

AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI TƏHSİL NAZİRLİYİ  
SUMQAYIT DÖVLƏT UNİVERSİTETİ

M.R.ŞƏFİYEVA

**MİKROBİOLOJİ TƏCRÜBƏLƏRƏ  
aid  
TAPŞIRIQLAR**

Dərs vəsaiti

*Azərbaycan Respublikası Təhsil Nazirliyinin  
24.11.2010-cu il tarixli 1522 sayılı əmri ilə  
qıf verilmişdir*

SUMQAYIT  
DÖVLƏT UNİVERSİTETİ  
KITABXANA



**NURLAR**

BAKİ – 2010

30088

579(07)  
№42

## **TƏRTİB ETDİ:**

**dosent Məryəm Şəfiyeva**  
*biologiya üzrə fəlsəfə doktoru,*

## **ELMİ REDAKTOR:**

**professor C.Nəcəfov**  
*biologiya elmləri doktoru, professor*

**M.R.Şəfiyeva. Mikrobioloji təcrübələrə aid tapşırıqlar. Dərs vəsaiti.**

Bakı, «NURLAR» Nəşriyyat-Poliqrafiya Mərkəzi, 2010, 72 səh.

Bu vəsaitdə "bakteriyaların artımı, inkişafı və fiziologiyası" üzrə təcrübə tapşırıqlar aşağıdakı bölmələr üzrə verilmişdir: mikroorqanizmlərin artımı və inkişaf prosesinə qidalı mühitin tərkib hissələrinin təsiri, mikroorqanizmlərin inkişafı üçün oksidləşmə reduksiya potensialı və hidrogen ionunun qatılığının əhəmiyyəti, mikroorqanizmlərin fizioloji fəaliyyətinin inkişaf mərhələlərindən asılılığı.

Mikroorqanizmlərin sayılmasının müxtəlif üsulları, bəzi biokimyəvi və fiziki-kimyəvi metodları, habelə alınan nəticələrin nisbətən sadə statistik təhlili qaydaları verilmişdir. Vəsait əsasən universitetlərin mikrobiologiya üzrə ixtisaslaşan biologiya fakültəsinin tələbələri üçün nəzərdə tutulmuşdur.

# MÜNDƏRİCAT

<b>ÖN SÖZ</b> .....	4
<b>GİRİŞ</b> .....	6
<b>I FƏSİL. BAKTERİYALARIN İNKİŞAFINA QİDALI MÜHİTLƏRİN TƏSİRİ</b> .....	10
§1. Bakteriyaların inkişafında azotlu qida mühitlərinin rolu .....	10
§2. Bakteriyaların inkişafına karbonlu maddələrin təsiri .....	14
§3. Bakteriyaların vitaminli qida mühitlərində çoxalması .....	21
<b>II FƏSİL. BAKTERİYALARIN İNKİŞAFINA FİZİKİ-KİMYƏVİ AMİLLƏRİN TƏSİRİ</b> .....	25
§1. Bakteriyaların çoxalması və inkişafına <i>pH</i> -in təsiri .....	28
§2. <i>pH</i> -in bakteriyaların “hərəkətsiz” hüceyrələrinə təsiri .....	31
§3. Bakteriyalarda oksidləşmə-reduksiya potensialının ( <i>ORP</i> ) inkişaf dinamikası .....	34
<b>III FƏSİL. BAKTERİYALARIN İNKİŞAF MƏRHƏLƏLƏRİNDƏN ASILI OLARAQ FİZİOLOJİ AKTİVLİYİ</b> .....	37
§1. Bakteriyaların fasiləsiz becərilməsi .....	39
§2. Bakteriyalarda oksigenin mənilsənilməsi .....	42
§3. Bakteriyaların hüceyrələrində sorbitin sorbozaya oksidləşməsi .....	45
<b>IV FƏSİL. MİKROQRANİZMLƏRİN SAYININ TƏYİN EDİLMƏSİ</b> .....	47
§1. Mikrorqanizmlərin ümumi sayının hesablanması .....	47
§2. Canlı hüceyrələrin sayının təyin edilməsi .....	59
§3. Biokütlənin quru çəkisinin təyin edilməsi .....	68
<b>Ədəbiyyat siyahısı</b> .....	71

## ÖN SÖZ

Mikroorqanizimlər aləminə bir-birindən ümumi bioloji xüsusiyyətləri ilə deyil, bəzi spesifik xüsusiyyətləri ilə fərqlənən, əsasən xırda, gözlə görünməyən, yalnız mikroskopla görünən, tam diferensiasiya etməmiş sadə quruluşlu oxşar orqanizmlər qrupu aiddir. Mikroskopik canlılar mikrobiologiya elminin əsas obyektidir və onların tədqiq edilməsi mühüm əhəmiyyət kəsb edir. Mikroorqanizimlərin bəