijobiy ta‘siri, toza kultura olish va ularning tahlili, mikroorganizmlar kulturasini saqlash kabilar kiritilgan bo‘lib, bu talabalarining amaliy ishlarini sifatli bajarilishida va chuqur bilim olishiga ko‘maklashadi.

Uslubiy qo‘llanmani tayyorlashda o‘quv adabiyotlar tayyorlashga qo‘yilgan zamonaviy tendensiyalarga amal qilingan holda, mamlakatimizda mikrobiologiya yo‘nalishida tayyorlangan, jumladan: Vahobov A.H. va bosh. “Mikrobiologiyadan amaliy va laboratoriya mashg‘ulotlari uchun o‘quv qo‘llanma (lotincha)” (“Universitet” nashriyoti, 2009 y.) kabi o‘zbek tilidagi hamda xorijiy oliy ta‘lim muassaslarida Zvyaginsev D.G. i drug., “Biologiya pochv: Uchebnik. -3-ye izd., ispr. i dop.” (Izd-vo MGU, 2005.) kabi bir qator tayyorlangan o‘quv adabiyotlardan foydalanildi.

Shu bilan bir qatorda ushbu uslubiy qo‘llanma mualliflar va mutaxassislarining fikr-mulohazalari asosida tayyorlangan bo‘lib, unda mavjud xato va kamchiliklarni tuzatish uchun bildirilgan fikrlar uchun mualliflar jamoasi o‘z minnatdorchiligini bildiradi.

# **1-bo'lim. Tuproq mikrobiologiyasi tadqiqotlar uchun zarur bo'lgan asbob-uskunalar, ozuqa munitlari bilan tanishish**

## **1.1. Inkubation uskunalar**

**Termostat.** Mikrobiologik laboratoriya uchun zarur bo'lgan – termostat, haroratni doimiy (+1, -2°C) tarzda tutib turadi va mikroorganizmlar kulturasini inkubatsiya qilish uchun qulay sharoit yaratadi. Bakteriologik termostat ikki qavat mis plastinkadan qilingan devordan iborat bo'lgan shkaf ko'rinishida bo'lib, bu qavatlar orasi distillangan suv bilan to'lgan bo'ladi. Shkaf devorlarining barcha qismini o'rab turgan suv elektr elementlar yordamida avtomatik qo'shilish va ajratilish natijasida qizdirilib turiladi.

Shkafning ichki burmali devoriga metall ugolniklar biriktirilgan bo'lib, u alyumindan yasalgan setkali tokchalarni tutib turish vazifasini bajaradi. Termostatning teploizolyatsiyasida asbest va mineral paxtadan fodalaniladi. Termostatning yuqori qismida ikkita kichik tuynuk (ochiq) mavjud bo'lib, ularning biri termometr uchun bo'lsa, ikkinchisi esa ventilyatsiya uchun qoldirilgan.

Izolyatsiyalangan eshik ichida joylashgan shisha darichani ochmasdan, termostat ichida joylashgan kulturalarni kuzatish mumkin. Yuqori qismida joylashgan qo'shimcha tuynuk suv solishga, suv o'lchovchi trubka va termoregulyatorni kiritishga mo'ljallangan.

Termostatning ishchi kamerasini sterillashda turli suyuq dizinfektsiyalovchi moddalar (70% li etanol, sterogenol va boshq.) yaxshi samara beradi. Bu maqsadda turli kislotalar va ishqorlarni qo'llash tavsiya etilmaydi, chunki bu moddalar uning devori va tagida karroziyani keltirib chiqarishi mumkin. Suvli qobiq ichini vodoprovod suvi bilan to'ldirishga ruxsat etilmaydi.

Bir xil haroratda juda ko'p miqdordagi mikroorganizm kulturalari inkubatsiyalanuvchi (o'quv muassasalarining ishlab chiqaruvchi, tadqiqot va kuzatuv) laboratoriyalari maqsadga muvofiq teploizolyatsiyalangan va maxsus isitiluvchi termostat xonalari bilan jihozlanishi zarur. Mikroorganizmlar ekmalarini devorga yaqin tokchalarga joylashtirish mumkin. Bunday xonalarni dizinfektsiyalanishida aerosol dezinfektsiyalovchi vositalar yaxshi samara beradi.

**Anaerostat** - bu qalin davorga ega bo'lgan metallardan yasalgan, og'zi germetik qopqoq bilan yopiluvchi, monometr va ikkita jo'mrakdan iborat idish hisoblanadi. Ulardan biri havoni so'rib olish uchun qo'llanilsa, ikkinchisi esa inert gazlar (argon, azot, vodorod, geliy) bilan to'ldirishda ishlatiladi. Anaerostat uzoq muddat vakuum sharoitini saqlaydi va u anaerob mikroorganizmlarni ko'paytirish va tozalashni osonlashtiradi, mikroorganizmlar odatda Petri chashkasi va probirkalarda o'stiriladi. Kulturalar joylashtirilgandan so'ng anaerostat germetik tarzda yopiladi va havosi so'rib olinib, 15-20 mm ga tenglashtiriladi. Undan so'ng, anaerostat ma'lum gaz bilan to'ldiriladi yoki to'ldirilmagan holatda ma'lum haroratda ushlab turish maqsadida termostatga joylashtiriladi. Har kuni anaerostat monometri nazorat qilib borilishi va zarur bo'lgan taqdirda uning havosi so'rib olinishi kerak bo'ladi.

Kislorod miqdorini nazorat qilish uchun anaerostat devorida joylashtirilgan shisha trubkada o'rnatilgan maxsus indikatorlardan foydalaniladi.

Ayrim hollarda anaerostat o'rnida vakuum eksikatoridan foydalanish mumkin, ammo u manometr bilan jihozlanmagan, ammo vakuumni bu hodisada birgina kislorod indikatorini yordamida nazorat qilish mumkin.

Germaniya va bir qator davlatlarda anaerob bakteriyalarni ko'paytirish uchun anaerob termostatlar ishlab chiqariladi, unda harorat 30-70°C hamda neytral kislorodsiz atmosfera sharoiti yaratiladi.

**Sovutgichlar.** Odatda laboratoriyalarda maishiy xo'jalik muzlatgichlari ishlatiladi, ammo ilmiy-tadqiqot ishlari uchun isitish va sovutish sistemasiga ega bo'lgan SR-114 Labor kabi maxsus qurilma zarur bo'lib, bu zarur harorat rejimini tez va aniq ushlab turish imkoniyatini beradi. Laboratoriya sovutgichlari haroratni 4-5°C oralig'ida ushlab turadi va ular keng miqyosda qo'llaniladi. Ularda tayyor va sterillanmagan ozuqa muhitlarini (bir sutkadan ortiq bo'lmagan muddatda), tekshirish uchun yig'ilgan tuproq, go'ng va o'simlik namunalari saqlanishi mumkin. Yig'ilgan bunday namunalarning mikrobiologik analizi tez muddatlarda o'tkazilishi zarur, chunki ularning mikroflorasi son va sifat jihatdan o'zgarishi mumkin.

Mikroorganizmlar ekmlarini alohida xolodilnikda (5°C), namlik bilan zararlanishini oldini olgan holda saqlanishi zarur. Uchuvchan moddalar va gazlar solingan idishlar germetik holatda yopilgan holatda bo'lishi zarur. Oziq-ovqat mahsulotlarining mikrobiologik laboratoriyada saqlanishi mutlaqo ta'qiqlanadi.

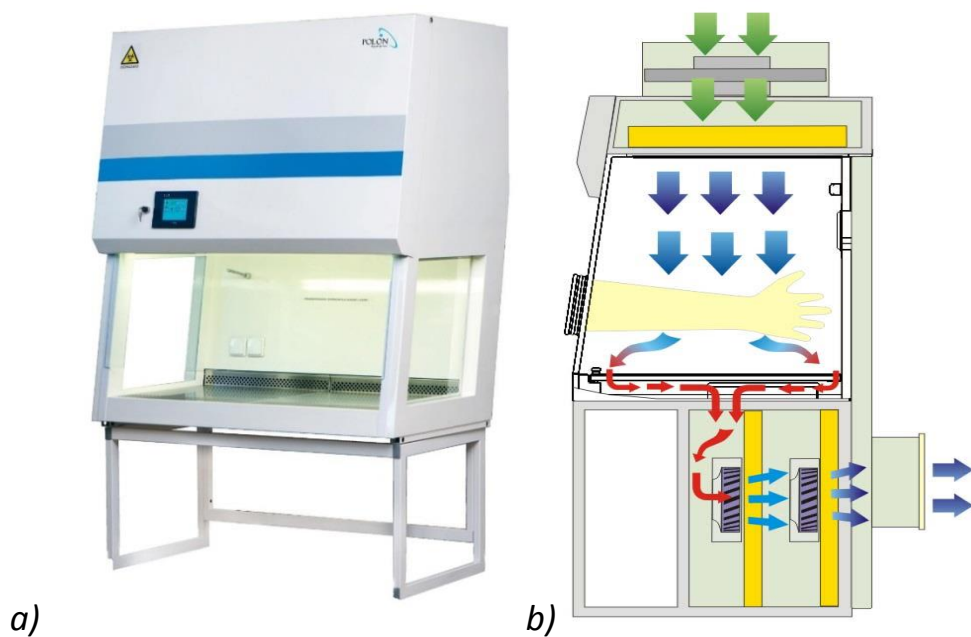
## **1.2. Shkaflar, laminar bokslar va ekish kabinalari**

Mikrobiologiya amaliyotida ekish uchun ishlatiladigan shkaflar zanglamaydigan metallardan yasalgan bo'ladi. Bu shkaflarning oldingi yuzasining yuqori qismi oynadan yasalgan bo'lib, 45° burchak asosida gorizontol holatda joylashgan. Quyi qismida ikkita maxsus qo'l uchun joy qilingan bo'lib, unda rezina qo'lqop mahkamlangan. Shkafning orqa qismida elektr provada va gazni olib kelish uchun trubalar mahkamlangan bo'ladi.

Ularni dezinfeksiyalovchi moddalar yoki ultrabinafsha lampalari yordamida sterillanadi.

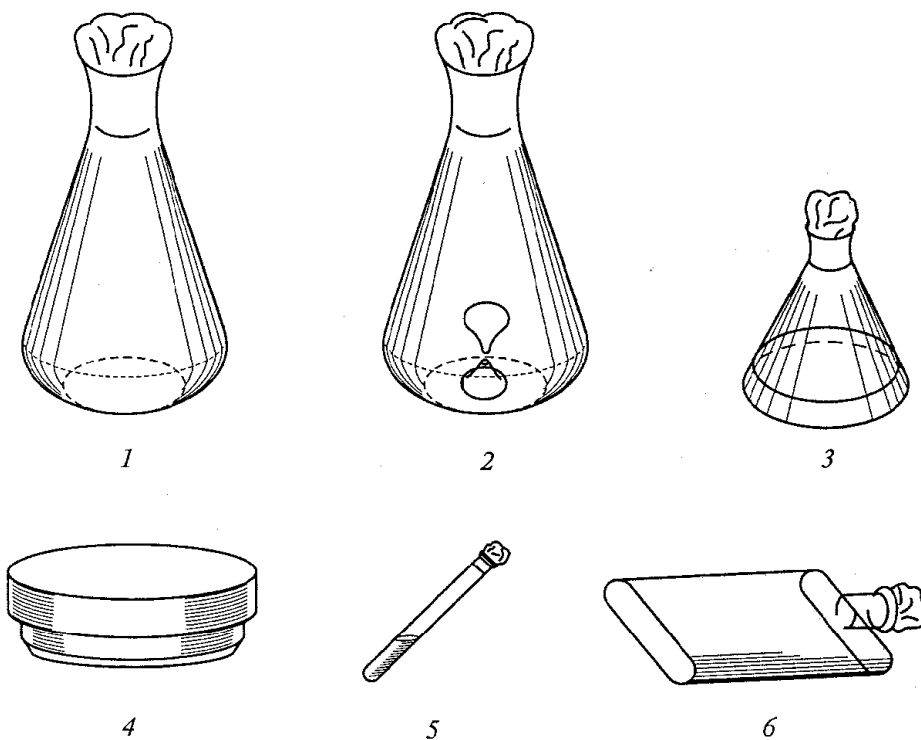
So'ngi yillarda sterillash kabinasining o'rnida laminar boks ishlatiladi. Laminar boksning oldingi qismi to'liq ochiq holatda bo'ladi va unda doimiy va sekin sterillangan havo oqimi doimiy esib turadi. Havoning laminar oqimi porasi 0,3 mkm bo'lgan "Hepa" filtri orqali o'tib keladi. Havo oqimining yo'nalishiga qarab laminar bokslar vertikal va gorizontol (1-rasm) ko'rinishda tuzilgan xillarga bo'linadi.

Ekish uchun maxsus kabina bu – sterill holatda ishlash imkonini beruvchi laboratoriyaning bir qismi hisoblanadi. Vodoprovod va gaz trubalari namlikka chidamli materiallar bilan qoplanib, devorga o'rnatilgan bo'ladi. Kabinani sterillash unga o'rnatilgan kvarts lampa yordamida amalga oshiriladi.



**1-rasm. Laminar boks (a) va unda havo oqimi (b).**

Laboratoriyada mikroorganizmlar probirkalar, matraslar, kolbalar yoki Petri chashkasiga quyilgan qattiq va suyuq ozuqa muhitlarida oʻstiriladi (2-rasm). Ozuqa muhitlari va idishlarni sterillashni talab etiladi. Ozuqa muhitlarni tayyorlash va sterillash yoʻllarini keyingi boʻlimlarda koʻrib chiqamiz.

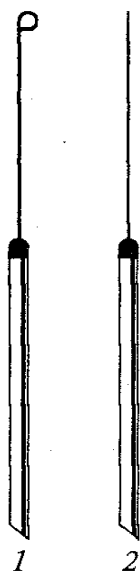


**2-rasm. Mikroorganizmlarni koʻpaytirish uchun zarur boʻlgan idishlar: 1-2 -kachalka kolbasi; 3- tagi yassi kolba; 4-Petri chashkasi; 5- probirka; 6-matras.**

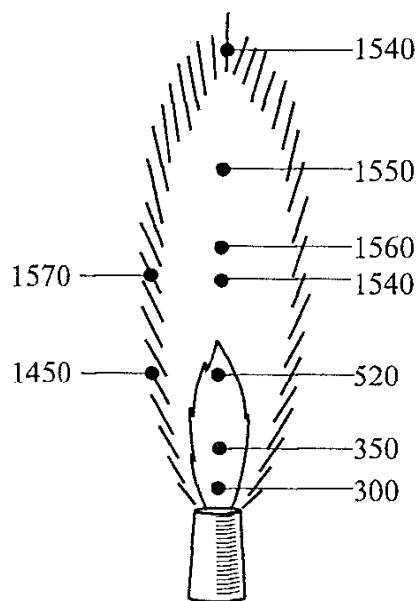
Mikroorganizmlarni sterillangan ozuqa muhitiga o'tkazish **ekish** yoki **inokulyatsiya** deyiladi. Mikroorganizmlarni ekish vaqtida boshqa mikroorganizmlar tushib qolishdan saqlash uchun belgilangan qoidalarga amal qilish talab etiladi. Ekish oldidan probirkaga (kolba yoki Petri chashkasiga) mikroorganizm nomi va ekish vaqtini yaxshilab yozish zarur.

Ekish uchun olinadigan mikroorganizm hujayralari bakteriologik ilmoq yoki igna bilan olinadi (3-rasm), agar mikroorganizm qattiq ozuqa muhitida o'stirilgan bo'lsa. Agar mikroorganizm suyuq ozuqa muhitida o'stirilgan bo'lsa, uni ulmoq bilan emas balki sterillangan pipetka yordamida ekish qulay hisoblanadi. Bakteriologik ilmoq va ignani yupqa volfram yoki nixromdan yasaladi va metal yoki shisha dastakka mahkamlanadi. Bakteriologik ilmoq uchki ilmog'ining diametri 4-5 mm bo'ladi.

Bakteriologik ilmoq (igna) yordamida mikroorganizm hujayrasini olish uchun, uni sterillash zarur. Buning uchun ilmoq olovda laqqa cho'g' rangiga kirguncha qizdiriladi va ilmoq dastagining yarmigacha olovda qizdirib olinadi, chunki u mikroorganizm ekilgan idishga kiritiladi. Ilmoqni gaz garelkasi olovida deyarli vertikal holatda ushlab turish talab etiladi. Shuni esda saqlash zarurki, gaz garelkasi alangasining eng yuqori harorati uning uchki va markazdan chetki qismida shakllanadi (4-rasm), shuning uchun ilmoqni to'liq gaz garelkasiga tushirish tavsiya etilmaydi.



3-rasm. Bakteriologik ilmoq (1) bakteriologik igna (2).



4-rasm. Gaz garelkasi alangasining va turli uchastkalaridagi harorat (°C).

Ilmoq (ignani) sterillashdan so'ng, birdaniga mikroorganizm ekilgan idishga tushirish tavsiya etilmaydi. Mikroorganizm hujayrasini zararlamaslik uchun ilmoqni (ignani) dastlab sovutib, keyin idishdagi mikroorganizmlardan xoli bo'lgan ozuqa muhiti yuzasiga tekkiziladi va ozgina miqdordagi mikroorganizm kulturasidan olinadi.

### 1.3. Ozuqa muhitlari va idishlarni sterillash usullari bilan tanishish

Sterilizatsiya mikrobiologiya amaliyotida qo'llaniladigan muhim va zarur usullardan biri hisoblanadi. "Sterilizatsiya" so'zi lotin tilidan olingan bo'lib, "naslsizlantirish" degan ma'noni anglatadi. Amaliy ishlarda sterillash deganda sterillanayotgan obyektning yuzasi hamda ichidagi hayot shaklini yo'qotish qobiliyatiga ega bo'lgan usullar tushuniladi. Umuman sterillashning ikki turi aniqlangan bo'lib, ular issiq va sovuq sterillashga bo'linadi. Issiq sterillashga: olovda qizdirish va yoqish, quruq issiq yordamida sterillash (issiq havo yordamida), to'yingan bug' va bosim bilan (avtoklavlash), o'tuvchi bug'lanish yordamida (tendalizatsiya) hamda qaynatish yordamida sterillash kiradi. Sovuq sterillashga: filtrlash yordamida sterillash, gazlar yordamida sterillash, kimyoviy usulda, ultrabinafsha va boshqa nurlar yordamida sterillash kabilar kiradi. U yoki bu sterillash usullarining qo'llanilishi birinchi navbatda sterillanayotgan materiall tarkibi va tadqiqot maqsadiga bog'liq bo'ladi.

**Ozuqa muhitini to'yingan bug' va bosim yordamida sterillash (avtoklavlash).** Yuqori harorat va bosimning qo'llanilishi bu usulning samaradorligini ta'minlaydi (1-jadval).

Bunday holatda barcha mikroorganizmlar vegetativ hujayralari va ularning sporalari nobud bo'ladi. Aniqlanishicha, ko'pgina mikroorganizmlarning sporalari harorati 121°C bo'lgan to'yingan bug'da 5 daqiqagacha chidaydi. Bunday sharoit mikroorganizmlarning hujayralari va sporalari o'limiga olib keladi. Bosim va o'tuvchi bug' yordamida sterillash avtoklavda amalga oshiriladi.

1-jadval

Turli bosimlardagi to'yingan bug'ning harorati (Tepper, 1993)

Bosim, atm	Harorat, °C
0,5	115
1,0	120
1,5	127
2,0	133

Avtoklav yoqori bosimga chidamli, ikki qavat metall qobiq bilan o'ralgan va ichiga sterillanadigan narsalar qo'yiladi kamerasi mavjud bo'lgan maxsus qurilma hisoblanadi. Sterillangan narsalar uning ichiga juda zich qo'yilmasligi lozim, agar ularning orasidan bug' o'tmasa, yetarlicha harorat hosil bo'lmasdan, narsalar sterillanmasdan qolishi mumkin. Sterilizatsiya tugagandan so'ng, avtoklav ichidagi bosim tashqi muhit bosimiga tenglashgandan so'ng ochilishi mumkin. Avtoklavning jumragini tez ochilishi uning ichidagi bosimning tez pasayishiga va yuqori harorat ta'sirida qaynab turgan ozuqa muhitlarining tiqinlarini otilishiga va sterillashning buzilishiga sabab bo'lishi mumkin.

***Avtoklavda ishlashga maxsus tayyorlangan kishilargagina ruxsat beriladi!***



*Ozuqa muhitini sterillashga tayyorlash.* 3-5% li suyuqlikni avtoklavlashda bug'lanishni hisobga olgan holda, ozuqa muhitga taxminan 5% distillangan suv solish tavsiya etiladi. Shunda sterillanishdan so'ng, ozuqa suyuqligi talab qilingan kontsentratsiyada bo'ladi. Odatda ozuqa muhitlari probkalar, kolbalar va boshqa shisha idishlarda sterillanadi. Ozuqa muhiti bu idishlarga uning tiqini ho'l bo'lib qolmasligi uchun yarmigacha solinadi. Ozuqa muhitlari solingan idishlar paxtadan tayyorlangan probkalar va uning ustidan qog'oz qopqoq bilan yopiladi. Shisha, rezina boshqa materiallardan tayyorlangan probkalar ikki qavat o'rama qog'oz bilan o'raladi va og'zi yopiq idishga solingan holatda sterillanadi.

*Avtoklavlash rejimini tanlash.* Mikrobiologiya amaliyotida avtoklavlash 111-138°C da, 0,5 dan 2,5 atm bosimgacha amalga oshiriladi. 111°C dan past harorat ishonarli hisoblanamaydi; 138°C yuqori harorat avtoklavni boshqarishda xavfli hisoblanadi, chunki bug'ning bosimi qancha yuqori bo'lsa, uning harorati ham shuncha oshib boradi. Mikrobiologiya amaliyotida 0,5 va 1 atm. bosimida sterillanadi.

Ozuqa muhitni avtoklavlash vaqti va harorati uning tarkibidagi komponentlarning termostabilligi yoki termolabilligiga qarab belgilanadi. Sut yoki jelatina kabi tarkibida qand, vitaminlar tutuvchi tez buziluvchi (pivo suslosi, sharbatlar, achitqi avtolizati) substratlar 0,5 atmda 15-30 daqiqa davomida sterillanadi. Go'shtli peptonli ozuqa muhitlar 1,0 atmda 20 daqiqa davomida sterillanadi. Turli poroshoklar (mas., talk), ba'zi suyuqliklarni (glitserin, vazelin yog'i) avtoklavda sterillash bir qadar murakkablik tug'diradi, shuning uchun ularni quritish shkaflarda 160°C da 2 soat yoki 1 soat 170°C da sterillashni talab etiladi. Bunday holatda idishdagi yog' yoki parashok qalinligi 1,5 smdan oshmasligi lozim. Avtoklavlashdan so'ng ozuqa muhitlarning sterilligini tekshirish maqsadida 30°C da 2-3 sutka davomida termostatga qo'yiladi. Agar ozuqa muhitida mikroorganizmning o'sishi kuzatilsa, uni qaytadan tayyorlanadi.

**Tindalizatsiya va pasterizatsiya.** Tindalizatsiya yoki ikki karra sterillash 1877-yilda Tindal tomonidan taklif qilingan. Bu usul 100°C dan yuqori haroratda buziladigan tarkibga ega bo'lgan ozuqa muhitlarini sterillashda qo'llaniladi. Tindalizatsiya o'tuvchi bug' yordamida avtoklavda yoki Kox apparatida amalga oshiriladi. Ozuqa muhiti 10-15 daqiqa davomida bir necha marta qizdiriladi. Qizdirishlar orasida 30°C da 8-12 soat davomida termostatga sporalarning o'sishi uchun qo'yiladi. 100°C haroratga chidamsiz bo'lgan ozuqa muhitlar 60-80°C da har 8-12 soatda 4-5 kun davomida ketma-ket sterillanadi.

100°C dan past bo'lgan haroratda bir marta qizdirish pasterizatsiya usuli deb ataladi. Bu usul Paster tomonidan taklif qilingan bo'lib, sporasiz mikroorganizmlarni yo'qotishga mo'ljallangan. Kuzatilishicha, ko'pgina hollarda bu usul to'liq sterillashni ta'minlay olmaydi. Pasterizatsiya 60-80°C da 10 – 30 daqiqa davomida amalga oshiriladi.

Bu usul oziq-ovqat sanoatida sut, meva sharbatlarini, vino, pivo kabilarni sterillashda qo'llaniladi.

**Filtrlash yordamida sterillash.** Filtrlash yordamida vitaminlar, aminokislotalar (sistein va sitin), oqsillar, uglevodlar antibiotiklar kabi bir qator

yuqori haroratda tez parchalanuvchi va uchuvchi tarkibga ega bo'lgan ozuqa muhitlar hamda mikroorganizm kultural suyuqliklar sterillanadi. Suyuqliklar kichik porali metallardan iborat bo'lgan filtrlar yordamida o'tkazilsa, mikroorganizm hujayralari esa oson adsorbtsiyalanuvchi materiallar: *asbest, selluloza, farfor, kaolin* va boshqalardan iborat bo'lgan filtrlardan o'tkaziladi.

Sterillovchi filtrlarning poralari nazariy jihatdan 0,20 mkm dan oshmaydi. Mikrobiologiya amaliyotida keng qo'llaniladigan filtrlar bu – membranali filtrlar bo'lib, ularning poralar o'lchamiga qarab turli sterillash va filtrlashda qo'llaniladi.

Asbest va sellulozadan iborat bo'lgan disklar Zeyts filtrida ishlatiladi. Ularga poralar o'lchamiga ko'ra turli indekslar qo'yiladi.

Membranali filtrlar 1 atmda 15 daqiqa davomida yoki qaynatish orqali sterillanadi.

*Shisha idishlarni sterillash.* Laboratoriyada ishlatiladigan shisha idishlar issiq, quruq havo yordamida 180°C dan yuqori bo'lmagan haroratda 1-3 soat davomida sterillanadi. Bunday haroratda mikroorganizmning vegetativ hujayralari va sporolari nobud bo'ladi.

Sterillash avtomatik ravishda haroratni ushlab turuvchi maxsus sterilizatorlar yoki quritish shkaflarida amalga oshiriladi belgilangan haroratda amalga oshiriladi (2-jadval).

Sterillanadigan shisha idishlar sterillashdan avval yaxshilab yuvilib, sterillashdan so'ng yana mikroorganizmlar bilan ifloslanmasligi uchun qog'oz bilan o'ralishi shart. Undan so'ng, quritish shkaflariga sterillanadigan idishlar tig'iz bo'lmagan holatda havo oqimi yaxshi aylanadigan holatda qilib joylashtiriladi.

2-jadval

Shisha idishlarni quruq issiq yordamida sterillash uchun zarur bo'lgan harorat

Harorat, °C	Vaqt, daqiqa
140	180
150	150
160	120
170	60

Sterillanishdan so'ng quritish shkafi ichidagi harorat 80°C tushguncha ochilmasligi lozim, aks holda shisha idishlarning darz ketishiga sabab bo'lishi mumkin.

*Asbob-uskunalarini sterillash.* Kichik metall asboblari – ilmoq, ignalar, pentsetlar, pichoq, shpatellar ishlatishdan oldin olov yordamida sterillanadi. Bundan tashqari buyum va qoplag'ich oynalar, shisha tayoqchalar va shpatellar, chinni (forfor) hovoncha va stupkalar, kolbalarining bo'yni, probirkalar, butilkalar, shu bilan bir qatorda paxta tiqinlar kulturalarni ekish oldidan qisqa muddatli olovda kuydirib olinadi. Olovda mikroorganizmlarning vegetativ hujayralari va sporolari nobud bo'ladi.

Shpritslar quruq issiq yordamida 160°C da yig'ilgan holatda yoki yig'ilmagan holatda sterillanadi. Bunda birinchi holatda sterillanishi vaqti 75 daqiqa, ikkinchi holatda esa 60 daqiqa davomida sterillanadi. Yig'ilgan shprits ignasi bilan probirka ichida, paxta probka bilan yopilgan holatda, yig'ilmagan shprits esa qog'oz yoki lattaga o'ralgan holatda avtoklavda 1 atm da 15-20 daqiqa davomida sterillanadi. Odatda ularni yig'ilgan holatda sterillash maqsadga muvofiq hisoblanadi, aks holda mikroorganizm bilan ifloslanishi mumkin.

**Gazlar yordamida sterillash.** Turli oynali qurilmalar, optik va radioelektron qurilmalar, shu bilan bir qatorda termolabil plastmassadan yasalgan, masalan tsentrifuga probirkalari gazlar yordamida sterillanadi. Gazlar yordamida sterillash uchun sporotsid ta'sirga ega bo'lgan gazlar aralashmasidan foydalaniladi. Bularga: *etilen oksidi, metil bromid, propilen oksidi, formaldegid, glyutaraldegid, beta-propiolakton, ozon* kabi moddalarni sanab o'tish mumkin. Gaz yordamida sterillash maxsus germetik idishlarda amalga oshiriladi. Sterillanadigan buyumlar maxsus kameraga xuddi avtoklavda yoki quritgich shkaflarida sterillanadigandek yopiq, o'ralgan holatda joylashtiriladi. Gazlar yordamida sterillash jarayonida ularning zaharlilik darajasini e'tiborga olgan holatda ishlash zarur.

**Nurlar yordamida sterillash.** Binolarni sterillashda, qurilmalar, biq qator meditsina inshootlarini (operatsion xonalar), oziq-ovqat mahsulotlarini sterillashda: infraqizil, ultrabinafsha, renten nuri,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - kabi radiaktiv elementlar nurlaridan foydalaniladi. Ko'p hollarda mikrobiologiya amaliyotida ultrabinafsha nuridan foydalaniladi. Bu nurning ta'sir kuchi *bakt* larda o'lchanadi. UB-nurining turli mikroorganizmlar uchun (sporadan tashqari) ta'sir miqdori, 5 mkb/sm<sup>2</sup> ni tashkil etadi.

#### **Nazorat uchun savollar:**

1. Mikrobiologiya laboratoriyasida ishlatiladigan inkubatsion qurilmalarga nimalar kiradi va ularning ishlash prinsipi qanday bo'ladi?
2. Qanday sovutgichlar ishlatildi?
3. Sterillashning qanday turlari mavjud?
4. Issiq sterillash va ularga mansub bo'lgan usullarni hisoblab bering.
5. Avtoklav yordamida sterillash qanday amalga oshiriladi?

## **2-bo'lim. Tuproq mikroorganizmlarini o'rganish uchun zarur bo'lgan ozuqa muhitlari**

### **2.1. Ozuqa muhit tayyorlashning umumiy prinsiplari**

Tuproqdan mikroorganizmlarini ajratish va ko'paytirish uchun ozuqa muhit ishlatiladi. Ular ozuqa elementlarining manbasi bo'lishi bilan bir qatorda, mikroorganizmlarning hayot faoliyati uchun zarur bo'lgan kimyoviy va fizikaviy sharoit hisoblanadi.

Ozuqa muhitlar o'z tarkibida turli komponentlarni qamrab olish bilan bir qatorda aniq o'lchangan konsentratsiyada bo'lishi lozim. Alohida komponentlarning nisbati bakteriya hujayrasi uchun zarur bo'lgan optimal konsentratsiyada bo'lishi kerak. Agar u yoki bu birikma bir vaqtning o'zida uglerod va energiya manbayi hisoblansa, uning substratdagi miqdori energiya sarfi va biosintez uchun sarflanadigan miqdorni qoplashi zarur.

Bugungi kunda bir qancha guruhga mansub mikrobiologik ozuqa muhitlar mavjud. Tarkibi jihatidan ular tabiiy, yarim sintetik va sintetik turlarga bo'linadi. Tadqiqot maqsadiga qarab esa elektiv va differentsial diagnostik ozuqa muhitlarga bo'linadi. Undan tashqari konsistentsiyasiga qarab suyuq va qattiq ozuqa muhitlarga bo'linadi.

Ozuqa muhit tayyorlashda yirik konussimon kolbalardan foydalaniladi. Mikroorganizm ekmalarini inkubatsiyalashda yirik bo'lgan konussimon kolbalar, probirkalar yoki maxsus gorizantal yotuvchi flakonlardan foydalaniladi. Qizdirilgan agarli ozuqa muhiti o'lchov voronkasi yordamida probirkalarga solinadi. Buning uchun laboratoriya shtativga 200 ml li voronka o'rnatiladi va uning quyi qismiga 10 sm li rezina va uning uchiga shisha uchlik o'rnatiladi.

Suyuq agarni probirkaga aniq quyish uchun rezina trubkaga o'rnatilgan Mor qistirgichidan foydalaniladi.

Ozuqa muhit tayyorlash jarayonida korsatilgan quyidagi barcha tavsiyalarga qattiq amal qilish zarur:

➤ Toza holdagi kolba va probirkalardan foydalanish eng muhim talablardan hisoblanadi. Turli vositalar yoki kimyoviy aralashmalar bilan yuvilgan shisha idishlar dastlab vodoprovd suvi bilan so'ngra distillangan suv bilan chayiladi.

➤ Toza kimyoviy moddalardan foydalanish zarur. Ayniqsa mikroorganizmlarni ozuqa muhitida saqlash paytida va identifikatsiya qilish jarayonida imkoni boricha analitik toza kimyoviy moddalarni ishlatish talab etiladi.

➤ Ozuqa muhit tayyorlashda, uning tarkibiy qismini aniq miqdorda qo'shish kerak. Katta miqdordagi moddalar texnik, kichik miqdordagi moddalar analitik tarozida o'lchab solinishi zarur. Agar zaruratga ko'ra qandaydir moddaning kichik miqdorini o'lchashga to'g'ri kelsa, uning o'nli yoki yuzlik miqdori o'lchanib zarur miqdordagi distillangan suvga eritiladi va kerak bo'lgan modda miqdori ozuqa muhitga pipetka yordamida solinadi.

➤ Alohida komponentlar ozuqa muhit retseptida keltirilgan ketma-ketlikda, dastlabkisi to‘liq erib bo‘lgandan so‘ng qo‘shiladi. Agar-agar suv hammomida yoki bug‘ hammomida eritiladi, ochiq olovda eritishga ruxsat etilmaydi.

➤ Ozuqa muhit tayyorlangandan so‘ng tekshiriladi, zarur hollarda tayyorlangan eritmaning kimyoviy tarkibi to‘g‘rilanadi.

➤ Sterillash vaqtida avtoklavning harorati va sterillash vaqti ko‘rsatmaga muvofiq amalga oshirilishi lozim;

➤ Sterillash tugagandan so‘ng ozuqa muhit pH ni tekshirish talab etiladi;

➤ Ozuqa muhit pH ni to‘g‘rilash uchun odatda 0,1 M-li natriy gidrooksidi yoki sirka kislotasi eritmasidan foydalaniladi;

➤ Tayyorlangan ozuqa muhit sterilligini tekshirish talab etiladi. Buning uchun tayyor bo‘lgan ozuqa muhiti sterillashdan so‘ng 28°C da 2-3 kun davomida termostatga qo‘yiladi.

➤ Ozuqa muhitlarni sovuq va quruq joyda saqlash talab etiladi;

➤ Probirkalarga quyilgan ozuqa muhitlarni 1-2 haftadan ortiq saqlash mumkin emas.

Mikroorganizmlarni ekish har doim yangi tayyorlangan ozuqa muhitda amalga oshirilish kerak.

So‘ngi yillarda tayyor ozuqa muhitlar sotuvga chiqarilgan bo‘lib, bu ishni ancha yengillashtirmoqda va mikrobiologik tadqiqotlar metodlarini standartlashtirishga yordam bermoqda.

## 2.2. Ozuqa muhitlari va ularni tayyorlash

Tuproq mikroorganizmlarini aniqlashda barchasi uchun universal holda ishlatiladigan ozuqa muhiti mavjud emas. Shuning uchun turli ozuqa muhitlari qo‘llaniladi. Ular orasida ko‘proq go‘shtli pepton bulyoni (GPB), go‘shtli pepton agari (GPA), suslo, GPA va jelatinali, Eshbi va Getchinson ozuqa muhitlari qo‘llaniladi. Organik azotni o‘zlashtiradigan mikroorganizmlar GPA yordamida aniqlanadi. Batsilyar ko‘rinishdagi bakteriyalarni aniqlashda E.H. Mishustin agarli aralashmadan: 1:1 nisbatda GPA + suslodan foydalanishni taklif qilgan. GPA odatdagiday tayyorlanadi, suslo-agar (pH 7,0) va 2% agar-agar qo‘shiladi. GPA va suslo-agar ekish oldidan aralashiriladi va chashkalarga quyib chiqiladi.

**Go‘shtli pepton bulyoni (GPB)** quyidagicha tayyorlanadi: yog‘siz go‘sht olinib pichoq yordamida mayda kubikchalar qilib maydalanadi yoki bo‘lmasa go‘sht qiymalagichdan o‘tkaziladi. Tayyor bo‘lgan farshdan 500 g olinib, 1 litr vodoprovod suviga aralashiriladi va ekstraksiya bo‘lishi uchun xona haroratiga 12 soatga yoki termostatga 30°C 6 soat, yoki 37-39°C 2 soat, 50°C da esa 1 soat qoldiriladi. Bu vaqt ichida go‘shtdan turli birikmalar, shu jumladan vitaminlar suvga chiqadi. Undan so‘ng marlidan suzib olinadi va filtrat 30 daqiqa davomida qaynatiladi. Qolgan massani paxtali filtrdan suzib olinadi va suv yordamida yana avvalgi holiga keltiriladi. Hosil bo‘lgan go‘shtli suvga 1% pepton va 0,5% NaCl solinadi. GPB – boy ozuqa muhiti hisoblanadi ammo, uning tarkibida deyarli

uglevod bo'lmaydi. Shuning uchun uning 100 ml ga 1-2 g uglevod qo'shiladi va 1 atm (120°C) da 20 daqiqa sterillanadi.

**Go'shtli pepton agarini (GPA) tayyorlash:** 1 litr GPB niga 15-20 g agar-agar qo'shib hosil qilinadi. Ozuqa muhiti agar erib ketguncha qaynatiladi va 40°C gacha sovutiladi. Ozuqa muhitining 20%-li Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> yordamida pH kuchsiz ishqoriy muhitga to'g'rilangandan so'ng, probirka va likobchalarga (10 ml) solib chiqiladi. Ozuqa muhit solingan idishlar 120°C da 20 daqiqa davomida sterillanadi.

Ekish oldidan belgilangan tuproq suspenziyasi (10<sup>-1</sup> va 10<sup>-2</sup>) 15 daqiqa davomida 70°C da qizdiriladi. Olingan tuproq namunasini suyultirishdan avval xona haroratida quritish, batsilyar ko'rinishdagi bakteriyalarning ko'proq aniqlash imkonini beradi.

Mineral holdagi azotni o'zlashtirish qobiliyatiga ega bo'lgan mikroorganizmlar, (shular qatori aktinomitsetlar ham) kraxmal-amiakli agar (KAA) ozuqa muhiti yordamida, tarkibi (g/l): suyultirilgan kraxmal – 10; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O - 1; NaCl – 1; CaCO<sub>3</sub> – 3; agar – agar – 20. Kraxmal ozuqa muhitga oz miqdordagi suvga suyultirilib solinadi.

Yuqorida ko'rsatilgan mikroorganizmlar guruhini ajratishda Chapek ozuqa muhitidan ham foydalanish mumkin. Tarkibi (g/l): glyukoza – 2,0; NaNO<sub>3</sub> – 2,0; K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,5; KCl – 0,5; CaCO<sub>3</sub> – 3,0; agar-agar – 20,0.

Ma'lum guruh bakteriyalar va aktinomitsetlarning o'sishini ingibirlovchi vositalar sifatida qo'shiladigan moddalar ularning o'sishiga ta'sir etishi zarur, ammo, ozuqa muhitida kechadigan reaksiyani o'zgartirish lozim. Natriy rodanit (NaCNS) 0,25-0,4 mol/l, bengal qizili (70 mg/l) shu bilan bir qatorda antibiotiklar: streptomitsin (40-50 mg/l), tetratsiklin, oksitetratsiklin, xlortetratsiklin (2-5 mg/l) shu bilan bir qatorda xloromitsetin (5 mg/l), neomitsin, polimiksin, batsitritin (50 mg/l) qo'llanilishi mumkin.

Saprolegniaceae oilasiga mansub zamburug'larni ajratish uchun esa pimaresitin va endomitsetin (5-10 mg/l) ishlatiladi. Yuqorida keltirilgan antibiotiklarning bir qanchasi bengal qizili bilan birgalikda ishlatiladi. Kam hollarda streptomitsin (80 mg/l) va bengal qizili (70 mg/l) qo'llaniladi.

Achitqilarni ajratish ipsimon zamburug'larning o'sishini to'xtatish suslo-agar muhitiga natriy propionatdan 2,5 gr/l qo'shiladi. Tuproq mikroflorasini son va sifat jihatdan tasvirlash uchun quyidagi ozuqa muhitlari ishlatiladi:

Chapek ozuqa muhiti bakteriyalar va aktinomitsetlar uchun: KCl – 0,5 gr; MgSO<sub>4</sub> – 0,5 gr; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1 gr; FeSO<sub>4</sub> – 0,01 gr; NaNO<sub>3</sub> – 2 gr; CaCO<sub>3</sub> – 3 gr; glukoza yoki saxaroza – 20 gr; agar – 20 gr.

Zamburug'larni o'stirish uchun ishlatiladigan Chapek muhitida esa 2 molekula suv tutuvchi kaliy gidrofosfat shuncha miqdordagi tarkibida bir molekula suv bilan kaliy gidrofosfat bilan aralashtiriladi. Bo'r qo'shilmaydi, ammo 4 mg/l miqdordagi kontsentrlangan sut kislotasi qo'shiladi.

Chapek – Doksa muhiti zamburug' uchun qo'llaniladi. Chapek muhiti tarkibiga quyidagi o'zgartirishlar kiritiladi: saxaroza 20 gr emas 30 gr, natriy nitrat 2 gr emas 3gr solinadi. Oliganitrofil mikroorganizmlar uchun esa ushbu muhit

quyidagi tarkibda ishlatiladi:  $K_2HPO_4$  – 0,2 gr;  $MgSO_4$  – 0,2 gr; NaCl – 0,2 gr;  $K_2SO_4$  – 0,1 gr;  $CaCO_3$  – 5 gr; saxaroza – 20 gr; agar – 20 gr.

Aktinomitsetlar va bakteriyalar uchun kraxmal ammiakli agar quyidagi tarkibda ishlatiladi:  $(NH_4)_2SO_4$  – 2,0 gr;  $K_2HPO_4$  – 1,0 gr;  $MgSO_4$  – 1,0 gr; NaCl – 1,0 gr;  $CaCO_3$  – 3,0 gr; kraxmal (eritilgan) – 10 gr; agar – 20 gr. Kraxmal dastlab oz miqdordagi suvda aralashtirilib, keyin boshqa ozuqa muhitiga solinadi.

### **Suslo-agari muhit (zamburug'lar va achitqilarni ajratish uchun)**

Emallangan (sirlangan) kostryulga 1 litr vodoprovod suvi solinadi, uni  $50^\circ C$  gacha qizdiriladi va 250 gr quritilib (maydalangan) tuyilgan solod (undirib yanchilgan bug'doy yoki arpa doni) solinadi. Aralashma  $57^\circ C$  gacha qizdiriladi va bu harorat bir soat davomida ushlab turiladi. So'ngra  $63^\circ C$  gacha ko'tarilib kraxmalga qo'yilga reaksiya (yod solish orqali ko'kartiriladi) yo'qolguncha ushlab turiladi. Kraxmalning shakarga aylanishi bo'yicha nazorat reaksiyasi chinni plastinka yoki qaynatishga mo'ljallangan likobchaga 1 tomchi susloni solib bug'latish orqali aniqlanadi. Tayyor bo'lgan suslo mato (kanopdan to'qilgan) yordamida suzib olingandan so'ng qog'oz filtdan o'tkaziladi. Shu yo'l bilan tayyorlangan suslo tarkibida 10-20% shakar bo'ladi. Shuning uchun saxarometr yordamida uning tarkibidagi shakar miqdori aniqlangandan keyin, tayyorlangan suslo zarur konsentratsiyagacha suv yordamida suyultiriladi. Ko'pincha 6-8% shakarli suslo ishlatiladi. Pivo suslosini  $115^\circ C$  da 20 daqiqa davomida sterillanadi.

Tayyor susloni pivo tayyorlash zavodlaridan olish mumkin. Agarli suslo tayyorlash uchun esa unga 2%li agar solinadi.

Zamburug'lar va achitqilarni tuproqdan ajratish uchun susloga 4 ml sut kislotasi yoki bakteriyalar o'sishini to'xtatuvchi boshqa moddalar qo'shiladi.

### **Nimchala (kambag'al) agar**

1 litr vodoprovod suviga 2% agar solinib,  $120^\circ C$  da 20 daqiqa davomida sterillanadi. Ayrim hollarda agar birlamchi tozalanadi.

### **Lokxid-tuproq ekstrakti**

$K_2HPO_4$  – 0.2 gr

Agar – 15 gr

Tuproq ekstrakti – 1 litr

$120^\circ C$  da 20 daqiqa davomida sterilizatsiya qilinadi. Sterilizatsiyadan so'ng, ozuqa muhiti neytral holatga keltiriladi. Tuproq ekstrakti kuchli o'g'itlangan va ishlov berilgan tuproqlardan tayyorlanadi. 3 ml li elakdan o'tkazilgan tuproq teng miqdordagi distillangan suv bilan aralashtiriladi. Aralashma bir soat davomida  $120^\circ C$  da avtoklavda sterillanadi. Issiq suspenziyani chiqarib tashlashdan oldin qog'oz filtdan o'tkaziladi.

### **Tuproqli agar**

Ochiq havoda quritilgan tuproq o'simlik qoldiqlari va boshqa aralashmalardan tozalanadi, hovonchada maydalaniladi va 1 mm li elakdan o'tkaziladi. Maydalangan tuproqni kolbaga solib, ustidan tuproqqa nisbatan 1:5

yoki 1:9 nisbatda distillangan suv solinadi. Sterillash avtoklavda 120°C da bir soat davomida amalga oshiriladi. Ayrim hollarda 1-2 sutka davomida bir necha marta sterillash amalga oshirilishi mumkin. Ozuqa muhit yaxshilab aralastirilgandan so'ng Petri likopchalarga quyilishi mumkin. Likopchaga ozuqa muhit tuproq zarralari bilan tushishi zarur. Bu ozuqa muhitiga mikroorganizmlarni yuzaga ekish uslubida ekiladi. Ozuqa muhit tayyorlashda unumdor ozuqalarga boy (parnik tuproqlari, torf, qora va boshqa xil) tuproqlardan foydalanish zarur. Ayrim hollarda mikroorganizmlarni ma'lum bir tuproqdan ajratish uchun ayni shu tuproqdan ozuqa muhiti tayyorlanadi.

#### **Vaksman pepton-dekstranli agari (zamburug'lar uchun)**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0 gr  
MgSO<sub>4</sub> – 0,5 gr  
Glyukoza – 10,0 gr  
Pepton – 5,0 gr  
Agar – 20,0 gr  
pH – 6,8

#### **Glyukoza – kartoshkali muhit (zamburug'lar uchun)**

Glyukoza – 20 gr  
Kartoshka qaynatmasi – 300 ml  
Agar – 15 gr

*(Barcha qiymatlar 1 litr suvda amalga oshiriladi)*

Kartoshka qaynatmasi. 300 gr kartoshkani 1 litr suvga solib 20 daqiqa davomida qaynatib, yana uning miqdorini 1 litrga yetkazish orqali tayyorlanadi.

### **2.3. Ekish materiali va idishlarni mikrobiologik tahlil uchun tayyorlash**

Ko'pgina hollarda tuproq mikroorganlarini o'rganish va sonini aniqlash Petri likopchasida amalga oshiriladi. Buning uchun bitta usul bir qator tuproq mikroorganizmlari: bakteriyalar, aktinomitsetlar, zamburug'lar va achitqilarni aniqlashda qo'llaniladi. Ozuqa muhiti tagiga yoki qatlamiga ekish kam hollarda ishlatiladi. Zamburug'larni aniqlashda ozuqa muhit orasiga ekishni tavsiya qilinadi. Bunday holatda 1 ml tuproq suspenziyasi likobchaga solingan va qotmagan agarga solib aylantiriladi va uning bir tekisda qotishi uchun tekis yuzaga qo'yiladi. Bunday usul shpatel yordamida tuproq suspenziyasini ozuqa muhit yuzasiga surtish vaqtida mitselliyning maydalanib, chashka yuzasiga tarqalishini oldini oladi. Ayrim hollarda bu usul bakteriyalarni aniqlashda ham qo'llaniladi.

Har bir tuproq namunasini ekish uchun quyidagilarni tayyorlash talab etiladi:

1. 100 ml sterillangan vodoprovod suvi solingan 250 ml li yumaloq tagli yoki Erlenmeyer kolba;
2. Agar tuproqni ezib suspenziya tayyorlash zarur bo'lganda, xuddi yuqoridagidek suvsiz, sterillangan kolba;
3. Tuproqni ezish (maydalash) uchun hovoncha;



4. 9 ml dan sterillangan vodoprovod suvi solingan probirkalar. Probirkalar soni qaysi suyultirish darajasidan ekish amalga oshirilishiga bog‘liq holda olinadi. Odatda 2 yoki uchta probirka olinadi.

5. Sterillangan pipetkalar 1 ml li pipetkalar soni ham suyultirish darajasiga bog‘liq holda tanlab olinadi. Har bir suyultirish darajasi uchun yangi pipetka talab etiladi. Shu bilan birga namunani Petri likopchasiga solish uchun ham yangi pipetka talab etiladi. Shuni ham inobatga olish kerakki, pipetkadagi 1 ml litr suyuqlik necha tomchini tashkil etadi. Odatda bu jihatidan pipetkalar farq qilganligi sababli bir xil tomchiga ega bo‘lgan pipetkalar olinishi zarur.

6. Sterillangan shpatellar, har bir suyultirish darajasi va har bir ozuqa muhit uchun alohida bir xil suyultirish darajasidan ekilayotgan va bir xil ozuqa muhit qo‘yilgan parallel chashkalar uchun bitta shpatel ishlatiladi.

7. Sterillangan Petri likopchasi. Har bir namunadan tayyorlangan suyultirish darajasi va alohida ozuqa muhitlar uchun 3-5 tadan likopcha. Ayrim hollarda 2 tadan parallel likobchalarga ekish amalga oshiriladi, bunday vaqtda hisoblash ishlari va natijalar aniq chiqmaydi.

8. Steril oziq muhitlar va kolbalar.

Sterillangan Petri likopchasiga suv hammomida eritilgan agarli ozuqa muhitidan har bir likobchaga 20-30 ml quyiladi. Ozuqa muhitlar odatda katta kolbadan bir qancha likobchaga quyiladi. Shuni esda saqlash kerakki, likopchalar bir xil formada va bir xil diametrda, tekis tagli bo‘lishi zarur. Ozuqa muhitini likopchaga quyishda ularning barchasiga bir xil miqdorda solinishiga e‘tibor berish kerak. Bir qator hollarda aniq o‘lchangan ozuqa muhitlar probirkalarga solinadi, probirkalarda sterillanadi va Petri likopchasiga solinadi, bu usul qo‘llanilganda likopchadagi ozuqa muhit miqdori standartga mos holda solingan bo‘ladi. Ozuqa muhit solingan likopchalar tekis, qat‘iy gorizontal yuzaga qo‘yilishi lozim, chunki undagi ozuqa muhit bir xil qalinlikda qotishi maqsadga muvofiqdir.

Likobchaga quyilayotgan agar qotib qolmasligi lozim, yaxshisi uning harorati 50°C bo‘lganda quyish maqsadga muvofiq bo‘ladi, bunday holatda likopcha qopqog‘iga kamroq suv kondensatlanadi. Agar qotgandan so‘ng, likopchalar quritish shkafiga qo‘yiladi va 70-80°C gacha qizdiriladi, qopqoqdan suv yo‘qolguncha hamda agar yuzasida silliq plyonka hosil bo‘lguncha quritiladi. Bu agar yuzasidan suv plyonkasining ketganligidan darak beradi. Likopchani quritishning boisi, ekilgan namunadan o‘sib chiqqan mikroorganizmlar agar yuzasida suvda suzib aralashib ketmasligi uchun zarur bo‘ladi. Zamburug‘larni ajratish va sonini aniqlashda likopcha har doim ham quritilmaydi.

Likopcha quritilgandan so‘ng ekish amalga oshirilishi lozim. Ozuqa muhit solingan likopchani uzoq muddat ekilmasdan saqlab bo‘lmaydi, chunki havodan mikroorganizmlar tushib, ko‘z bilan ko‘rib bo‘lmaydigan mikrokoloniyalar hosil qilishi mumkin. Ekish vaqtida ular shpatel orqali butun ozuqa muhit yuzasida tuproq mikroflorasiga tegishli bo‘lmagan koloniyalarni hosil qilishi mumkin.

Ekish uchun tayyorlangan tuproq suspenziyasini 5 daqiqa chayqatilgandan so‘ng 30 sekund davomida yirik tuproq zarralari cho‘kishi uchun tindiriladi.

Soʻngra sterillangan pipetka yordamida undan 1 ml olinib, 9 ml sterillangan suv solingan probirkaga solinadi. Suspenziyani yangi pipetka yordamida yaxshilab aralashtiriladi va undan 1 ml olinib keyingi probirkaga solinadi va xuddi yuqoridagidek aralashtiriladi. Keyingi suyultirishlar ham xuddi shunday amalga oshiriladi. Zarur suyultirishlardan likopchaga ekish amalga oshiriladi. Buning uchun 1 tomchi suspenziya agarli ozuqa muhit yuzasiga surtib chiqiladi. Ekish amalga oshirilgan likopcha toʻnkarilgan holatda termostatga joylashtiriladi.

Odatda bakteriyalar soni 3 sutkadan soʻng hisoblanadi, aktinomitsetlar 7-15, 20 kunda zamburugʻlar va achitqilar 5-7 sutkadan soʻng hisoblanadi. Agar mikroorganizmlar nimchala ozuqalarda, jumladan agarli suv, tuproq ekstrakti kabilarda ekilgan boʻlsa, 7-14 sutkada hisoblash amalga oshiriladi. Maʼlum bir guruh mikroorganizmlarning miqdor koʻrsatkichlari toʻgʻrisida solishtirma maʼlumot olish uchun bir xil muddatlarda hisoblash ishlarini amalga oshirish zarur. Shuni eʼtiborga olish zarurki, uzoq muddat inkubatsiya vaqtida juda koʻp mikroorganizmlar koloniyasi oʻsib chiqadi.

Likopchadagi koloniyalar soni odatda likopchani qora fonga toʻnkarilgan holatda qoʻyib sanaladi. Sanalgan koloniyalar oʻrniga ruchka yoki moʻyqalam yordamida ikki marta sanalmasligi uchun nuqta qoʻyiladi. Sanash qulay boʻlishi uchun likopchani osti qalam bilan qismlarga boʻlinadi. Tiniq boʻlmagan muhitlarda esa sanash likopcha yuzasidan amalga oshiriladi.

#### **2.4. Tuproq boʻlakchalari metodi**

Agar tuproqda oʻrganilayotgan guruh mikroorganizmlar oz miqdorda boʻlsa, ularni zarurat tugʻilganda boyitilgan kultura olmasdan tuproq boʻlakchalarini agarli ozuqa muhiti yuzasiga qoʻyish orqali ajratish mumkin. Odatda 0,5-0,10 gr tuproq olinib, pastasimon holatga kelguncha suv solib aralashtiriladi va uni agar yuzasiga parallel holatda qoʻyib chiqiladi. Albatta bir nechta parallel likopchalarga ekishni amalga oshirish zarur. Tuproq boʻlakchalarini bir tekis va oson qoʻyish uchun likopcha orqasiga trafaret qoʻyish ishni osonlashtiradi. Albatta ekish bir necha parallel likopchalarga amalda oshirish lozim.

Mikroorganizmlar oʻsgandan keyin maʼlum guruh mikroorganizmlar oʻsgan tuproq boʻlakchalarining foizi hisoblab topiladi, bu mikroorganizmlarni chuqurroq oʻrganish zarurati tugʻilganda yoki ularning toza kulturasini olish uchun tuproq boʻlakchalari atrofidan mikroorganizmlarni olish mumkin. Bu usulda tuproqdan azotobakter, nitrifikatorlar, tselluloza parchalovchi mikroorganizmlar, zamburugʻlar, lipomyces avlodiga mansub achitqilarni ajratish, sonini aniqlash, shu bilan bir qatorda unumsiz tuproqlardan, masalan qumdan bakteriyalarni aniqlash kabilarda qoʻllaniladi.

Azotobakterni aniqlashda tuproq boʻlakchalari mikroorganizmlar yaxshi oʻsadigan Eshbi yoki boshqa ozuqa muhiti yuzasiga ekiladi. Buning uchun 100 mg tuproq pastasimon holatga kelguncha suyuqlantiriladi va bakteriyalogik ilmoq yordamida ikkita petri likopchasi yuzasiga qoʻyib chiqiladi va har bir likopchada 50 tadan boʻlakka toʻgʻri kelgani maqsadga muvofiq hisoblanadi. Tuproqdan lipomitsetlar miqdori ham xuddi shunday saxaroza solingan Eshbi muhitiga ekish orqali aniqlanadi. Ekishdan soʻng likopchalar 26-28°C ga nam kameraga

joylashtiriladi. Azotobakterni hisoblash 6-10 sutkada, lipomitsetlar 15-20 sutkada amalga oshiriladi.

Selluloza parchalovchi mikroorganizmlarni o'rganishda kremniy kislotali gel yoki boyitilmagan agardan foydalaniladi. Keyingi ozuqa muhiti 1,5-20%-li agar solingan distillangan suvdan iborat bo'ladi, buning uchun agar yuzasiga aylana qilib qirqilgan va yaxshilab yuvilgan hamda Vinogradskiy yoki Getchinson muhitiga namlangan filtr qog'ozi qo'yiladi. Uning ustidan 25 ta tuproq bo'lakchalari qo'yib chiqiladi. Likopchalar 25-30°C da nam kameraga joylashtiriladi va mikroorganizmlarning o'sishi kuzatib boriladi. Mikroorganizmlar o'sgan tuproq bo'lakchalari soni sanalib unda o'sgan mikroorganizmlar xarakteri aniqlanadi.

#### Getchinson va Kleyton muhiti

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ – 1,0 gr	
$\text{CaCl}_2$ – 0,1 gr	
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 gr	1 litr distillangan
$\text{NaCl}$ – 0,1 gr	suv
$\text{FeCl}_2$ – 0,01 gr	
$\text{NaNO}_3$ – 2,5 gr	

#### Vinogradskiy muhiti

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ – 1,0 gr	
$\text{MgSO}_4$ – 0,5 gr	200 ml distillangan
$\text{NaCl}$ – 0,5 gr	suv
$\text{FeSO}_4$ – 0,01 gr	
$\text{MnSO}_4$ – 0,01 gr	

Petri likopchasiga qo'yilgan agar geli yuzasidagi 10 sm li diametrga ega bo'lgan filtr qog'ozi namlash uchun quyidagilar aralashiriladi:

Kontsentrlangan tuzlar eritmasi – 2,0 ml
$\text{CaCO}_3$ – 0,02 gr
$\text{KNO}_3$ – 0,036 gr
Distillangan suv – 10 ml
Kaliy yodid KJ 2%-li – 6 tomchi pH-7,2

#### O'z-o'zini nazorat qilish uchun savollar:

1. Go'shtli pepton bulyoni qanday tayyorlanadi?
2. Go'shtli pepton agari qanday tayyorlanadi?
3. Getchinson va Kleyton ozuqa muhiti va uning tarkibi nimalardan iborat?
4. Tuproq namunasini mikrobiologik tahlil uchun tayyorlashda qanday ishlar amalga oshiriladi?
5. Tuproq bo'lakchalari usuli qanday amalga oshiradi?

### **3-bo'lim. Tuproq mikroorganizmlarining mikroskopik tahlili**

#### **3.1. To'g'ridan-to'g'ri mikroskopiya usuli yordamida tuproq mikroorganizmlarini o'rganish va hisoblash**

To'g'ridan to'g'ri mikroskopiya usuli yordamida tuproqda mavjud mikroorganizmlarni kuzatish mumkin. Bu tuproqning umumiy biologik aktivligini aniqlashda muhim ahamiyat kasb etadi. Shu bilan birga tuproqda mikroorganizmlarning rivojlanishini ko'rish imkonini beradi, bundan tashqari tuproq mikroorganizmlarining senozlarini ko'rish, tuproqdagi mikroorganizmlarning o'zaro munosabatlarini aniqlash, masalan, mikroorganizmlar orasidagi antagonistik munosabatini, tuproqda mikroorganizmlarning antibiotik hosil qilishini isbotlash uchun muhim hisoblanadi. Bu usullar tuproqda mikroorganizmlar tarqalgan mikroo'choqlarini ochib beradi va shu bilan bir qatorda biologik aktiv moddalarning ta'sir xarakterini tushunishga yordam beradi. N.A.Krasilnikovning ko'rsatishicha, biologik aktiv moddalar, jumladan, antibiotiklar tabiiy sharoitda tuproqning barcha qismini ta'minlay olmaydi, ammo mikrob-antagonist joylashgan mikroo'choqlarga va begona mikroflora vakillarini kirishiga yo'l qo'ymaydigan sharoitni yuzaga keltirishga ta'sir etadi. Ko'p hollarda mikolitik bakteriyalar va zamburug'lar orasida antagonizm hodisasini kuzatish mumkin. Bu usullar tuproqqa sun'iy holatda produtsentlarning biologik aktiv moddalar (masalan, azotobakter va bashq.) solinganda ularning rivojlanishini o'rganish imkonini beradi. Bundan tashqari sun'iy holatda tuproqqa solingan fiziologik faol moddalar, masalan, antibiotiklarning tuproq mikroflorasiga ta'siri hamda bunday moddalar ta'sirida mikroflorada ro'y beradigan o'zgarishlarni kuzatish mumkin.

#### **3.2. Vinogradskiy usuli**

Tuproq suspenziyasini bo'yalmagan holatda mikroskopik yo'l bilan o'rganilganda unda ko'p bo'lmagan hujayralar asosan tayoqchasimonlar, kam holatda zamburug' gifalari va aktinomitsetlar aniq ko'rinadi. Ko'p hollarda mikroorganizm hujayralarining tuproq zarrasidan farqlash juda qiyin, hujayralar tuproq zarralariga adsorbtsiyalangan holatda yoki o'ziga kichik tuproq zarrachalarini yopishtirgan holatda va ko'pgina tuproq zarralari shakli va o'lchami jihatdan kokksimon hujayralarga o'xshash bo'ladi.

To'g'ridan to'g'ri mikroskopiya usulini qo'llash X.Kann va S.N.Vinogradskiylar tomonidan tuproq suspenziyasini kislotali bo'yoqlar bilan bo'yash taklif etilgandan so'ngina mumkin bo'ldi. Bu bo'yoqlar mikroorganizm hujayralarini juda yaxshi bo'yaydi va tuproq zarralarini esa kuchsiz bo'yaydi. To'g'ridan to'g'ri mikroskopiya usuli shuni ko'rsatadiki, tuproq qattiq agarli muhit yordamida aniqlashdan ko'ra yuzlab yoki minglab marta ko'proq mikroorganizmlarni o'zida saqlar ekan.

**O. G. Shulgina modifikatsiyasi.** Mikroorganizmlar sonini aniqlashda odatda Vinogradskiy usulining O.G.Shulgina taklif etgan modifikatsiyasidan foydalaniladi. Buning uchun maydonning turli nuqtalaridan olingan 5 gr tuproq 50 ml distillangan suv solingan 250 ml li Erlenmeyer kolbasiga solinadi. Suspenziya

tayyorlashdan oldin xuddi oldingi ishlar kabi tuproq chinni xovonchaga ozroq miqdordagi suv bilan yaxshilab eziladi va probirkaga solinadi. Suyultirish uchun olingan suv ham mikroorganizm hujayralaridan holi bo'lishi lozim. Shundan so'ng, uni kolbaga solib 5 daqiqa davomida yaxshilab aralashtiriladi va 1-2 sekund davomida tindiriladi. Tindirish natijasida yirik tuproq zarralari cho'kkanidan so'ng, pipetka yordamida toza, yog'sizlantirilgan buyum oynasi yuzasiga bir tomchi (0,01 ml) tuproq suspenziyasi tomiziladi. Shuni e'tiborga olish zarurki, pipetkada hujayralar cho'kib to'planmasligi zarur, shuning uchun jarayon juda tez bajarilishi kerak. Pipetkadan tomish boshlanganda uni gorizontol holatda tutish talab etiladi. Tomchi bilan bir vaqtda buyum oynasi yuzasiga bir tomchi 0,1%-li agar-agar (distillangan suvda eritilgan) tomiziladi. Agar-agar va tuproq suspenziyasi sterill qoplag'ich oyna yordamida buyum oynasi yuzasiga taxminan o'lchami 4-8 sm bo'lgan to'g'ri to'rtburchak maydonga yoyiladi. To'rtburchakning eni buyum oynasi eniga moslab olinadi. Tajribalar uchun yaxshilab tozalangan va yog'sizlantirilgan oynalar olinadi.

Preparat olovda yoki havoda quritiladi, 96% li spirt yordamida fiksirlanadi va karbolli eritrozin (5 gr dan karbol kislotasi va eritrozin 100 ml suvda eritiladi) yordamida bo'yaladi. Bo'yash bo'yoqning sifatiga bog'liq ravishda 30 sekunddan bir sutkagacha amalga oshirilishi mumkin. Shuni e'tiborga olish zarurki, bo'yash vaqtida preparat qurimasligi lozim, shuning uchun uni odatda taglikka qo'yilgan holda eksikator yoki kristalizatorga joylashtiriladi, yoki buyum oynasi bo'yoq solingan ingichka stakanga solinadi. Bo'yoq preparatni 4-5 marta suvli stakanga ketma-ket botirib olish yordamida yuvib tashlanadi. Preparat quritiladi va 90x immersion obyektivda ko'rib, hujayralar soni hisoblanadi. Bunda mikroskopda ishlash qoidalariga qat'iy ravishda amal qilish talab etiladi.

Yu.I.Sorokin yaqqol ko'rinish namoyoni bo'lishi uchun eritrozin yuvilgandan so'ng, 100-200 marta suyultirilgan karbolli fuksin bilan preparatni bug' hosil bo'lguncha qizdirishni taklif etadi. Bu usulda mikroorganizmlarni aniqlash uchun 5 tadan kam bo'lmagan buyum oynasiga preparat tayyorlanishi zarur. Barcha preparatlarda aniqlangan mikroorganizmlar hujayrasi soni umumlashtiriladi va 1 gr havoda quritilgan yoki absolyut quruq tuproqdagi hujayralar soni belgilangan formula yordamida hisoblab topiladi.

Aniq ma'lumotlar olish uchun bitta buyum oynasidan kamida o'nta ko'rish maydoni o'rganib chiqiladi. Ko'rib turgan maydon  $p=\pi r^2$  ( $\pi=3,14$ ) formula yordamida aniqlanadi. Masalan, Petri likopchasining maydoni quyidagicha hisoblab topiladi:  $p=3,14 \times 5^2=78,6$  sm. Ko'rish maydonining diametri obyektiv mikrometr yordamida aniqlanadi. Hisoblash quyidagi formula yordamida topiladi:

$$K=P/p$$

Formuladagi, K - ko'rish maydonining sonini, P – surtma diametrini (agar 4 sm<sup>2</sup> bo'lsa 400 mm<sup>2</sup> bo'ladi), p – ko'rib turgan maydon diametrini anglatadi.

**Hisoblash bo'yicha namuna:** Agar ko'rish maydonining diametri 0,16 mm bo'lsa, ko'rish maydoni 0,02 mm<sup>2</sup> ni tashkil qiladi, bunda ko'rish maydonining soni quyidagicha hisoblab topiladi:

$$K=P/p=400 \text{ mm}^2/0,02 \text{ mm}^2 = 20 \text{ 000 ta}$$

Ko'rish maydonidagi o'rtacha mikroorganizmlar soni ko'rish maydoni soniga ko'paytirilsa 0,01 ml suspenziyadagi mikroorganizmlar soni kelib chiqadi, 1 ml suspenziyadagi mikroorganizmlar soni esa 0,01 ml suspenziyadagi mikroorganizmlar sonini 100 ga ko'paytirish orqali aniqlanadi.

Mikroorganizmlar soni aniqlangandan so'ng, tuproqdagi mikroorganizmlar biomassasi miqdorini aniqlashga to'g'ri keldi. Buning uchun mikroorganizmlar hujayralarining shu tuproqda uchraydigan o'rtacha miqdorini mikroskop yordamida hujayra o'lchami o'rganilgandan so'ng aniqlanadi. Undan so'ng bir gramm tuproqdagi hujayralar soni o'rtacha hujayralar hajmiga va ularning solishtirma og'irligiga ( $d=1.10 \text{ gr/sm}^3$ ) ko'paytiriladi. Mikroorganizmlar biomassasi ga/t sifatida aniqlanadi.

### 3.3. Xolodniyning shisha yuzasida o'stirish usuli

Yuqorida keltirib o'tilgan usullarning birortasi ham tuproq mikroorganizmlarining tabiiy landshaftdagi tarqalishi haqidagi ma'lumotlarni olish imkonini bermaydi. Bu kamchilikni N.G.Xolodniy metodi to'ldiradi. Buning uchun tuproqqa inert (harakatsiz) yuza – oyna kiritiladi va unda tuproqning mikroorganizmlari tabiiy holdagiga yaqin holatda o'sadi. Shuni e'tiborga olish kerakki, oyna mikroorganizmlar uchun absolyut inert yuza vazifasini bajara olmaydi, shu bilan bir qatorda, oynani kiritish tuproqda sun'iy to'siqning hosil bo'lishiga hamda unda suyuqlik va havo tsirkulyatsiyasini o'zgartiradi. Tuproq mikroorganizmlari tuproq zarralarini o'rab turuvchi organo-mineral kolloid plyonkalarda yaxshi o'sadi. Shuning uchun oyna o'rniga boshqa materiallarni ishlatish ustida izlanishlar olib borilmoqda, ammo hali to'liq o'z yechimini topgani yo'q.

Xolodniy metodi mikrobiologiya amaliyotida keng qo'llaniladigan qimmatli usullardan biri hisoblanadi. Uning yordamida tuproq mikrotsenzorlari haqidagi juda qiziqarli ma'lumotlar, yangi formalarning ochilishiga erishilgan.

Buyum oynasini tuproqqa bostirishdan oldin konsentrlangan sulfat kislota yordamida tozalanadi va distillangan suvda yuviladi. Buning uchun tuproq yuzasida pichoq yordamida kesma hosil qilinadi va unga buyum oynasi vertikal (tik) ya'ni tuproq yuzasiga uzunasiga perpendikulyar holatda joylashtiriladi.

Ustidan tuproq bilan yopiladi, buyum oynasi butun tajriba davomida ochiq holda qolmasligi lozim. Chuqur qazish vaqtida dastlab pichoq vertikal holatda tuproqqa suqiladi va undan so'ng qarshi tomonga bosiladi.

Oyna vertikal devorga joylashtiriladi. Imkoni boricha tuproqning tabiiy zichligini saqlagan holatda, chuqurni ko'mish vaqtida ham shunday zichlikni saqlab qolish zarur. Oyna tuproq yuzasidan kamida 2–3 sm chuqurlikda ko'milishi zarur. Bunda bir nechta parallel oynalar ko'miladi. Oynalar ko'milgan joy

belgilab (metka) qo'yilishi zarur. Oyna tuproq sharoitini hisobga olgan holda bir necha kundan bir necha oy va undan ko'proq saqlanishi mumkin. Ular kamida 2 muddatga qo'yiladi va har 3-4 kunda olinib, preparatdagi o'zgarishlar kuzatib boriladi.

Muddat tugagandan so'ng, oynaning orqa tomonidan chuqur qaziladi va oyna shu chuqurga tuproqdan ajratib tushiriladi. Oynani tuproqdan ajratishda uning tuproqdagi ishqalanishiga yo'l qo'ymaslik kerak. Oynaning ostki (orqasi) tomoni yaxshilab artiladi, yuqori tomoni esa havoda quritilib, gaz gorelkasida fiksirlanadi. Fiksirlangan buyum oynasi yuqori qismini pastga qaragan holatda 1 daqiqa davomida suvli stakanga solib qo'yiladi. Bunda oynadan keyingi jarayonlarga halaqit beruvchi yirik tuproq bo'lakchalari tushib ketadi. Yuvishdan so'ng, preparat karbolli eritrozin yordamida 30 daqiqadan 24 soatgacha bo'yaladi. Bo'yoq to'kilgan oyna shisha bilan yopilgan kristalizator yoki boshqa nam kameraga qo'yiladi. Bo'yash jarayonida oyna qurib ketmasligi zarur. Preparatni o'rganish immersio apparatda amalga oshiriladi.

#### **Nazorat savollari:**

1. To'g'ridan-to'g'ri mikroskopiya usulining afzalligi nimada?
2. To'g'ridan to'g'ri mikroskopiya usulini qanday amalga oshiriladi?
3. Bu usulda mikroorganizm ekmasini bo'yashda qanday bo'yoqdan foydalaniladi?
4. Xolodniy usuli qanday usul?
5. Xolodniy usuli yordamida mikroorganizmlarni o'rganish qanday amalga oshiriladi?

## 4-bo'lim. Tuproqning mikrobiologik tahlili

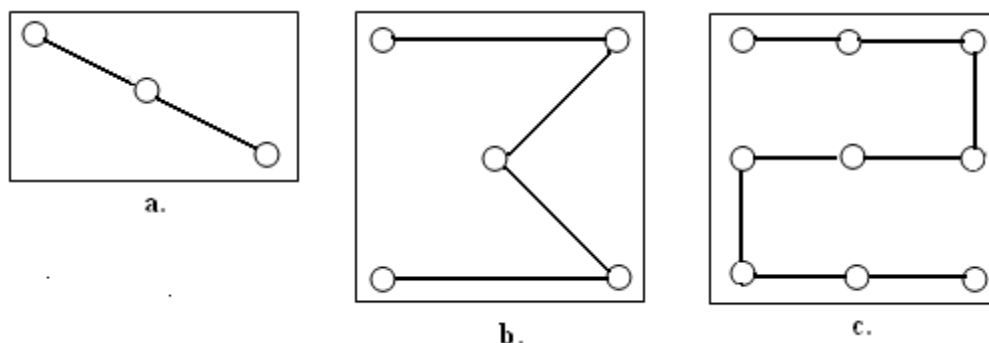
### 4.1. Tuproq namunasini olish va mikrobiologik tadqiqotlar uchun tayyorlash hamda ozuqa muhitiga ekish texnikasi

Tuproq namunasini olishda juda katta e'tibor berish kerak, chunki olinadigan natijalar tuproq namunasining qay darajada to'g'ri olinganligiga bog'liq. Ko'p hollarda beparvo tuproq namunasi olingan joy mikroorganizmlarning geografik tarqalishiga oid ma'lumotlarning xato bo'lishiga sabab bo'lishi mumkin.

Tuproq namunasini olishdan avval kundalikka tadqiqot rayoni tanlangan uchastka yoki tajriba maydonining relyefi, o'simliklar qoplami, agrotexnikasi va tuproqning tavsifi haqidagi ma'lumotlarni tuproqshunos mutaxassislardan foydalangan holda kiritish lozim.

Tuproqda mikroorganizmlar bir xil tarqalmagan bo'lib, ular mikro va makro o'choqlarda (manba) tarqalganligini e'tiborga olib, katta miqdordagi tuproq namunasini tahlil qilishni talab etadi. Variatsion-statistik uslublar har bir tekshiruvni bir necha qayta amalga oshirishni talab etadi.

Tuproq mikroorganizmlarni ko'payadigan qulay muhiti hisoblanadi. O'rtacha tuproq namunasi alohida olingan bir nechta tuproq namunalarini aralashtirish orqali hosil qilinadi va namuna olinadigan nuqtalar soni tekshirilayotgan maydonga bog'liq bo'ladi. Masalan, 100 m<sup>2</sup> maydonning uchta joyidan, 100 m<sup>2</sup> dan yuqori maydonning beshta joyidan, 1 ga maydonning 15 nuqtasidan namunalarni rasmda keltirilgandek olish tavsiya etiladi (5-rasm).



**5-rasm. Tuproqdan namuna olish chizmasi (sxemasi):** 1-diagonal; 2-konvert; 3-zig-zag usulida

Tuproqning haydalma qatlamini o'rganishda, uning 2 sm yuza qatlamini olib tashlab, namunalar genetik gorizontlarga binoan (pastdan yuqoriga qarab) haydalma qatlamning barcha qismidan olinadi.

Tuproq namunasi steril burg'u, belkurak yoki pichoq yordamida olinadi. Buning uchun namuna olishdan avval ular yaxshilab tozalangandan so'ng, spirt surtilib yoqib sterillanadi va oldindan sterillab tayyorlangan yo'g'on bo'yinli og'zi qopqoq yordamida yopilgan, sterill shisha banka yoki polietilen xaltachaga olinadi. Namuna olingan polietilen xaltacha yoki bankaga namuna olingan joy, gorizont va boshqa ma'lumotlar yozilgan etiketka yopishtiriladi.

Tuproqni mikrobiologik tahlil qilish uchun quyidagi operatsiyalar amalga



oshirilishi zarur: 1) tuproq agregatlarini maydalash; 2) tuproq zarrasi yoki organomineral gel yuzasidan tuproq mikroorganizmlarini desorbtsiyalash; 3) mikroorganizmlar koloniyasini dezagregatsiyalash. Bularning barchasi bir-biriga yaqin va o'xshash usullar yordamida amalga oshiriladi. Tuproq namunalariga mexanik va kimyoviy usullar yordamida ishlov berish mumkin. Mexanik ishlov berish ularning ichidan eng samaralisi hisoblanadi. Shu bilan bir qatorda, istalmagan holda mikroorganizmlar ko'paytiriladigan ozuqa muhitiga kimyoviy moddalarning aralashtirishi kuzatiladi, imkoni boricha kimyoviy moddalarni ishlatishdan cheklanish zarur.

Tuproq namunalari steril holatdagi pergament paketlar yoki paxta qopqoq bilan yopilgan shisha bankalarga olinadi. Paketlarga yoki bankalarning etiketkalariga oddiy qalam bilan namuna tartib raqamini, gorizont va namuna olingan chuqurlik va namuna olingan sana yoziladi.

Namuna olingandan so'ng, imkoni boricha tez muddatda mikrobiologik ekishni amalga oshirish zarur, yaxshisi shu kuni amalga oshirilgan maqsadga muvofiqdir. Agar namuna olinayotgan vaqtda tuproq ho'l bo'lsa va uzoq muddat saqlansa undagi mikroorganizmlar soni o'zgarishi mumkin. Ayniqsa tuproqning quyi gorizontlaridan olingan namunalarda soni juda tez ko'payadi.

Tez tekshirish imkoniyati mavjud bo'lmagan taqdirda tuproq namunasini quritib, keyinchalik tekshirishni amalga oshirish zarur. Shuni e'tiborga olish kerakki, quruq tuproqlarda mikroorganizmlar soni yangi olingan tuproqqa nisbatan sezilarli darajada kam bo'ladi, shu bilan bir qatorda alohida guruh mikroorganizmlar hujayrasi quritishda nobud bo'ladi. Agar namunani quritish zarur bo'lsa, uni namuna olingandan so'ng, qisqa muddatda 30°C dan past haroratda quritish zarur. Namunaning o'z holiga va sekin qurishi mikrofloraning kuchli o'zgarishiga sabab bo'lishi mumkin. Namlikning kamayishi namunada zamburug'larning kuchli rivojlanishiga sabab bo'ladi va bu guruh boshqalarning rivojlanishiga salbiy ta'sir ko'rsata boshlaydi. Agar nam tuproq namunalari probka bilan yopilgan shisha bankaga joylashtirilsa, qayta tiklanish jarayoni yaxshi rivojlanadi va mikroflora juda tez o'zgaradi.

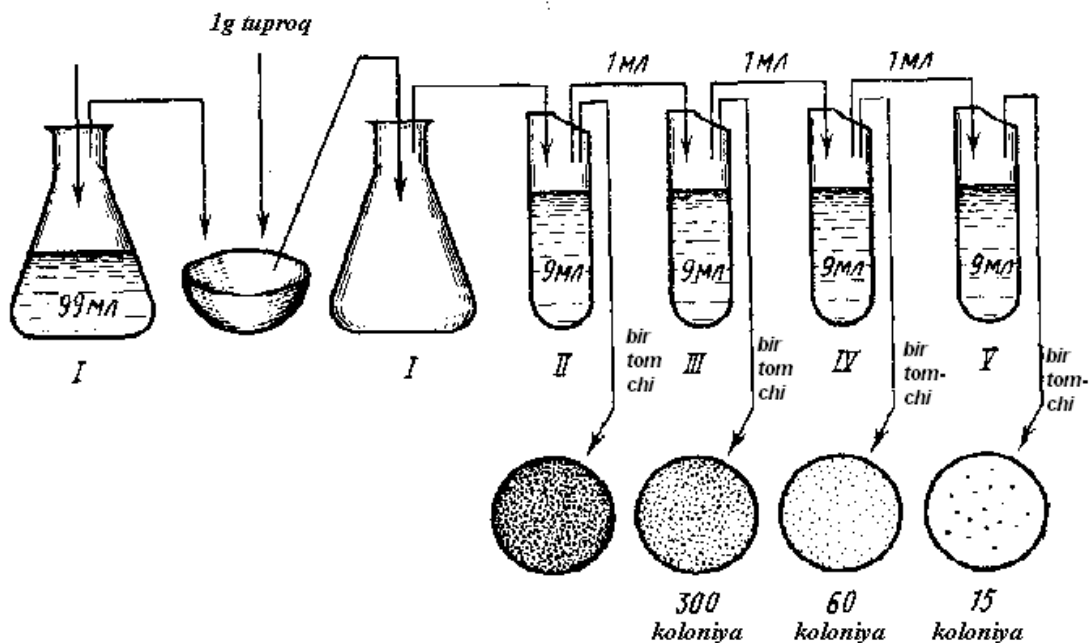
Quruq namunalarni steril bankalarda yoki pergament paketlarda gazlamadan (bo'z) tayyorlangan xaltachalarga joylashtirilgan holda saqlash zarur.

Ultratovush qurilmasi yo'q bo'lgan holatda (masalan, tuproqdan zamburug'larning toza preparatini olishda) tuproqni 5 daqiqa davomida pastasimon holatga kelguncha chinni xovonchada rezina mo'yqalam yoki rezina qo'lqop kiydirilgan barmoq yordamida ezib tayyorlanadi. Bundan tashqari tuproq suspenziyasini elektron meshalka yordamida (2 - 3 ming aylanishda 5 -10 daq.) ishlov berish yaxshi samara beriladi. Yig'ilgan tuproq namunalari asosan birinchi sutkada tekshirishi zarur. Buning iloji bo'lmasa tuproq namunasini ikki kun davomida sovuq kamerada saqlash mumkin. Tuproq namunalarining o'rtacha bir xilligini ta'minlash uchun asseptika qoidalariga rioya qilgan holda u yaxshilab aralashtiriladi, o'simlik ildizlari va turli kiritmalardan tozalanadi.

## 4.2. Tuproq namunasini ozuqa muhitga ekish texnikasi

Ekishdan oldin nam yoki quruq tuproq yaxshilab aralashtiriladi va spirt bilan ajratilgan oyna yuzasiga to'kib, ortiqcha narsalardan tozalab olinadi. Undan 1 g tuproq olinib, yuqorida keltirib o'tilgandek tayyorlanadi va 99 ml sterillangan vodoprovod suvi solingan kolbaga solinadi. Aniqlanishicha, 1 g tuproqni 0,4-0,8 ml suv bilan sterillangan chinni hovonchaga solib 5 daqiqa davomida rezina mo'yqalam yordamida 5 daqiqa davomida pastasimon holatga kelguncha aralashtirilsa mikroorganizmlarning ajralishi yaxshi bo'ladi.

Tuproq suspenziyasini tayyorlash uchun dastlabki 1 g tuproq namunasi solingan kolbadan 5 daqiqa davomida yaxshilab aralashtiriladi va 10 daqiqa davomida tindiriladi. Undan 1 ml olinib, 9 mldan sterillangan vodoprovod suvi solingan probirkalarning birinchisiga solib aralashtiriladi, bu probirkadan 1 ml olinib keyingisiga solish orqali suyultirib boriladi (6-rasm).



6-rasm. Tuproq suspenziyasini tayyorlash

Qattiq ozuqa muhitga ekish 1 : 10; 1 : 100; 1 : 1000 va boshqa suyulish darajalaridan o'rganilayotgan mikroorganizmlar guruhi, tuproq tipi va uning namlik darajasi kabilarga bog'liq ravishda amalga oshiriladi. Ozuqa muhitga ekishda bakteriya va aktinomisetlarning 50-200 tagacha, zamburug'larning 30-50 ta koloniyasi hosil bo'ladigan suyulish darajasidan 3-5 tagacha Petri likopchasiga ekish tavsiya etiladi.

Buning uchun pepetka yordamida 1 ml tuproq suspenziyasi olinadi va ozuqa muhiti quyilgan Petri likopchasiga tomiziladi va Dragilskiy shpateli yordamida teng miqdorda yoyib chiqiladi. Ekilgan likopchalarga tegishli ma'lumotlar yoziladi va to'ng'arilgan holatda 5-7 kun davomida termostatga joylanadi.

**O‘z-o‘zini nazorat qilish uchun savollar:**

1. Mikrobiologik tahlil qilish uchun tuproq namunasini olishning qanday usullari mavjud?
2. Ozuqa muhitga ekish uchun tuproq namunasi qanday tayyorlanadi?
3. Seriyali suyultirish usuli yordamida qattiq ozuqa muhitiga mikroorganizmlarni ekish qanday amalga oshirilishini izohlang.

## **5-bo'lim. Mikroorganizm kulturasini saqlash**

### **5.1. Umumiy qoidalar**

Laboratoriya sharoitida u yoki bu mikroorganizmni o'stirish uning biokimyoviy xususiyatlari yoki hujayra va koloniya morfologiyasining o'zgarishiga olib kelishi mumkin. Bunday o'zgarishlarga aktinomitsentlar havo mitseliysi hosil bo'lishning to'xtatishi, bakteriyalar sellulozani parchalanishining yo'qolishi, atmosfera azotini o'zlashtirishning sustlashishi yoki batamom to'xtashi kabilarni keltirish mumkin. Bunga o'xshash o'zgarishlarning ortishi juda zich holda ekish amalga oshirilganda, ozuqa muhit tarkibi o'zgarganda, yoritilish sharoitiga, namlik va harorat o'zgarganda vujudga kelishi mumkin. Maxsus adabiyotlarda mikrobiologik kulturalarni to'g'ri saqlash usullari keltirilgan. Ulardan eng asosiylari o'stirilayotgan mikroorganizmning hayotiy jarayonlarini minimum darajaga saqlashga asoslangan.

Bundan kelib chiqib, shunga harakat qilish lozimki, shtamlarni kamdan kam o'tkaziladigan ekishni bir xil vaqt o'tkazib va har doim tarkibi bir xil bo'lgan ozuqa muhitida amalga oshirish lozim.

O'sgan kultura sovuq, quruq shkafga yoki 5°C da sovutgichga saqlash talab etiladi.

### **5.2. Mikroorganizmlarni tuproqda saqlash**

Zamburug'lar, aktinomitsetlar va bir qator spora hosil qiluvchi bakteriyalar kabi mikroorganizmlarni quritilgan holatda sterillagan tuproqda yoki kvarts qumda saqlash mumkin. Buning uchun probirkaga 10-15 gr havoda quritilgan va yaxshilab maydalangan tuproq yoki kvartslı qum (chaqmoqtosh) solinib 1,5-2 soat davomida avtoklavda 1,5-2 bosimda sterillanadi. Yuqori bosimda uzoq muddat sterilizatsiya qilish tuproq bilan ishlashda muhim hisoblanadi, chunki uning tarkibida yuqori haroratga chidamli bo'lgan bakteriyalar sporalari bo'ladi.

Sterillash vaqtida tuproqda bakteriyalar kulturasiga salbiy ta'sir ko'rsatuvchi zaharli moddalar hosil bo'lmasligiga e'tibor berish zarur.

Ekish uchun mo'ljallangan mikroorganizm hujayrasi yoki sporasi ilmoq yordamida sterillangan va quritilgan tuproq yoki qumga o'tqaziladi. Probirka sovuq va quruq joyda saqlanadi. Kulturani qayta olish uchun probirkadagi material ozuqa muhit qatlamiga yoki tuprog'i (qumi) bilan qiyshiq agarga ekiladi.

### **5.3. Liofilizatsiya**

Mikroorganizmlarni saqlashning eng qulay usullaridan biri bu – liofilizatsiya (muzlatgan holda quritish) hisoblanadi. Bu yo'nalishda o'tkazilgan tadqiqotlar shuni ko'rsatadiki, saqlangan ko'pgina mikroorganizmlar muzlatilgan va quritilgan holatda hech qanday o'zgarishsiz saqlanganligi ma'lum bo'ldi. Mikroorganizmlarni liofilizatsiya usulida saqlashning quyidagi qulayliklarini sanab o'tish mumkin:

- tez-tez amalga oshiriladigan ekish vaqtida kulturaning ifloslanishi va nobud bo'lishidan ozod bo'ladi;

- liofillangan ekma o'zining morfologiyasi, biokimyosi, serologik va immunologik xususiyatlarini saqlab qoladi;
- liofil quritilgan kulturalar uchun ko'p joy talab etilmaydi.

Liofilizatsiya qilish uchun 24 soat davomida o'sgan mikroorganizmlar kulturasi zarur bo'ladi. Sekin o'suvchi mikroorganizmlarning (xususan aktinomitsetlar) 5-10 kunli eng to'liq shakllangan kulturasi zarur bo'ladi. Kulturani ampulaga yoki probirkaga (yuvib) solish uchun kolloid himoya eritmadan foydalaniladi. Bu eritmani muzlatish va quritish vaqtida kulturani yo'qolishidan saqlaydi. Kultura uchun himoya kolloid eritmasi sifatida sterillangan sutni (yog'i olingan) ishlatish yaxshi samara beradi yoki bakterial filtrdan o'tkazilgan va inaktivatsiya qilingan qon zardobidan foydalanish mumkin. Har ikkalasini qo'llash bir xil samara beradi. Har bir probirkaga 1 ml himoya kolloid eritmasi solinadi va bakteriya hujayrasi agar yuzasidan yuvib olinadi. Olingan quyuq emulsiyadan 0,1 – 0,2 ml pipetka yordamida sterillangan ampulaga solinadi va probka bilan yopiladi.

Liofil quritish uchun turli konsentratsiyali ekmalari qo'llaniladi, ammo uning ta'sir mexanizmi o'zgarishsiz qoladi. Liofillangan bakteriyalar sentrifugalash jarayonida muzlatiladi, bunday holatda ular ampula devori bo'ylab tarqaladi va soviydi. Kuchli vakuum holatida muz erimasdan parlanadi. Preparatni kuzatish darajasi quritish vaqti va vakuum kuchiga proporsional bo'ladi.

Undan so'ng, vakuum sharoitida ampulalar yopiladi, germetikligi tekshiriladi va 5°C da saqlanadi. Preparat sifati mahkamlangan vakuum kuchi bilan belgilanadi.

#### **5.4. Zamburug'larni suyuq azotda saqlash**

Zamburug' kulturasi sterillangan 10% li glitsin eritmasida eritiladi va 0,5 ml dan suspenziya olinib ampulaga solinadi hamda og'zi eritilib yopiladi. Sifatini tekshirish uchun 30 daqiqa davomida ampula bo'yoq eritmasiga solib qo'yiladi, tekshiriladi va ularning ichiga bo'yoq kirgani yaroqsiz sifatida yo'qotiladi. Yaxshi kavsharlangan ampulalar quritiladi, metal shtativga joylashtiriladi va bir soat davomida suyuq azot solingan idishning (harorat 35°C bo'lgan) ochiq joyda ushlab turiladi. Dastlabki muzlatishdan so'ng, ampulalar vertikal joylashtirilgan ampula suyuq azotga botiriladi (-196°C)

Zarur hollarda ampulalar suyuq azotdan olinib darhol 30°C haroratda bo'lgan suv hammomiga o'tkaziladi.

Suyuq azot solingan idish ichki qavatli devori mavjud bo'lgan temir idish bo'ladi. Teploizolyatsiya qilish uchun ular orasidagi havo so'rib olinib, vakuum hosil qilingan, yuqori tomondan idish juda qalin va sintetik materialdan yasalgan qopqoq bilan yopilgan bo'ladi. Bunday muzlatgichlarda haftasiga bir marotaba suyuq azot solinadi va solingan azot bilan ushlaganda xavfsizlik qoidalariga qat'iy rioya etish talab etiladi. Azbest qo'lgapsiz va ampulani ochishda yuzga himoyasiz ishlash taqiqlanadi.

Bu usul zamburug'lar va aktinomitsetlar ekmasini saqlash imkonini beradi. Uning afzalligi shundaki, u zamburug' kulturasi morfologik o'zgarishsiz

saqlaydi. Ekish uchun mo'ljallangan mikroorganizm hujayrasi yoki sporasi ilmoq yordamida sterillangan va quritilgan tuproq yoki qumga o'tkaziladi. Probirka sovuq va quruq joyda saqlanadi. Ekmani qayta olish uchun probirkadagi material ozuqa muhit qatlamiga yoki tuprog'i (qumi) bilan qiyshiq agarga ekiladi.

### 5.5. **Zamburug' kulturasi selikagelda saqlash**

Yog'sizlantirilgan sut poroshogi (50 gr) 1000 ml distillangan suvga eritiladi va 2 ml dan probirkalarga solinadi. Ularni paxta tiqin yordamida yopilgandan so'ng, 1 atm. da 10 daqiqa davomida sterillanadi va ishlatilguncha muzlatgichda saqlanadi.

Ekmalari uchun mo'ljallangan, qopqoq yordamida germetik yopiladigan idishning  $\frac{1}{4}$  qismigacha indikatorsiz selikagel (6-22 mesh, "Xopkins va Uilyams" katalogi bo'yicha №7553 tartib raqamli) bilan to'latiladi. Bir yarim soat davomida selikagel 180°C da quruq issiq yordamida sterillanadi, undan so'ng, idish 37°C da quruq joyda saqlanadi.

Agarda saqlanish vaqtida gel suv bilan namlansa, uni yana qayta quritiladi. Sterillangan gel solingan idish taglikka (patnisga) qo'yiladi va qopqog'iga yetmagan joyigacha suvga botiriladi. So'ngra tagliklar muzlatgich xonaga o'tkaziladi va natijada suv muzlaydi.

Zamburug'lar va aktinomitsetlarning kulturalari shu bilan bir qatorda sterillangan sut solingan probirkalar bir kechaga termostatga, 4°C ga qo'yiladi. Bunday taxminiy sovitishning zarurligi, gelning namlanish jarayonida sezilarli darajadagi haroratning ajralishiga olib keladi, bu mikroorganizmlar hayoti uchun juda xavfli hisoblanadi.

Sutda tayyorlangan zamburug' suspenziyasi steril holatda gelga o'tkaziladi bunda to'lib to'kilib ketmasligiga e'tibor berish zarur.

Idishlar 20 daqiqa davomida muz hammomida ushlab turiladi, so'ngra ochib xona haroratida kristallarni silkitib aralashtirish mumkin bo'lgan darajagacha quritiladi.

Undan so'ng, qopqoqlari yaxshilab yopiladi va idishlar saqlashi uchun sovutgichga (4°Cga) joylashtiriladi. Kulturani selikagelda uzoq muddat saqlash mumkin. Uni qayta ekish uchun esa idishdan 1-2 ta kristall olinadi, xolos.

### **O'z-o'zini nazorat qilish uchun savollar:**

1. Mikroorganizmlar kulturalarini qanday sharoitlarda saqlash mumkin?
2. Zamburug' kulturasi selikagelda saqlash usulini izohlab bering?
3. Suyuq azot yordamida qanday mikroorganizmlarni saqlash mumkin?
4. Liofill quritish yordamida mikroorganizm kulturasi saqlashning afzalligi nimada?
5. Mikroorganizmlarni tuproqda saqlash metodini izohlab bering.

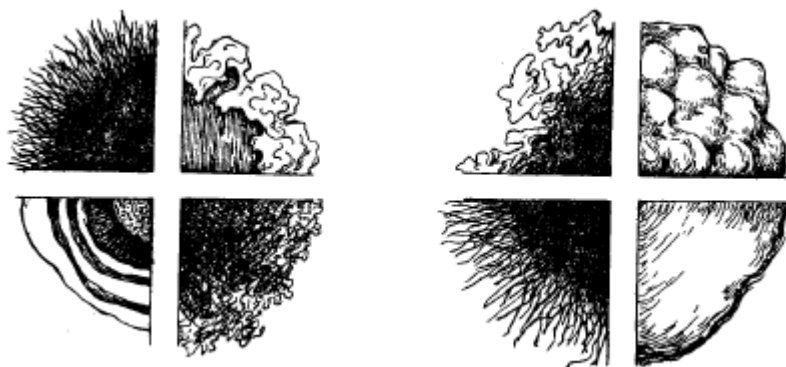
## 6-bo'lim. Tuproq mikroorganizmlarining xususiyatlarini o'rganish

### 6.1. Tuproq mikroorganizmlarning morfo-kultural xususiyatlarini o'rganish

Mikroorganizmlarning kultural xususiyatlari odatda qattiq ozuqa muhitida (masalan, GPA, kartoshka bo'lagi, sabzi) va suyuq ozuqa muhitlarda (masalan, GPB) o'rganiladi.

Mikroorganizmlar kulturalarini qattiq ozuqa muhitida o'rganishda quyidagilarga ahamiyat beriladi (7-rasm): kultura o'lchami (yirik ekma, o'lchami - > 10 mm va undan yirik; o'rtacha — 1—10 mm; kichik, nuqtali — 1 mm); kolonial profili (koloniyalar o'yiqlik, konus shaklida, tekis, krater shaklida); kultura cheti (tekkis, to'liqinsimon, tishsimon, baxmalsimon); kultura yuzasi (silliq, yumshoq, burmalangan, burishgan, konsentratsiyali doirali, radial nurlar bilan ajratilgan); kultura rangi (yorqinlik va shaffoflik); konsistentsiyasi (pastki, qalin, ingichka, yopishqoq, suyuq), mikroskop ostida koloniyaning ko'rinishi (donsimon, bir xil, shtrixsimon). Mikroorganizm kulturasi mikroskopning eng kichik obyektivida (x8) kuzatiladi.

Tirik bakteriya hujayrasining morfologiyasi “ezilgan tomchi” preparati yordamida mikroskopning yirik immersion obyektivida (x90) o'rganiladi. Hujayraning o'lchami mikrometr-okulyar yordamida harakatchanligini o'rganishda esa 12-24 soatlik mikroorganizm kulturasi orqali aniqlanadi.



7-rasm. Mikroorganizm kulturasi tiplari

Mikroorganizmlar hujayrasi va uning organiodlari, spora, xivchin, turli kiritmalarini o'rganish uchun esa fiksirlangan-bo'yalgan preparatda o'rganiladi.

Mikroorganizmlar qattiq ozuqa muhitiga ekilganda ozuqa muhiti yuzasida turli rangdagi, shakldagi kultura hosil qiliadi. Bu kulturaning shakli, rangi, ozuqa muhitida o'sishi kabilarni o'rganish mikroorganizmlarni identifikatsiya qilishda muhim hisoblanadi.

Preparat suyuq yoki agarli ozuqa muhitida o'stirilgan ma'lum yoshdagi bakteriya ekmasidan tayyorlanadi. Ozuqa muhitlari tayyorlashning ko'pdan ko'p retseptlari ishlab chiqilgan bo'lib, ulardan ishlashga eng qulay va tayyorlash uchun osoni “pepton ozuqa muhiti” deb shartli nomlangan ozuqa muhitidir. Qizdirib

eritilgan holda bu ozuqa probirkalarga quyiladi va sterillanadi, qiyshaytiriladi va natijada "qiyshiq agar" hosil bo'ladi. Qiyshiq agar yuzasiga bakteriya kulturasi ekiladi va u o'ziga xos sharoitda o'stiriladi va ko'zga ko'rinib o'sgan bakteriyadan preparat tayyorlashda ishlatiladi.

Mikroorganizmlar bilan ishlaganda ish joyi toza, begona narsalardan xoli, har bir talabning doimiy ish joyi bo'lishi lozim. Har bir talaba dars boshlanishidan ilgari ish joyida quyidagilarni tayyorlashi kerak: mikroskop, spirtovka, narvoncha bilan vannacha, buyum va qoplog'ich oynalar, bakterial ilmoq, probirkalar uchun mo'ljallangan shtativ, bo'yoqlar, imersion moy va mikroskop ostida ko'rishda ishlatiladigan reaktivlar hamda suv solingan kolba.

**Surtma (mazok) tayyorlash.** Buyum oynasiga tomizilgan tomchi suvga o'rganilayotgan ekmaning biomassasidan ozgina solinadi va bakterial ilmoq bilan aralashtiriladi. Biomassaning ortiqcha qismi kuydirib tashlanadi. Hosil bo'lgan kuchsiz loyqa buyum oynasi ustiga diametri 2 sm doira shaklida tarqatiladi, havoda quritiladi va surtma tayyorlanadi. To'g'ri tayyorlangan surtmada bakteriyalar ayrim-ayrim bo'lib, yupqa qatlam hosil qiladilar.

**Fiksatsiya.** Ushbu jarayon issiq yordamida (flambirlash) yoki kimyoviy usulda olib boriladi. Birinchi usulda preparat surtmasini uch marta alangaga qaratgan holda gorelka alangasidan o'tkaziladi. Fiksatsiya qilinganda hujayralar o'ladi va oynaga yaxshi yopishadi, tirik hujayraga qaraganda bo'yalishi yengillashadi.

Preparat **nordon** yoki **ishqoriy anilin** bo'yoqlari bilan bo'yaladi. Nordon bo'yoqlarda xromofor (rang beruvchi ion) - anion, ishqoriylarda esa kation bo'ladi. Ishqoriy bo'yoqlarga quyidagilar kiradi: **moviy rang metilen, ishqoriy fuksin, siyoh rang gentsian** va boshqalar. Agar bo'yoq filtr qog'ozga avvaldan shimdirilgan va quritilgan bo'lsa bo'yash osonlashadi. Bir ikki minut davomida bo'yalgandan so'ng, bo'yoq vodoprod suvi bilan yuviladi, filtr qog'ozi bilan qoldiq suvlar shimdiriladi so'ng mikroskopda ko'riladi.

**Preparatni mikroskopda ko'rish.** Mikroskopni talaba o'ziga nisbatan perpendikular holda qo'yadi. Ko'zgudan (yassi tomoni) va kondensorning iris diafragmasidan foydalanib, kunduzgi yorug'likda yoki maxsus yoritgichlar, masalan, OI-19 dan foydalanib yorug'lik topiladi. Preparatga bir tomchi immersiya moyi tomiziladi va mikroskopning buyum stolchasiga joylashtiriladi. Mikroskop revolveridagi **90x obyektiv** (immersiya obyektiv) yordamida preparatni ko'rishga moslanadi, yon tomondan kuzatilgan holda obyektiv linzasi moyga botiriladi. Okulyarga qaragan holda makrovint yordamida obekt topiladi. Aniq ko'rinishga erishish uchun mikrovidndan foydalaniladi. Mikrovidndan juda ehtiyotlik bilan foydalanish kerak - soat mili yo'nalishida yoki aksincha, faqat 1-2,5 aylanishdan ortiq buralmaydi. Preparatni yoritilishini kondensorni vertikal yo'nalishda harakatga keltirib, kamaytiriladi yoki ko'paytiriladi. Bo'yalgan preparatlarni kuzatganda kondensor taqalguncha tepaga ko'tariladi.

Mikrobiologiyadan amaliy mashg'ulotlar uchun tutilgan maxsus **albomga** ko'rish maydoniga o'xshash, 3-4 sm lik doira chiziladi. Unga o'rganilayotgan



hujayralarning rasmi chiziladi, o'ldamlari va shakllariga alohida ahamiyat berilib, kerakli yozuvlar yoziladi.

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

## 6.2. Mikroorganizmlarning kiritmalarini o'rganish

### 6.2.1. Uglevodli granularlar

Moy kislotali bakteriyalarning o'ziga xos xususiyatlaridan biri ularning hujayrasida kraxmalsimon modda - **granulozaning** zahira oziqa moddasi sifatida to'planishidir. Moy kislotali bakteriyalar tuproqda keng tarqalgan. Ularning boyitilgan ekmalarini **Rushman** ozuqa muhitiga tuproq ekib olish mumkin. Ozuqa muhiti maydalab tozalangan kartoshkadan tayyorlanadi. Kartoshka solingan probirkalar tagiga ozgina bo'r solinadi, so'ngra suv qo'shib sterilizatsiya qilinadi. Tuproq ekilgan ozuqa muhiti 5 - 7 kun 26-28°C da termostatda inkubatsiya qilinadi.

**Granulozani** korish uchun buyum oynasiga bir tomchi Lyugol reaktividan tomiziladi va uning ustiga Rushman ozuqa muhiti suyuqligidan kichik kartoshka bo'lakchasi bilan solinadi va ohista aralashtiriladi. Preparat qoplag'ich oyna bilan yopiladi, immersion moy tomizilib, mikroskopda ko'riladi. Preparatda **qizil-binafsha** rangga bo'yalgan va hujayraning ko'p qismini egallagan **granulyoza** ko'rinadi.

### 6.2.2. Lipidli granularlar

**Poli-oksibutirat** donachalarini lipofil bo'yoqlar - **sudan III yoki qora sudan** bilan bo'yab ko'rish mumkin. Buning uchun **achitqilar** hujayrasidan yupqa surtma tayyorlanib, havoda quritiladi va alangada fiksirlanadi. 5 - 15 minut davomida surtma qora sudan bilan bo'yaladi. Vaqt tugagach preparat filtr qog'oz bilan quritilib, 1 minutgacha bo'lgan vaqt davomida **ksilolga** bir necha marta botiriladi. So'ngra hujayralar 10 sekund davomida 0,1% li **safranin** eritmasi bilan bo'yaladi. **Poli-oksibutirat** donachalari **to'q rangda**, hujayraning qolgan qismi **pushti rangda** bo'ladi.

### 6.2.3. Polifosfatlar

**Polifosfatlar Volutin - Omelanskiy** usulida bo'yalganda oson namoyon bo'ladi. Usul **volyutinni** kislotalar eritmasida yaxshi erimasligiga asoslangan. Bunda alangada fiksirlangan surtma yuzasiga **silning karbolli fuksini** qo'yiladi. Hujayralar 0,5 - 1 sekund davomida 1% li **sulfat kislota** bilan rangsizlantiriladi. So'ng kislota to'kilib, preparat suv bilan yuviladi va 20 - 30 sekund davomida **moviy metilen** bilan (1:40) qo'shimcha bo'yaladi. Yuqib quritilgan preparat immersiya bilan mikroskopda ko'riladi. To'g'ri bo'yalgan volutin donachalari **qizil, sitoplazma ko'k rangda** ko'rinadi.

Achitqilarda volyutinni ko‘rish uchun alangada fiksirlangan surtma 3 minut davomida **Lofflarning** moviy metileni bilan bo‘yaladi. Bo‘yoq to‘kilgach, preparat suv bilan yuviladi va quritilmagan holda surtma yuzasiga 1 tomchi 1% li **sulfat kislota** tomiziladi. Uning ustiga qoplovchi oyna yopilib mikroskopda ko‘riladi. Volutin donalari **ko‘k-siyoh rangda** bo‘lib, och havorang sitoplazmada ko‘rinadi.

#### 6.2.4. Parasporal tanachalar

Spora hosil qilgan **Bacillus thuringiensis** hujayralari sporaga yopishgan to‘g‘ri **bipiramidal oqsil kristallini** hosil qiladi. Bu kristall ona hujayra avtolizida spora bilan muhitga ajraladi. Parasporal tanachalarni ko‘rish uchun ular maxsus bo‘yaladi. Yupqa surtma tayyorlanib, havoda quritiladi. Alangada fiksirlanadi va 2 minut davomida **qora anilin** bilan bo‘yaladi. So‘ngra bo‘yoq suv bilan yuviladi va surtma 15 sekund davomida **Silning fuksini** bilan bo‘yaladi. Preparat suv bilan yuvilgach, quritiladi va immersion tizim bilan mikroskopda ko‘riladi. To‘g‘ri bo‘yalgan **oqsil kristallari qora rangda**, qolgan qismi pushti rangda bo‘ladi.

#### O‘z-o‘zini nazorat qilish uchun savollar:

1. Mikroorganizmlarning morfo-kutural xususiyatlari qanday usullar yordamida o‘rganiladi?
2. Mikroorganizm kulturasining qanday xususiyatlariga ahamiyat beriladi?
3. Mikroorganizm morfologik xususiyatlarini o‘rganishda qanday usullardan foydalaniladi?
4. Fiksirlangan bo‘yalgan preparat tayyorlash bosqichlarini aytib bering.
5. Mikroorganizmlar hujayralarida qanday kiritmalar bo‘ladi va ularni o‘rganish usullarini tavsiflab bering?

## **7-bo'lim. Tuproqdan mikroorganizmlarning toza kulturasini ajratish**

### **7.1. Mikroorganizm toza kulturasini va uning ahamiyati**

Bir turdagi mikroorganizm hujayralaridan tashkil topgan ekma *toza kultura* deyiladi. Undan farqli ravishda ikki yoki undan ortiq mikroorganizm hujayralaridan tashkil topgan ekma *aralash* yoki *notoza kultura* deyiladi.

Mikroorganizmlarni ularning tabiiy yashash muhitidan ajratib olish tuproq mikroorganizmlarini o'rganishning muhim mikrobiologik uslublaridan biri hisoblanadi.

Mikroorganizmlarni toza holda ajratish ularni morfologiyasi va rivojlanish siklini, fiziologik va biokimyoviy jarayonlarini o'rganishni osonlashtiradi. Bunday o'rganish oxir oqibatda mikroorganizmlarni turini aniqlash imkonini beradi.

Shubhasiz toza kultura mikroorganizm bitta hujayrasining avlodi hisoblanadi, shuning uchun toza kultura olish usullarining barchasi mikrob aralashmasidan alohida hujayraga ajratishga qaratilgan.

Mikrobiologik tadqiqotlarga ilk bor L. Paster tomonidan kiritilgan toza kultura olish suyuq ozuqa muhitni qo'llashga asoslangan. Birgina bu usul toza kulturani bir turdagi mikroorganizmdan tashkil topgan materialdan ajratishni ta'minlagan, xolos.

R. Kox mikroorganizmlarni ajratishda qattiq ozuqa muhitni kiritdi va unda mikroorganizmlar alohida koloniyalar hosil qilib o'sishini hamda ko'z bilan ko'rinadigan koloniyalar hosil qilishini kuzatgan. Agar shunday koloniya bir turdagi mikroorganizmlarning o'sishidan hosil bo'lgan bo'lsa, bunday kultura toza kultura deyiladi.

Tuproqdan mikroorganizmlarning toza kulturasini olish usullarini shartli ravishda uch guruhga ajratish mumkin: 1) ozuqa muhit yordamida mikroorganizm alohida hujayralarni ajratishga qaratilgan usullar; 2) oddiy ko'z yordamida mikroorganizm hujayralarini ajratishga asoslangan usullar; 3) mikroorganizmlarning biologik xususiyatlari, jumladan harakati, haroratga, kislorodga munosabati, kislotaga, antibiotiklarga chidamliligi kabilarga asoslangan usullar.

Birinchi guruhga: suyultirish usuli, ozuqa muhit qatlamiga yoki yuzasiga ekish usullari kiradi. Bu usullar odatda tuproqdan mikroorganizmlarni dastlabki ajratishda qo'llaniladi. Tuproqdan mikroorganizmlarning toza kulturasini olish quyidagi bosqichlarni o'z ichiga oladi. Ular dastlab namuna olish, boyitilgan kultura olish va toza kultura olish bosqichlaridan iborat.

### **7.2. Namuna olish**

Agar tuproq namunasi shu hudud bakterial florasining to'g'ri tavsifini namoyon qilsa, bunday holatda tuproqdagi mikrobiologik jarayonlarni to'g'ri baholash imkonini beradi. Bunday namunani olish juda qiyin chunki, kichik maydonda ham mikroorganizmlarning soni va turlari bir xil tarqalmagan.

Adabiyotlarda namuna olishda uchraydigan qator xatoliklar haqida ma'lumotlar berilgan. Alohida olingan namunalardan hosil bo'lgan natijalarni ko'p hollarda umumlashtirishga to'g'ri keladi. Agar kimyoviy va fizikaviy tadqiqotlarda sezilarli farq paydo bo'ladigan bo'lsa, mikrobiologik tahlilda dispers xatoliklar yanada oshadi, chunki tuproqning gramm soni va tarkibi jihatdan abiotik omillardan farq qiluvchi, tashqi muhit omillariga bog'liq bo'lgan million balki milliard mikroorganizm hujayrasini o'z ichiga oladi.

Mikrobiologik tadqiqotlar uchun tuproq namunasini olish bugungi kungacha takomillashmagan. Statistik tahlillar shuni ko'rsatadiki, belgilangan maydonni mikrobiologik xarakteristikasi haqidagi aniq ma'lumotlarni olish uchun bir nechta namunani tahlil qilish zarur. Amaliyotda olinadigan namunalar soni laboratoriya imkoniyatiga ham bog'liq bo'ladi. Shuning uchun mikroorganizmlar sonini aniqlashda bir nechta olingan namunalarining aralashtirilishidan hosil bo'lgan o'rtacha namuna tahlil qilinadi. Tuproq namunasi olinadigan nuqtalar soni o'rganiladigan maydon o'lchami va bir xilligiga bog'liq. Namuna olinadigan nuqtalar soni qancha ko'p bo'lsa, o'rtacha namuna maydonning aniq xususiyatlarini namoyon qiladi. O'rganilayotgan maydon 100 m<sup>2</sup> bo'lsa, uning 6-8 nuqtasidan, undan katta maydonning 15-20 nuqtasidan namuna olinadi. Olingan namunalar steril holatda aralashtiriladi.

Yuqorida ko'rsatilgan kategoriyaga to'g'ri kelmaydigan maydonlardan alohida namunalar olinadi va alohida tahlil qilinadi. Bundan tashqari, tadqiqot maqsadiga bog'liq holda, masalan, tuproqni o'rganish uchun emas balki, tuproqning bakterial populyatsiyasini o'rganish, yoki ildiz atrofidagi mikroorganizmlarni o'rganishda ham alohida namunalar olib o'rganiladi.

Namuna olishda 170°C da quruq issiq yordamida sterillangan va yaxshi yopiladigan alyumin karobkalar samarali hisoblanadi. Xuddi shu usulda pichoqlar, belkurak, pintsetlar sterillanadi, ularni namuna olish oldidan spirt bilan yondirib sterillash ham mumkin. Tadqiqot maqsadiga bog'liq holda namunalarni 20-25 sm yoki undan chuqur tuproq qatlamidan olish mumkin. Birinchi holatda steril pichoq yoki belkurak yordamida tuproqning bir necha santimetrlik qatlami olib tashlanadi va undan so'ng, boshqa belkurak yordamida namuna olinib steril idishga solinadi. Biologik tadqiqotlar uchun Myuller namunalarni maxsus parma yordamida 1 sm<sup>3</sup> tuproq olishni tavsiya qiladi, parma spirt yordamida yondirib sterillanadi.

Agar turli tuproq qatlamidagi tuproq mikroorganizmlarini va unga bog'liq bo'lgan mikrobiologik jarayonlarni o'rganishga qaratilgan bo'lsa, namunalar tuproq qatlamida hosil qilingan maxsus chuqurchalar (tokchalar) dan olinadi. Chuqur devori spirt yordamida yondirib sterillangan belkurak yordamida dastlab tozalanadi. So'ngra steril pichoq yordamida chuqurning 1-2 sm devori olib tashlanadi hamda steril belkurak yordamida namuna idishga olinadi. Shunga o'xshash tadqiqotlar uchun zarur namunalar rang jihatdan bir-biridan farqlanuvchi barcha qatlamlardan olinadi.

Agar tadqiqot maqsadi ildiz atrofida hayot kechiruvchi mikroorganizmlarni o'rganishga qaratilgan bo'lsa, o'simlik uning ildiz atrofidagi tuproq bilan ildiz sistemasiga zarar keltirmagan holda qazib olinadi. So'ngra, silkitish va pintset

yordamida tuproqning yirik bo‘lakchalarini olib tashlanadi, ildiz yuzasiga yopishib turgan tuproq bo‘lakchalarini pintset yordamida namuna uchun steril kolbaga solinadi. Agar tuproq namlangan bo‘lsa, bu jarayonni amalga oshirish juda qiyin, shuning uchun juda kuchli namlangan tuproqlardan namuna olish tavsiya etilmaydi.

O‘simlikning ildiz sistemasi ham, tuproq namunasi singari steril qog‘oz qopchaga solib laboratoriyada 5°C da muzlatgichda saqlab 1-2 kun davomida o‘rganish mumkin.

### **7.3. Boyitilgan kultura olish**

Tuproq mikroorganizmlarini ko‘paytirish odatda uzoq davom etadigan va qiyin jarayonlardan biri bo‘lib, ularning oraliq bosqichlaridan biri, bu boyitilgan ekma olish hisoblanadi. Boyitilgan ekma bu – alohida tur yoki guruh mikroorganizmlar mavjud bo‘lgan kultura hisoblanadi, unda juda kam miqdorda bo‘lsa ham boshqa turdagi mikroorganizmlar uchraydi.

Boyitilgan kultura olish zarurati tuproqda ajratilayotgan mikroorganizm miqdori kam bo‘lsa, boyitish jarayonida uning soni oshadi. Boyitilgan kultura o‘rganilayotgan mikroorganizm uchun qulay hisoblangan elektiv ozuqa muhit yordamida olinadi. Elektiv ozuqa muhitning qo‘llanilishiga sabab, turli mikroorganizmlar rivojlanishi uchun bir xil bo‘lmagan sharoit zarurligidir. Mos elektiv ozuqa muhit unga ayrim holatda maxsus uglerod (tsellyuloza, lignin, parafin va boshqa) manbalarini boshqa holatlarda maxsus azot manbalarini (molekulyar azot, karbamid) kabilarni solish bilan tayyorlanadi. Boshqa holatlarda, masalan, azotsiz ozuqa muhitda esa atmosfera azotini o‘zlashtira oladigan mikroorganizmlar ko‘paya oladi. Ozuqa muhit tanlayotganda birgina uning kimyoviy tarkibiga e‘tibor berilmasdan, balki ko‘paytirish sharoitiga (harorat, aeratsiya, yoritilish, antibiotiklarning mavjudligi va boshqa kimyoviy moddalar) ham mos kelishi kerak.

### **7.4. Toza ekma olish**

#### **7.4.1. Ozuqa qatlamiga ekish usulida aerob mikroorganizmlarning toza ekmasini olish**

Mikrobiologiya amaliyotida boyitilgan va toza kultura olishda ozuqa muhit qatlamiga ekish keng miqyosda qo‘llaniladi. Bu usulning ishlab chiqilishi Kox nomi bilan bog‘liq, u birinchi bo‘lib qattiq ozuqa muhitni ishlab chiqqan va mikrobiologiya amaliyotiga qo‘llagan. Uning yuzasida bir-biridan izolyatsiyalangan mikroorganizmlar koloniyasi rivojlanadi va bu usulning qulayligi tufayli toza ekmani oson ajratish mumkin.

Usulning mohiyati shundan iboratki, unda mikroorganizm ajratish mo‘ljallangan boyitilgan ekma yoki substratni ( tuproq, go‘ng va boshqalarni) davomli suyultirish bilan yakunlanadi. O‘lchangan (10 gr) tuproq yoki gomogenizatsiya qilingan go‘ng 90 ml distillangan suvga solinadi va 30 daqiqa davomida chaynatiladi. Undan so‘ng, 1 ml suspensiya sterillangan pipetka

yordamida olinib 9 ml sterillangan suv solingan probirkaga solininadi va yaxshilab chayqatiladi. Xuddi shunday holatda keyingi probirkalarda ham suyultirish amalga oshiriladi, suyultirish soni suspenziyaning zichligiga bog'liq bo'ladi. Undan so'ng, har bir suyultirishdan 1 ml dan suspenziya steril sharoitda olinib Petri likopchasiga o'tkaziladi. Uning ustiga eritilib 50°C gacha sovutilgan agarli ozuqa muhiti (15-20 ml) solinadi va yaxshilab aylantirilib suspenziya bilan aralastiriladi. Agarli ozuqa muhit qotiganidan so'ng Petri likopchasi termostatga joylashtiriladi va 2-10 kun davomida inkubatsiya qilinadi. Mikroorganizm turiga bog'liq ravishda inkubatsiya muddati farqlanadi, bakteriyalarning to'liq rivojlanish uchun 2-3 sutka, zamburug'lar sekin o'sganligi sababli uzoqroq muddat, aktinomitsetlar esa ulardan ham sekin o'sganligi sababli zamburug'lardan ko'proq inkubatsiya talab etadi.

Inkubatsiya muddati tugagandan so'ng, alohida mikroorganizmlar ekmasi o'sgan likopchalardan, toza kultura olishda foydalaniladi.

Odatda alohida mikroorganizmlar kultura agar plastinkasiga bitta bakteriya hujayrasining bo'linib ko'payishidan hosil bo'ladi, shuning uchun ko'p hollarda birinchi ekishning o'zidayoq toza ekma olinadi. Agarda birinchi ekishdan so'ng ham ekma begona mikroorganizm hujayrasi bilan aralash bo'lsa, yana qayta suyultirilib agar plastinkasiga ekiladi. Shilliq kapsulaga ega bo'lgan mikroorganizmlarning (*Azotobacter*) toza ekmasini olish juda qiyin, chunki ularga nisbatan mayda, birga yuradigan bakteriyalar yopishib oladi. Bunday holatda ulardan ajratish uchun suspenziya kvarts qum bilan eziladi yoki boshqa usullardan foydalaniladi.

#### **7.4.2. Ilmoq yordamida ekish**

Ilmoq yordamida ko'z bilan ko'rinadigan alohida koloniyalar hosil qiladigan mikroorganizmlarni ekishda foydalaniladi. Bu usul po'panakli zamburug' va aktinomitsetlarni ular bilan birga yuruvchi bakteriyalardan ajratish va toza kultura olishda yaxshi samara beradi. Ilmoq yordamida boyutilgan ekmadan ekish uchun materialdan oz miqdorda olinadi va Petri likopchasining og'zi ochilib agar plastinkasi yuzasiga zig-zag (to'liqinsimon) shaklda ekiladi. Ekish materialda ajratiladigan mikroorganizmlarning qaysi biri ustunlik qilsa, u albatta, ozuqa muhitida ekish amalga oshirilganda ilmoqda ko'p miqdorda aynan ushbu bakteriya hujayrasi qoladi. Uzunasiga chizilgan liniyaning oxirida yoppasiga o'sish kuzatilmasdan balki alohida izolyatsiyalangan mikroorganizmlar ekmasining o'sishi kuzatiladi (8-rasm). Undan so'ng, alohida koloniyalardan qiyshiq agarda yoki agar plastinkasiga (tekshirish uchun) ikkinchi marta ekiladi. Yoki Petri likopchasiga quyilgan plastinkasi yuzasiga 0,1 ml mikroorganizm suspenziyasi tomiziladi va steril shpatel yordamida muhit yuzasiga teng miqdorda yoyib chiqiladi va inkubatsiyadan so'ng alohida koloniyalardan ekish amalga oshiriladi. Nam plastinka yuzasida mikroorganizmlar koloniyalari bir-biriga qo'shib o'sishi mumkin. Shuning uchun ular termostatga joylashtiriladi va namligi parlanib qopqog'iga tushguncha ushlab turiladi.



8-rasm. Shtrix usulida ekish yo‘li bilan bakteriya kulturasini tozalash

#### 7.4.3. Uorkopning tuproq plastinkasi usuli

Zamburug‘larni ajratish usuli. Sterillangan Petri likopchasiga 0,005 – 0,015 g maydalangan tuproq solinadi. Solinadigan tuproqning optimal o‘lchami koloniyaning ozuqa muhitda o‘shish intensivligiga bog‘liq ravishda aniqlanadi. Tuproq namunasiga 0,5% achitqi ekstrakti solingan 10 ml 45°C gacha qizdirilgan Chapek-Doks (70) muhiti solinadi; ozuqaning muhiti (pH) 4 ga to‘g‘rilanadi. Aylantirish orqali tuproqning ichiga teng taqsimlanadi. Maydalangan tuproqni agar solishdan avval 1-2 tomchi steril suv tomizish orqali namlanadi. Ozuqa muhit qotgandan so‘ng, osti bilan to‘nkarib bir necha sutka davomida inkubatsiya qilinadi va ulardan o‘shib chiqqan koloniyalar boshqa ozuqa muhitga ekiladi.

Uorkop usulining qator suyultirishga asoslangan boshqa usullar bilan solishtirgandagi afzalligi shundaki, bunda tadqiqotchi mikroorganizmlarning tabiiy sporasi bilan ish olib boradi va bu unga mikroorganizmlarning xilma-xil turlarini aniqlash imkonini beradi.

Novogradskiyning maydalangan tuproqni ozuqa muhit yuzasiga sepish orqali mikroorganizmlarni ko‘paytirish usulining prinsipi bir xil.

#### 7.4.4. Nam kamera yordamida monokultura olish usuli

Nam kamera nomini olgan Gansen tomonidan ishlab chiqilgan yirik hujayrali (achitqi zamburug‘lari) mikroorganizmlar va mikroskopik zamburug‘larning konidiylaridan toza kultura olish imkonini beradi.

Gansen metodining prinsipi shundan iborat: sterillangan buyum oynasining markaziga 15 mm diametrli qalinligi 1 mm keladigan yuqori va pastki tomoni vazelin bilan moylangan halqa joylashtiriladi. Halqa markaziga 1 tomchi steril suv tomiziladi va qoplagich oyna bilan yopiladi. Qoplagich oynaning quyi yuzasiga ajratiladigan mikroorganizm hujayrasidan iborat bo‘lgan yupqa agarli ozuqa muhit solingan bo‘ladi. Tayyorlangan nam kamera mikroskop ostiga joylashtirilib, faqat

zarur mikroorganizm hujayrasi ko‘rinadigan uchastka qidiriladi, kvadrat chizilgan qoplag‘ich oynadan foydalanish juda qulay hisoblanadi. Tanlangan mos keladigan kvadrat belgilanadi va nam kamera steril Petri likopchasiga joylashtiriladi hamda termostatda inkubatsiya qilinadi. Inkubatsiyadan so‘ng, mikroskop ostida mikroorganizmlarning o‘sinh nuqtasi aniqlanadi va steril igna yordamida mikrokoloniyadan ekish amalga oshiriladi.

#### **7.4.5. Mikromanipulyator yordamida monokultura olish**

Mikromanipulyatsion usulning mikrobiologiya amaliyotiga qo‘llanilishi juda nozik, olingan monokultura bilan bog‘liq bo‘lgan tajribalarni ham o‘tkazish imkonini beradi. Mikromanipulyatorlar ikki turga bo‘linadi. Agar alohida holatlarda barcha manipulyatsiya mikroigna, mikropipetka, mikrotom kabilar mikrometrik sistemadagi richagni ifodalasa, bu fransuz biologi Fonbryun tomonidan ishlab chiqilgan sistemada ushbu instrumentlarning pnevmatik uzatmasi qo‘llanilgan. Mikromanipulyatorning pnevmatik uzatmali turi mexanik turiga nisbatan bir necha barobar sezgir hisoblanadi.

Mikromanipulyatorning ishchi jihozlari mikroskopning ko‘rish maydonida ko‘rinib turadi va tajriba o‘tkazayotgan kishi uni richaglar yordamida boshqarib, alohida bakteriya hujayrasini nam kamera osilgan tomchidan ko‘paytirish uchun mos keladigan ozuqa muhitidan kesib oladi. Mikromanipulyator yordamida olingan kultura juda toza bo‘lib, odatda uni bir yoki ikkita hujayradan o‘stiriladi, shu bilan birga ajratish jarayonini mikroskop yordamida kuzatib turish mumkin.

Mikromanipulyatorni toza kultura olishning barcha holatlarida ham qo‘llab bo‘lmaydi. Ayrim hollarda ajratilgan, izolyatsiyalangan mikroorganizmlar hujayrasi o‘smaydi yoki bu jarayon juda sekin ketadi. O‘sinh tezligi ozuqa muhitda shu bakteriyalarning soni ko‘p bo‘lgan hollarda jadallashadi. Boshqa holatlarda boshqa mikroorganizmlarning mavjudligi tufayli monokultura olish juda qiyin bo‘lib, shilliq kapsulali bakteriyalarning kapsulasiga birikkan mikroorganizmlar bunga xalaqit beradi.

#### **7.5. Anaerob mikroorganizmlarni ko‘paytirish usullari**

Ko‘pchilik bakteriyalar obligat anaeroblar – substratda oksidlanish-qaytarilish potentsiali  $-0,33$  volt bo‘lganda rivojlanadi. Solishtirish uchun aytish mumkinki, suvning pH normal atmosfera bosimida  $+0,80$  voltni tashkil etadi. Anaerob sharoitda ko‘paytirishning natijadorligi substratning oksidlanish-qaytarilish potentsialini belgilangan darajaga pasaytirishga bog‘liq. Buni molekulyar kislorodni yo‘qotish bilan amalga oshiriladi. Anaerob o‘stirishda kislorodni yo‘qotish uchun mexanik va kimyoviy vositalardan foydalaniladi. Anaerob sharoitda o‘stirish uchun ozuqa muhitga o‘stirilayotgan mikroorganizmga toksik ta’sirga ega bo‘lmagan qaytaruvchi solinadi.

**Kavsharlangan trubada o‘stirish.** Bu usul suyuq ozuqa muhitda anaerob mikroorganizmlarni o‘stirish uchun juda yaxshi samara beradi. Buning uchun maxsus o‘rtasi toraygan probirkalardan foydalaniladi. Ekish materiali ozuqa



bulyoniga solingandan so'ng, probirka paxta tiqin bilan yopiladi va uni toraygan joyiga suriladi. Undan so'ng, probirkadan havo so'rib olinadi hamda maxsus gaz gorelkasi yordamida probirkaning toraygan qismi qizdirilib kavsharlanadi.

Kavsharlangan trubkalar termostatda inkubatsiya qilinadi. Anaerob mikroorganizmlarning o'sishi ozuqa muhitining loyqalanishi bilan namoyon bo'ladi.

Veyon trubkasida o'stirish. Anaerob bakteriyalarni qattiq ozuqa muhitda o'stirish uchun maxsus shisha trubkalar, ingichka va uzun, odatdagi probirkadan farqlanuvchi (10x200 mm) trubkalardan foydalaniladi. Bunday trubkalar agar bilan 2/3 qismi to'ldiriladi, sterillashdan avval, paxta tiqinning namlanmasligiga e'tibor berish kerak. Ozuqa muhit qotmasdan avval (45°C) ekish materiali Paster pipetkasi yordamida trubkaning tubiga solinadi. Natijada ekma yuqorisida 100 mm li agar qatlami joylashadi.

**Yopiq idishlarda o'stirish.** Ko'pgina anaerob mikroorganizmlar havosi so'rib olingan idishlarda o'stiriladi. Buning uchun maxsus anaerostatlar yaratilgan, ammo uning o'rniga laboratoriya vakuum eksikatoridan foydalanish ham mumkin. Ekma anaerostatda joylashtirilgandan so'ng, undan havo so'rib olinadi, uning bosimi 15-20 mm simob ustuniga to'g'rilanadi. Uzoq inkubatsiya davrida vakuumni ushlab qiyin, so'rib olingan gaz o'rniga odatda qaysidir inert gaz (azot, vodorod va bosh.) bilan almashtiriladi. Dastlab idishni kiritiladigan gaz bilan chayiladi va undan so'ng u bilan birga qolgan gaz so'rib olinadi.

Qolgan kislorodni idishdan yo'qotish uchun idishga oz miqdorda palladiy donachalari solinadi, undan so'ng havo so'rib olinib, o'rniga vodorod solinadi. Palladiy kislorod va vodorod o'rtasidagi reaksiyani katalizlaydi.

Kislorodsiz atmosferada tutib turish uchun nazorat sifatida kislorod indikatorlar – lokus agarli anaerob indikator (sotuvda mavjud bo'lgan) va Filds-Makintosh indikatoridan foydalaniladi. Indikator ochiq ampulada anaerostatning yon tomonidagi shisha trubkaga o'rnatiladi yoki vakuum eksikatorga o'rnatiladi va rangning o'zgarishiga qarab kislorodning bor-yo'qligi aniqlanadi.

**Pirogalolli usul.** Mikrobiologiya amaliyotida anaerob mikroorganizmlarni o'stirishda pirogalolning ishqoriy eritmasining molekulyar kislorod bilan intensiv shimish xususiyatidan (pirogalolning 1 g ishqoriy eritmasi 260 ml O<sub>2</sub> bilan bog'lanadi) keng foydalaniladi. Burri taklif qilgan o'stirish usulida, anaerob bakteriyalar aerob mikroorganizmlar ekmasini o'stirish singari probirkalardagi qotirilgan agarga ekiladi. So'ngra probirkani yopuvchi qog'oz yoki paxta tiqinning yuqori qismini lezviya yordamida kesib tashlanadi va qolgan qismini pintset yordamida agarning yuqori qismigacha tiqiladi. Tiqinning ustiga 1-2 dona natriy yoki kaliy gidroksid donachalari tashlanadi, uning yuqori qismiga kontsentrlangan pirogalol (2-4 ml) shimdirilgan paxta tiqin tiqiladi va tezlik bilan rezina tiqin yordamida yopiladi.

Pirogalol shimdirilgan paxtani olib tashlash juda qiyin, shuning uchun probirkaning ostki qismi kesiladi va kesilgan joy rezina tiqin bilan yopiladi, ekish vaqtida esa bu tiqin olib turiladi.

Usulning kamchiligi shundaki, pirogalolning oksidlanishi natijasida ayrim mikroorganizmlarning o'sishini tezlashtiruvchi uglerod oksidining kam miqdorda hosil bo'lishidir. Shu bilan bir qatorda, mikroorganizmlarning ko'payishiga ta'sir etadigan havodagi ishqoriy kislorod ikki oksidi bilan bog'lanishi mumkin. CO<sub>2</sub> ning ma'lum miqdori anaerob mikroorganizmlar ekmasining o'sishi uchun qulay hisoblanadi.

Ko'pgina hollarda kislorodni yo'qotish uchun ozuqa muhit tarkibiga qaytaruvchilar (0,05 % sistein, 0,01-0,02 % li natriy uglikolyat va b.) solinadi.

**Anaerob mikroorganizmlarni Petri likopchasida o'stirish.** Bir qator tadqiqotchilar anaerob mikroorganizmlarni o'stirishda ham Petri likopchasidan foydalanishni taklif qilishadi. Buning uchun Bryuera qopqog'i bilan jihozlangan Petri likopchasidan foydalaniladi. Bunday qopqoq agar ozuqa muhiti atrofida jips yopishib turadi va qopqoq tagida tashqi muhitdan izolyatsiyalangan joy qoladi. Bunday Petri likopchasi mavjud bo'lmagan hollarda agar yuzasi 1 mm qalinlikdagi sterillangan parafin bilan qoplanadi. Parafin bilan likopcha singari anaerostad yoki vakuumli eksikatorida inkubatsiya qilinadi.

**Spora hosil qiluvchi mikroorganizmlar turlarini termik tozalash.** Obligat anaeroblar asosan spora hosil qiluvchilar bo'lib, ularning ko'pchiligi termostabil hisoblanadi. Shuning uchun ularni tozalashda ma'lum muddat suv hammomida ushlab turish yaxshi samara beradi. Bunday holatda ushbu mikroorganizmlarning vegetativ hujayralari nobud bo'ladi va faqatgina sporalarigina saqlanib qoladi. To'g'ri keluvchi harorat tajriba yo'li bilan aniqlanadi. Zarur mikroorganizmlarni ajratishda elektiv ozuqa muhit usuli yaxshi samara beradi.

## 7.6. Suvo'tlarni ko'paytirish

Suvo'tlarning toza ekmasini olish birmuncha murakkab bo'lib, asosan shilliq hujayra qobig'iga ega bo'lgan suvo'tlarga turli tuproq bakteriyalari birikadi va ularni ajratish juda qiyin. Shuning uchun suvo'tlarining ekmasi "yarim toza" holatida o'stiriladi.

Suvo'tlarni ko'paytirish va saqlash usullari ko'pincha bakteriya va zamburug'lar uchun ishlab chiqilgan usullarga o'xshash bo'ladi, ammo, ba'zi farqlari mavjud, chunki suvo'tlar avtotrof fotosintezlovchi organizmlar bo'lib, o'sishi uchun yoritilishni talab qiladi. Suvo'tlarni o'stirish uchun tuproq namunasi asseptika qoidalariga amal qilingan holda olinadi va undan 20 g o'lchab olinib Petri likopchasiga joylashtiriladi. Bu namunalar ozuqa muhitlari yordamida 4-5 hafta davomida 24 ° C da inkubatsiya qilinadi, albatta bu davrda sun'iy yoki tabiiy usulda yoritib turiladi (bunda doimo parlangan namlik o'rni to'ldirib boriladi).

Belgilangan muddatda mikroskop yordamida tuproqda suvo'tlarning rivojlanishi tekshirib boriladi. Buning uchun bir bo'lak ko'proq miqdordagi tuproq olinib, 100 mlli kolbaga solinadi va uning ustiga 25 ml suvo'tlari uchun mo'ljallangan mineral moddalar qo'shilgan suyuq ozuqa muhit solinadi va xuddi shu sharoitda inkubatsiya qilinadi. Inkubatsiyadan 2-3 hafta o'tganidan so'ng, ozuqa muhitda suvo'tlarning yoppasiga rivojlanishi kuzatiladi. So'ngra, suvo'tlari

uchun mo'ljallangan, tarkibida 2%li agar bo'lgan mineral ozuqa muhit tayyorlanadi, natijada suvo'tlarining suyultirib boyitilgan ekmasining seriyal ekmasi jusaga keladi. Petri likopchasiga agar plastinkasi, turli konsentratsiyadagi suvo'tlar suspenziyasi qo'shib quyiladi. Inkubatsiyadan so'ng alohida koloniyadan iborat bo'lgan material olinib qiyshiq agarga o'tkaziladi. Seriyali suyultirilgan suspenziya tayyorlashdan avval uni kvarts qum bilan yopishgan bakteriyadan tozalash uchun yaxshilab ezish tavsiya etiladi.

**O'z-o'zini nazorat qilish uchun savollar:**

1. Toza ekma olish qanday bosqichlarni o'z ichiga oladi?
2. Boyitilgan ekma qanday ahamiyatga ega va qanday amalga oshiriladi?
3. Tuproq suvo'tlarini qanday usulda ajratib olinadi?
4. Anaerob mikroorganizmlar qanday usulda ajratib olinadi?
5. Mikromanipulyator yordamida monokultura olish qanday amalga oshiriladi?
6. Nam kamera yordamida monokultura olish usulini izohlab bering?
7. Uorkopning tuproq plastinkasi usuli.
8. Ilmoq yordamida ekish yordamida toza kultura olish qanday amalga oshiriladi?

## 8-bo'lim. Tuproqdagi mikroorganizmlarni miqdoriy aniqlash

### 8.1.Umumiy qoidalar

Laboratoriya amaliyotida tuproq mikroorganizmlarining sonini aniqlashda ikki xil bir-biridan prinsipial farqlanuvchi usullardan foydalaniladi: Ular:

a) ma'lum darajadagi suyultirilgan tuproq suspenziyasi ekilgan qattiq va suyuq muhit yordamida;

b) to'g'ridan to'g'ri mikroskopiya usuli yordamida aniqlash. Bu usullar mikroorganizmlarning tuproqdagi soni haqida turlicha ma'lumotlarni beradi.

Amaliyotda tuproq mikroorganizmlarining soni va turlarini aniqlashda ko'p hollarda, ozuqa muhitiga ekish usuli qo'llaniladi. Bu usullar turli-tuman bo'lib, ularga mos keladigan bir qancha ozuqa muhit turlari ishlab chiqilgan.

Tuproqdagi aniqlanadigan mikroorganizmlar soni ishlab chiqilgan qattiq ozuqa muhit yuzasiga ekish yoki suyuq muhitga ekish, agarli ozuqa muhit yuzasiga tuproq zarralarini sepish yoki bir necha marotaba suyultirilgan tuproq suspenziyasini ekishga bog'liq holda keskin farq qiladi.

Qattiq ozuqa muhiti yuzasiga ekish mikroorganizmlar toza kulturasini juda oson olish imkonini beradi va bu usulning qimmatli ahamiyatga ega ekanligini ko'rsatadi. Ajratilgan toz kulturalar keyingi o'rganishlar uchun foydalanilishi mumkin. Shu bilan bir qatorda ko'p hollarda ularning fiziologik faol moddalar sintezlashi o'rganiladi.

*Ekish uchun tuproq suspenziyasini tayyorlash.* Yaxshilab aralashtirilgan ho'l yoki quruq tuproqni mikrobiologik tahlil (analiz) qilish uchun sterillangan oyna (spirt bilan artilib, olovda sterillangan) ustiga to'kiladi. Tuproq shpatel yordamida yaxshilab aralashtiriladi va bir tekis yoyilib o'simlik ildizi, boshqa yirik aralashmalardan yaxshilab tozalanadi, hamda shpatel yordamida turli joyidan 10 gr tuproq o'lchab olinib, suvli kolbaga solinadi.

Bir vaqtning o'zida tuproq aralashmasidan (10-20 gr) uning namligini o'lchash uchun olinadi. Tuproq oldindan o'lchangan shisha yoki temir byuksga solinib, quritish shkafiga 105° da quritiladi. Dastlab tuproq 3 soat quritilib o'lchangandan so'ng, yana 2 soat davomida quritiladi. Quritish tuproq vaznini o'zgarmas holatiga kelguncha amalga oshiriladi. Bu holda absolyut quruq tuproqdagi mikroorganizmlarni o'rganish amalga oshirilgan bo'ladi va u quritish shkafida o'tkaziladi. Oddiy quruq tuproqdagi mikroorganizmlar sonini aniqlanganda esa, tuproq namligini aniqlash uchun olingan tuproq namunasi xona haroratida quritiladi.

Odatda mikrobiologik tahlil uchun olingan tuproq namunasini 100 ml steril vodoprovod suvi bo'lgan kolbaga solinib, u 10 daqiqa davomida qo'lda yoki chayqatgich (kachalka) yordamida, kolbaning paxta qopqog'iga suv tegishiga yo'l qo'yilmagan holda tebrantiriladi.

Bir qator tadqiqotchilarning ta'kidlashicha, quruq tuproqlarni yuqoridagidek ishlov berish yaxshi samara bermaydi, chunki bu tuproq agregatlari maydalanishi ulardan mikroorganizm hujayralarining desorbsiyalanishiga imkon bermaydi. Taxminan besh daqiqa davomida pastasimon holga kelguncha ishlov berilgan chimli-podzol tuproqdan go'shtli pepton agarida (GPA) bakteriyalar sonini

aniqlanganda 2 marta, Eshbida 5 marta, kraxmal-agarli muhitda 7 marta oshganligini ko'rsatadi. Qizil tuproqlarda 0,1% li natriy pirofosfat bilan 5 daqiqa davomida ishlov berish yaxshi samara berishi aniqlangan. Qora va to'q qo'ng'ir tuproqlarda suv bilan emas, balki 0,03-0,05% li sintetik spirtlarning alkilsulfat eritmasi yordamida ishlov yaxshi samara beradi. Shunday ekan, barcha tuproqlarda suyultirishdan avval unga ishlov berish tuproqdan ajratiladigan mikroorganizmlar sonining oshishiga olib keladi.

Tuproqni mikrobiologik tahlil uchun tayyorlash jarayoni quyidagicha amalga oshiriladi. Tuproq aralashmasidan 1g olinib, steril chinni hovonchaga solinadi va suv bilan namlanib (0,4-0,8 ml) 5 daqiqa davomida rezina kelidasta (stupka) yoki qo'lgop kiygizilgan barmoq yordamida pastasimon holatga kelgancha eziladi.

Ekishdan oldin har bir namuna uchun ikkitadan 250 ml-li steril kolbalar tayyorlab qo'yiladi. Ularning bittasida 100 ml stirillangan suv bo'ladi. Tuproqni ezishdan avval kolbadagi suv bilan namlanadi va tayyor bo'lgan eritmasini shu suv yordamida yuvib ikkinchi bo'sh kolbaga otkaziladi. Tuproq suspenziyasi solingan kolba 5 daqiqa davomida chayqatiladi va 30 sekund davomida turli yirik agregatlar cho'kishi uchun tindiriladi. Undan so'ng rasmda (6-rasm) keltirilgandek suyultirish amalga oshiriladi va ekish uchun tayyorlanadi. Suyultirishda har bir suyultirish uchun alohida pipetka ishlatish va aseptika qoidalariga qattiq amal qilgan holda amalga oshirish zarur.

*Tuproq namunasini ozuqa muhitiga ekish.* Tuproq suspenziyasidan qattiq ozuqa muhitiga ekish o'rganilayotgan mikroorganizmlar guruhi, tuproq tipi, tuproq namligiga bog'liq holda amalga oshiriladi. Likopchada 50-200 ta bakteriya va aktinomitsetlar koloniyasi, 30-50 ta zamburug' koloniyasi hosil bo'lganda hisoblash ishlari aniq chiqadi, undan zich holatda mikroorganizmlar koloniyalarining hosil bo'lishi hisob-kitob ishlarini qiyinlashtiradi yoki xatoliklar kelib chiqishiga olib keladi. Birinchi tekshirishning o'zida tuproqda qancha mikroorganizm borligi haqidagi ma'lumotni olish mushkul, shuning uchun bir vaqtning o'zida bir necha marta suyulish darajasidan ekish amalga oshirishi zarur. Zamburug'lar va achitqilarni hisoblash uchun bakteriya va aktinomitsetlarni aniqlashdagiga nisbatan 1-2 daraja kichik bo'lgan suyultirish darajasidan foydalaniladi. Tuproqni aniq tahlil qilish uchun 3-5 qayta namunalar va 3-5 qayta likopchalarga, turli ozuqa muhitlariga ekish zarur.

Bakteriyalarni ajratish va ekish uchun turli-tuman jumladan: go'shtli pepton agari, Chapek, Eshbi, tuproq aralashmasi va ekstrakti solingan ozuqa muhitlardan foydalaniladi. Bakteriyalarning spesifik guruhlarini o'rganishda tuproq elektiv muhitda ekiladi. Ko'p hollarda aktinomitsetlar kraxmal-ammiakli agarda yoki Chapek muhitida, zamburug'lar va achitqilar kislotali muhitlar: suslo-agari, modifikatsiyalangan Chapek yoki pepton-dekstrozli agar ozuqa muhitiga ekiladi va o'rganiladi.

Zamburug'lar va achitqilarni ajratishda yuqorida sanab o'tilgan ozuqa muhitlariga bakteriyalarning o'sishini ingibirlovchi qo'shimcha moddalar qo'shiladi. Bunday moddalar qatoriga konsentrlangan sut kislotasidan 4 ml/l, bor kislotasidan 3 gr/l qo'shilishi mumkin. Moddalarning bunday miqdorda qo'shilishi

ozuqa muhit pHni 4,0-4,5 olib boradi. Kislotalar ko'p hollarda ekish oldi, eritilgan muhitga solinadi. Konsentrlangan kislotalarni qo'shishda uni sterillash talab etilmaydi.

Har doim ham ozuqa muhit pH ni kislotaligini oshirish talab etilmaydi, chunki neytral va ishqoriy tuproqlarda o'suvchi zamburug'lar ham mavjud bo'lib, ular yuqori kislotali muhitda o'sishdan to'xtaydi.

## 8.2. Tuproqdagi bakteriyalar sonini aniqlash

Tuproq mikroorganizmlarini sonini oddiy sanash orqali ham aniqlash mumkin. Mikroorganizm hujayrasi ozuqa muhitga tushgandan so'ng, bo'linib ko'paya boshlaydi va ko'zga ko'rinadigan koloniya hosil qiladi. Sekin o'suvchi mikroorganizmlar soni 5 sutkada sanaladi.

1 g tuproqdagi mikroorganizmlar sonini aniqlash uchun, Petri likopchasi yuzasida hosil bo'lgan koloniyalar soni suyultirish darajasiga ko'paytiriladi. Ayrim hollarda koloniyalar soni shu qadar ko'p bo'ladiki, o'sgan koloniyalar bir-biriga qo'shib ketadi. Bu ko'proq 1:100 marta suyultirilgan namunadan ekilgan likopchada kuzatiladi. Hujayralar sonini to'g'ri aniqlash uchun 10 tadan ortiq, 250-300 dan ko'p o'smagan likopchalarni sanash maqsadga muvofiq hisoblanadi.

Koloniyalarni sanashda likopcha yorug'likka qaratilgan holatda, sanalgan koloniyalarni qayta sanamaslik uchun plamaster yordamida belgilangan holatda sanaladi. Kichik koloniyalarni o'tkazib yubormaslik maqsadida likopcha lupa yordamida yana bir bora ko'zdan kechirilishi zarur.

Ayrim hollarda oxirgi suyultirishdan ekilgan likopchada koloniyalar soni 300 dan ortiq bo'ladi, bunday holatda suyultirish darajasini oshirib, qayta ekish tavsiya etiladi. Ko'p miqdordagi (300 dan ortiq) koloniyalar soni Volfyugel kamerasi yordamida sanaladi. Buning uchun likopcha teskari holatda kameraning to'r (setka) chizilgan shisha plastinka yuzasiga qo'yiladi. Koloniyalar soni likopchanning turli qismlaridan (20-25 ta kvadrat) sanaladi va likopchanning umumiy yuzasiga ko'paytiriladi.

Turli tuproqlardagi bakteriyalar sonini solishtirish 1 g absolyut quruq tuproqdagi bakteriyalar sonini aniqlash bilan o'rganiladi. Buning uchun byuksga (5-10 g) tuproq namunasi olinib, 105°C da doimiy massagacha quritish orqali tuproq namligi aniqlanadi. 1 g absolyut quruq tuproqdagi mikroorganizmlar sonini quyidagi formula orqali aniqlanadi:

$$m = \frac{a \cdot \mu \cdot 100}{(100 - W)}, \text{ formuladagi:}$$

$a$  – bitta Petri likopchasida o'sib chiqqan o'rtacha koloniyalar sonini;

$\mu$  – suyultirish darajasini;  $W$  – tuproq namligini anglatadi.

Mikroorganizmlarni hisoblash muddati ozuqa muhiti tarkibi va o'rganilayotgan mikroorganizmlar guruhiga bog'liq bo'ladi. GPA odatda 2-3 sutkada spora hosil qiluvchi va sporasiz bakteriyalar soni aniqlanadi. Chapek

ozuqa muhitida esa 5 – 7 – sutkada aktinomitsetlar koloniyalari, suslo-agarda 5 – 7 – sutkada zamburug'lar koloniyalari hisoblanadi.

### **8.3. Tuproqdagi koloniya hosil qiluvchi mikroorganizmlarini hisoblash**

1 g tuproqdagi koloniya hosil qiluvchi (KOE) mikroorganizmlarni hisoblash, ozuqa muhit yuzasiga o'sib chiqqan koloniyalar soniga asoslaniladi. Ozuqa muhit yuzasida hosil bo'lgan har bir koloniya bu - bitta mikroorganizm hujayrasidan hosil bo'lgan deb qaraladi va shunga asoslangan holda biz 1 g tuproqdagi KOE ni hisoblashimiz mumkin. Koloniyalar sonini likopcha tagidan, pastki tomonidan yoritilgan holatda sanaladi. Sanash vaqtida adashmaslik uchun, sanalgan har bir koloniyaga plamaster yoki shishaga yozuvchi qalam yordamida belgi qo'yib boriladi. Yorug'likni yaxshi o'tkazmaydigan ozuqa muhitlarda esa ustki tomondan sanash amalga oshiriladi.

Paralel ekilgan likopchalardagi koloniyalar soni sanalgandan so'ng, ularning o'rtacha soni hisoblanadi va undan so'ng, 1g tuproqdagi mikroorganizmlar soni (KOE/g) quyidagi formula yordamida:

$A=B \times V \times C$  hisoblab topiladi.

Formuladagi: A – 1 g tuproqdagi mikroorganizmlar soni (KOE/g); B – likopchada o'sgan o'rtacha koloniyalar soni; V – tuproq suspenziyasining suyulish darajasi; C – ekish amalga oshirilgan tuproq suspenziyasidagi (0,05 ml yoki 0,1 ml) tomchilar sonini anglatadi.

1 ml o'rganilayotgan substratdagi hujayralar soni quyidagi formula yordamida hisoblab topiladi:

$$M = \frac{a \times 10^n}{V}$$

formuladagi: M – 1 ml dagi hujayralar soni; a - likopchada o'sgan o'rtacha koloniyalar soni;  $10^n$  – suyultirish koefitsenti; V – ekish uchun olingan suspenziya miqdori, ml.

Olingan natijalarning statistik tahlili o'rtacha arifmetik xatolik, o'rtacha kvadrat xatolik, variatsion qator koefitsentini (Dmitriev, 1995) yoki STATISTIKA compyuter programmasi yordamida hisoblab topiladi (Manucharov va bosh., 2001).

Tuproq haydalma qatlamidagi bakteriyalar sonini aniqlash uchun GPA, Chapek ozuqa muhitiga  $10^{-3}$  va  $10^{-4}$ ; suslo-agar, GPA + suslo-agar, Eshbi ozuqa muhitlariga esa  $10^{-2}$  va  $10^{-3}$  daraja suyuqlantirilgan tuproq namunalari ekiladi.

#### **O'z-o'zini tekshirish uchun savollar:**

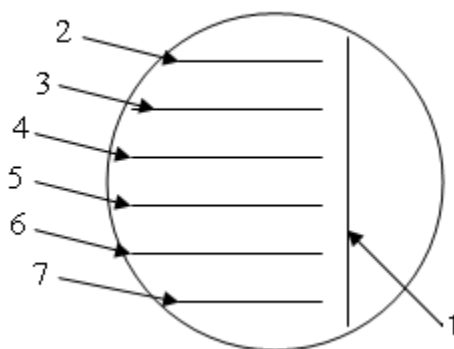
1. Tuproqdagi mikroorganizmlar soni qanday aniqlanadi?
2. 1 g absolyut quruq tuproqdagi mikroorganizmlar soni qanday hisoblanadi?
3. Tuproqdagi koloniya hosil qiluvchi mikroorganizmlar soni qanday usulda aniqlanadi?

## 9-bo'lim. Tuproq mikroorganizmlarining o'zaro va boshqa organizmlar bilan munosabatlarining tahlili

### 9.1. Tuproq mikroorganizmlarining antogonistik xususiyatini o'rganish

Mikroorganizmlarning antogonistik ta'siri bu – bir mikroorganizmning ikkinchi turning o'sishiga salbiy ta'sir ko'rsatishiga asoslangan bo'lib, bir qator usullar yordamida aniqlanadi. Quyida ushbu usullarga to'xtalib o'tamiz.

**Perpendikulyar shtrix usuli.** Bunda antogonistik xususiyat namoyon qiluvchi mikroorganizm Petri likopchasi yuzasiga ekiladi (9-pasm, 1). Bu organizm o'sib chiqqandan so'ng, antibiotikka chidamliligi o'rganilayotgan mikroorganizmlar esa unga perpendikulyar holatda ekib chiqiladi (9-pasm, 2-7).



**9-pasm. Mikroorganizmlarning antogonistik xususiyatini perpendikulyar shtrix usuli yordamida aniqlash:** 1-antogonistik xususiyat namoyon qiluvchi mikroorganizm turi; 2-7 – test, ya'ni antibiotikka chidamlilik darajasi o'rganilayotgan mikroorganizmlar.

Mikroorganizm ekilgan Petri likopchasi 20-24 soat davomida termostda saqlanadi. Agar o'rganilayotgan mikroorganizm antogonistik xususiyat namoyon qilsa, unga perpendikulyar holatda ekilgan mikroorganizmlar uning shtrixidan uzoqroq o'sadi. Bu antagonist moddaga chidamli mikrob turi esa unga yaqin holatda o'sadi.

**Agar bo'lakchalari (blochka) usuli.** Bu usulda antibiotik hosil qiluvchi va test-mikroorganizmlar alohida ozuqa muhitlarida o'stiriladi. Antibiotik hosil qiluvchi aktinomitset quyidagi tarkibga ega bo'lgan ozuqa muhitida o'stiriladi (g/l): glyukoza – 30,0;  $\text{KNO}_3$  – 5,5;  $\text{MgSO}_4$  – 0,5;  $\text{NaCl}$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,4;  $\text{ZnSO}_4$  – 0,002; agar – 25,0; distillangan suv; pH 7,1-7,2. Ozuqa muhiti 0,5 atm sterillanadi va Petri likopchasiga quyiladi.

Agar qotgandan so'ng antibiotik hosil qiluvchi mikroorganizm butun ozuqa muhit yuzasiga gazon qilib ekiladi. Buning uchun aktinomitset sporasi bakteriologik ilmoq yordamida agar yuzasiga o'tkaziladi va shpatel yordamida butun ozuqa muhiti yuzasiga yoyilib, 28-30°C da 8-10 kun davomida inkubatsiya qilinadi. Undan so'ng, sterillangan namuna oluvchi qurilma (6-8 mm) yordamida agar bo'lakchasi olinib, bir muddat oldin test-mikroorganizm ekilgan boshqa agarli ozuqa, masalan GPA, yuzasiga o'tkaziladi. Agar bo'lakchalari shablon asosida bir-biridan teng uzoqlikda 1,5-2,0 sm masofada, likopcha chetidan ichkariroqda, mitsileyi yuqoriga qaratilgan holda agar plastinkasi yuzasiga qattiq bosiladi. Antibiotikning yaxshi diffuziyalanishi uchun test-organizm ekilgan



ozuqa muhitiga o'yuvchi qurilma yordamida hosil qilingan lunkalarga joylashtirilsa ham bo'ladi. Bitta test-organizm ekilgan Petri likopchasi yuzasiga turli antogonistik xususiyatga ega bo'lgan produtsentlardan tashkil topgan 4-5 ta agar bo'lakchalarini joylashtirsa bo'ladi. Likopchalar antibiotiklarning ozuqaga yaxshi singishi uchun 1 soat xona sharoitida saqlanadi, undan so'ng test-organizm o'sishi va rivolanishi uchun qulay bo'lgan haroratga termostatga joylashtiriladi va uning o'sishiga bog'liq ravishda inkubatsiya qilinadi. Agar test-organizm antibiotikka sezgir bo'lsa, inkubatsiyadan so'ng agar bo'lakchalari atrofida uning o'sishini susaytiruvchi zona hosil bo'ladi. Agar test-organizm ekilgan produtsent hosil qilgan antibiotikka sezgir bo'lmasa, butun ozuqa muhit yuzasida va hatto agar bo'lakchalari atrofida ham o'sadi.

## **9.2. Rizosfera mikroorganizmlarini o'rganish uslublari**

*Rizosfera tuproqlaridan namuna olish.* Tuproqda ko'p miqdorda mikroorganizmlar o'simlik rizosferasida joylashgan bo'ladi. Rizosfera tuproqlari ko'p hollarda alohida tekshiruvlarni talab etadi. Rizosfera mikroflorasi turlari va soni jihatdan nazorat tuproqlaridan tubdan farqlanadi.

Rizosfera mikroflorasini o'rganish uchun tuproq pichoq yoki belkurak yordamida o'simlik ildizi qazib olinadi. Ildiz sistemasi unga mahkam yopishgan tuproq bilan boshqa tuproqlardan tozalanadi. Tuproq yopishgan ildiz steril qaychi bilan kesilib pergament paketga solinadi. Bitta paketga bir turga mansub bir nechta o'simlik ildizini kesib solish mumkin. Ildiz va unga yopishgan (5-10 gr) tuproq 100 ml steril suv solingan kolbaga solinib, 10 daqiqa davomida chayqatiladi va odatdagidek suyultirish amalga oshiriladi.

Ekishda shu narsaga katta e'tibor berish kerakki, rizosfera uning atrofidagi muhit tuproqlariga nisbatan o'n, yuz va ming marotaba ko'p miqdorda mikroorganizmlar hayot kechiradi, shuning uchun ularni ekish jarayonida kattaroq suyultirish darajalaridan foydalanish maqsadga muvofiq bo'ladi. Shuning uchun ulardagi mikrobiologik tahlil, odatda bir vaqtning o'zida nazorat (o'simliklardan xoli qatorlar orasidan olingan) va o'simlik ildizi ustidagi tuproqdan ajratilgan mikroorganizmlarni ekish bilan amalga oshiriladi.

Ekishdan so'ng, ildizlar kolbadan olinadi, tuproq qoldiqlaridan tozalanadi, yana bir bor suvda yuviladi, sekin filtr qog'oz orasiga qo'yilib quritiladi va o'lchanadi. Mikroorganizmlarning sonini hisoblash 1 gr tuproqqa nisbatan olib boriladi.

Tuproq namligini bilgan holda, 1 gr havoda qurigan yoki absolyut – quruq tuproqdagi mikroorganizmlar sonini hisoblash mumkin.

Aniqroq hisoblanishni ildiz yuvilgandan so'ng tuproq suspenziyasini 6-8 ayl./tez.da tsentrifuga qilinib olish mumkin. Hosil bo'lgan cho'kma quritiladi va o'lchanadi. Rizosferadan tuproq namunasini olishda tuproq namunasi olinayotgan o'simlik turi, tavsifi, o'simlikning o'sish fazasi va uning holati haqidagi ma'lumotlarni yozib borish zarur bo'ladi. Asosiy e'tiborni o'simlik turi va uning o'sish fazasiga qaratish lozim, chunki rizosfera mikroflorasi o'simlikning o'sish

fazasiga bog'liq holda juda tez o'zgarib turadi va o'simlik turining o'ziga xosligiga ko'p hollarda bog'liq bo'ladi.

Rizosfera mikroorganizmlarini o'rganish Tepperning ildizni yuvish usuli yordamida amalga oshiriladi. Buning uchun o'simlik o'sayotgan tuproq qatlamlaridan sterillangan pinset va pichiq yordamida 1g yosh ildizlar (taxminan bir xil diametrdagi) unga yopishgan tuproq zarralari bilan olinadi. Ildizlar 100 ml sterillangan vodoprovod suvi solingan kolbaga 2 daqiqa davomida chayqatiladi. Sterillangan pinset yoki ilmoq yordamida ildizlar olinib keyingi kolbaga solinib chayqatiladi va undan ham olinib xuddi yuqoridagidek uchunchi, to'rtinchi, beshinchi, oltinchi va yettinchi 100 ml sterillangan suv solingan kolbalarga solinib, 2 daqiqadan chayqatiladi. Har bir kolbadan sterillangan pepetka yordamida bir tomchidan tuproq suspenziyasi olinib, ozuqa muhiti solingan Petri likopchasiga tomiziladi va shpatel yordamida yoyiladi. Likopchalar 28-30°C termostatda inkubatsiya qilinadi. Ozuqa muhiti sifatida GPA, Eshbi, suslo-agari, karaxmal-ammiakli va boshqalardan foydalaniladi. Mikroorganizmlarni o'rganish 3-7 sutkalarda amalga oshiriladi.

Ildizni yuvish metodi mikroorganizmlarni nobud bo'lishi kuzatilmaydi, ko'p hollarda sonning oshishiga olib keladi. Shuning uchun birinchi ildiz yuvilgan kolbadan ekilgan likopchada yirik koloniyali, spora hosil qiluvchi mikroorganizmlarning o'sib chiqishi kuzatiladi. Yuvish davom ettirilganda batsilyar formadagi mikroorganizmlar soni kamayib kichik koloniyalar, ya'ni spora hosil qilmaydigan *Pseudomonas* va boshqa avlod hamda korinofom mikroorganizmlar soni orta boshlaydi. Tepper metodi yordamida rizosfera va rizoplndagi mikroorganizmlar sonini aniqlash uchun birinchi kolbadagi suspenziya yana qo'shimcha 5 daqiqa chayqatiladi va undan suyultirish amalga oshiriladi hamda ozuqa muhitiga ekiladi. Qolgan oltita kolbadagi suspenziya birga qo'shiladi va unda suyultirish amalga oshirilib, ozuqa muhitiga ekiladi. Ildiz bilan birinchi kolbaga tushgan tuproq miqdori har xil bo'ladi. Buning uchun oxirgi kolbadan ildizlar olinib, filtr qog'ozga qo'yiladi va quritilgandan so'ng o'lchanadi.

Rizoplan va rizosfera namunalarini quyidagicha o'rganish mumkin. O'simlik ildizi unga yopishgan tuproq zarrasi bilan 100 ml sterillangan vodoprovod suvda 3 daqiqa davomida kachalkada 180 ayl./tez.da chayqatiladi. Yuvilgan ildiz boshqa 100 ml suvli kolbaga o'tkaziladi va ultrotovush yordamida UZDN-1 qurilmasi (22 kGs, 0,44 A, 2 daq) yordamida ishlov beriladi. Suyultirilgan namunadan ekish qattiq ozuqa muhitiga amalga oshiriladi (Kojevin, 1989).

### **9.3. Tuganak bakteriyalarni ajratish, toza kulturasini olish va o'rganish**

Tuganak bakteriyalar dukkakli o'simliklar bilan simbioz holatda yashaydi. Bu bakteriyalarning shunday deb atalishiga sabab - ular o'simlik ildiziga o'tganda ildiz to'qimalari kattalashib, tuganaklar hosil bo'ladi.

Tuganak bakteriyalar *Rhizobium* avlodiga kiradi. Bakteriyalar asosan qaysi o'simliklarda tuganak hosil qilishiga qarab, shu o'simlik nomi bo'yicha tur nomi

beriladi. Masalan: *Rh. phaseoli* (loviya), *Rh. trifolii* (beda), *Rh. meliloti* (yo'ng'ichqa), *Rh. leguminosarum* (no'xat).

Tuganak bakteriyalar odatda, tuproqda uchraydi. Ular uzunasiga 3 mkm dan oshmaydigan mayda, harakatchan, grammanfiy tayoqchalar bo'lib, psevdomonadalarga juda o'xshab ketadi. O'simliklar urug'i o'sayotganda tuganak bakteriyalar ildiz tukchalari bilan to'qnashadi. O'simlik ildiz tizimining zararlanishi faqat yosh ildiz tukchalari orqali bo'ladi. Bakteriyalar tukchalarining eng uchidan kiradi va ip shaklida o'sadi, bu ip *infeksion ip* deb ataladi, so'ngra bunday ipchalar epidermis hujayralari devoridan ildiz po'stlog'iga o'tadi. Ular shoxlanadi va ildiz to'qimasining tetraploid hujayralari bo'ylab taqsimlanadi. Rhizobium ta'sirida va o'stiruvchi modda ishtirokida ildiz to'qimasi o'sib ketadi, natijada tuganaklar hosil bo'ladi. Tuganaklarda bakteriyalar tez ko'payadi, hajmi oshadi va shaklini o'zgartiradi: tayoqchalardan kolbasimon shishgan hujayralarga - *bakteroidlarga* aylanadi. Turli dukkakli o'simliklarning tuganaklarini shakli va o'lchamlari turlicha bo'ladi.

Simbiotik azotfiksirlovchi mikroorganizmlar bilan tanishish uchun mosh, no'xat, hashaki no'xat, soya, lupin kabi dukkakli o'simliklarning ildizini tuganaklari bilan umumiy ko'rinishi chizib olinadi.

1. Tuganak bakteriyalarning preparati *Rh. meliloti* ni 3-4 sutkali ekmasidan tayyorlanadi. Bular mayda, harakatchan 0,5-0,6 x 1,2 - 3 mkm li tayoqchalar spora hosil qilmaydi, grammanfiy bo'ladi.

2. Tuganaklarning *bakteroidli* to'qimasidan preparat tayyorlash.

Buyum oynachasiga tuganak qo'yiladi va uning ustidan boshqa buyum oyna bilan bosiladi. Ezilgan tuganakka bir tomchi suv qo'shib aralashtiriladi, qoplagich oyna bilan yopib mikroskopda ko'riladi. Preparatda *bakteroidlar* - harakatsiz, yo'g'onlashgan, rogakasimon hamda kolbasimon shishgan, noksimon yoki sferik hujayralar ko'rinishi kuzatiladi.

*Tuganak bakteriyasining toza kulturasini ajratish.* Bir yillik dukkakli o'simliklar tuganagidan bakteriyalarni ajratish ularning gullash fazasida, ko'p yillik o'simliklardan esa ikkinchi yilida ajratiladi. Buning uchun yaxshilab vodoprovod suvida yuvilgan o'simlik ildizidan pintset yoki lezviya yordamida qizil rangdagi yirik tuganagi olinib, tagi setkali, o'zidan o'lcham jihatdan yirikroq bo'lgan 96% li etil spirtli chinni Gucha hovonchasiga solinadi. Undan so'ng, chinni hovonchadagi tuganaklar sterillangan suv yordamida bir necha marta yuvib tashlanadi.

Sterillangan pintset yordamida tuganaklar sterillangan Petri likopchasiga o'tkaziladi va sterillangan pichoq yordamida qismlarga bo'linadi. Bakteriologik ilmoq yordamida maydalangan tuganak bo'laklaridan kichikroq bo'lagi olinib, Petri likopchachasidagi agarli ozuqa muhiti yuzasidagi bir tomchi sterillangan suvga solinib aralashtirilgandan so'ng, bo'lakcha olib tashlanadi va shpatel yordamida ozuqa muhiti yuzasiga ekiladi.

Xuddi shu shpatel yordamida yana ikki-uchta ozuqa muhitli likopchaga alohida koloniyalar olish uchun ekish amalga oshiriladi. Ekilgan likopchalarni termostatga 25-28°C da inkubatsiya qilinadi. Tez o'suvchi tuganak bakteriyalar

ikki-uch sutkada ekma hosil qilsa, sekin o'sadigan tuganak bakteriyalar esa yettinchi-to'qqizinchi sutkada ekma hosil qiladi.

Tuganak bakteriyalar uchun quyidagi tarkibdagi Freda ozuqa muhiti ishlatiladi: mannit (saxaroza yoki glyukoza) – 10,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5 g,  $\text{MgSO}_4$  – 0,2 g,  $\text{NaCl}$  – 0,1 g,  $\text{CaCO}_3$  – 3,0 g, achitqi suvi (pH – 6,8) – 100 ml, agar-agar -15 g, distillangan suv – 0,9 litr. Shuningdek, quyidagi Dukkakli agar muhitidan ham foydalanish mumkin: dukkak qaynatmasi (boboviy otvar) – 1000 ml, saxaroza – 2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0 g,  $\text{MgSO}_4$  – 0,3 g, agar-agar – 15,0 g, Qaynatmaga  $\text{NaHCO}_3$  pH 7,0 kelguncha solinadi va ozuqa muhiti  $120^\circ\text{C}$  da 30 daqiqa sterillanadi.

Bu ozuqa muhitida tuganak bakteriyalar rangsiz va oq-sarg'ish, kamdan kam holda shilimshiq koloniya, ayrim hollarda qizg'ish koloniyalar *Lotononis bainesii* tuganaklaridan olingan bakteriyalar hosil qiladi.

Tuganak bakteriyalarning tozaligini o'rganish uchun GPA yashash muhiqa ekish amalga oshiriladi. Bu ozuqa muhitida beda va qashqarbeda (*Melilotus officinalis*)ning tuganak bakteriyasidan tashqari birorta tuganak bakteriya o'smaydi.

#### **O'z-o'zini tekshirish uchun savollar:**

1. Mikroorganizmlarning o'zaro antogonistik xususiyatlari qanday usullar yordamida aniqlanadi?
2. Perpendikulyar shtrix usuli yordamida mikroorganizmlarning antogonistik ta'sirini o'rganishni izohlab bering.
3. Rizosfera mikroorganizmlarini ajratish usulini izohlab bering.
4. Tuganak bakteriyalarni qanday usulda ajratib olish mumkin?

### **Foydalanilgan adabiyotlar ro‘yxati:**

1. М.Иноғомова, А.Ҳ.Ваҳобов. Микробиология ва вирусология асослари. Т.:“Университет” нашриёти, 2010.
2. Vahobov A.X, T.X.Rasulova, Ya.F.Nizametdinova, M.I.Mansurova, I.A.Muzafarova. Mikrobiologiyadan amaliy va laboratoriya mashg‘ulotlari uchun o‘quv qo‘llanma (lotincha).Т.:”Universitet” nashriyoti, 2009.
3. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенов Г.М. Биология почв: Учебник. -3-е изд., испр. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 2005. – 445 с.
4. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология. М.:ДРОФА. 2006
5. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.:АСАДЕМА. 2008
6. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. М.:АСАДЕМА. 2007
7. Практикум по микробиологии. Под ред. А.И. Нетрусова. М.:АСАДЕМА. 2005
8. Громов Б. Строение бактерий. Учеб. Пособие. – Л.: Из-во универ, 1985. - 192 с.

### **Internet saytlari:**

<http://www.natlib.uz/uz/>

<http://ek.uzmu.uz/>

<http://www.lib.mn/>

<http://www.molbiol.ru>

<http://www.zyio.net>

[www.nature.uz](http://www.nature.uz)

[www.pedagog.uz](http://www.pedagog.uz)

[www.cholera.russian.ru](http://www.cholera.russian.ru)

## MUNDARIJA:

Kirish.....	3
1-bo‘lim. Tuproq mikrobiologiyasi tadqiqotlar uchun zarur bo‘lgan asbob-uskunalar va sterillash usullari bilan tanishish.....	4-11
1.1. Inkubation uskunalar.....	4-5
1.2. Shkaflar, laminar bokslar va ekishi kabinalari.....	5-7
1.3. Ozuqa muhitlari va idishlarni sterillash usullari bilan tanishish.....	8-11
2-bo‘lim. Tuproq mikroorganizmlarini o‘rganish uchun zarur bo‘lgan ozuqa muhitlari.....	12-19
2.1. Ozuqa muhit tayyorlashning umumiy prinsiplari.....	12-13
2.2. Ozuqa muhitlari va ularni tayyorlash.....	13-16
2.3. Ekish materiali va idishlarni mikrobiologik tahlil uchun tayyorlash.....	16-18
2.4. Tuproq bo‘lakchalari metodi.....	18-19
3-bo‘lim. Tuproq mikroorganizmlarining mikroskopik tahlili.....	20-23
3.1. To‘g‘ridan to‘g‘ri mikroskopiya usuli yordamida tuproq mikroorganizmlarini o‘rganish va hisoblash.....	20
3.2. Vinogradskiy usuli.....	20-22
3.3. Xolodniyning shisha yuzasida o‘stirish usuli.....	22-23
4-bo‘lim. Tuproqning mikrobiologik tahlili.....	24-26
4.1. Tuproq namunasini olish va mikrobiologik tadqiqotlar uchun tayyorlash hamda ozuqa muhitiga ekish texnikasi.....	24-25
4.2. Tuproq namunasini ozuqa muhitiga ekish texnikasi.....	26-27
5-bo‘lim. Mikroorganizm ekmasini saqlash.....	28-30
5.1. Umumiy qoidalar.....	28
5.2. Mikroorganizmlarni tuproqda saqlash.....	28
5.3. Liofilizatsiya.....	28
5.4. Zamburug‘larni suyuq azotda saqlash.....	29-30
6-bo‘lim. Tuproq mikroorganizmlarining xususiyatlarini o‘rganish.....	31-33
6.1. Tuproq mikroorganizmlarning morfo-kultural xususiyatlarini o‘rganish.....	31-33
6.2. Mikroorganizmlarning kiritmalarini o‘rganish.....	33
6.2.1. Uglevodli granularlar.....	33
6.2.2. Lipidli granularlar.....	33
6.2.3. Polifosfatlar.....	33
6.2.4. Parasporal tanachalar.....	34

7-bo'lim. Tuproqdan mikroorganizmlarning toza ekmasini ajratish.....	35-42
7.1. Mikroorganizm toza ekmasi va uning ahamiyati.....	35
7.2. Namuna olish.....	35-37
7.3. Boyitilgan ekma olish.....	37
7.4. Toza kultura olish.....	37
7.4.1. Ozuqa qatlamiga ekish usulida aerob mikroorganizmlarning toza kulturasini olish.....	37
7.4.2. Ilmoq yordamida ekish.....	38-39
7.4.3. Uorkopning tuproq plastinkasi usuli.....	39
7.4.4. Nam kamera yordamida monoekma olish usuli.....	39-40
7.4.5. Mikromanipulyator yordamida monokultura olish...	40
7.5. Anaerob mikroorganizmlarni ko'paytirish usullari.....	40-42
7.6. Suvo'tlarni ko'paytirish.....	42-43
8-bo'lim. Tuproqdagi mikroorganizmlarini miqdoriy aniqlash.....	44-47
8.1. Umumiy qoidalar.....	44-46
8.2. Tuproqdagi bakteriyalar sonini aniqlash.....	46-47
8.3. Tuproqdagi koloniya hosil qiluvchi mikroorganizmlarini hisoblash.....	47
9-bo'lim. Tuproq mikroorganizmlarining o'zaro va boshqa organizmlar bilan munosabatlarining tahlili.....	48-52
9.1. Tuproq mikroorganizmlarining antogonistik xususiyatini o'rganish.....	48-49
9.2. Rizosfera mikroorganizmlarini o'rganish metodi.....	49-50
9.3. Tuganak bakteriyalarni ajratish, toza kulturasini olish va o'rganish.....	50-52
Foydalanilgan adabiyotlar ro'yxati.....	53

**V.B.FAYZIYEV, B.J.AXMADALIYEV, U.M.JO‘RAYEVA,  
A.H.VAHOBV**

# **TUPROQ MIKROBIOLOGIYASI**

**FANIDAN  
AMALIY MASHG‘ULOTLAR UCHUN  
USLUBIY QO‘LLANMA**

Qog‘oz bichimi: 60×84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>.

Times New Roman garniturasida terildi.

Shartli bosma tabog‘i: 3,5.

Buyurtma № 18. Adadi: 100 nusxa.

«ZUXRA BARAKA BIZNES» MChJ bosmaxonasida chop etildi.

Toshkent shahri Bunyodkor shoh ko‘chasi 27 A–uy.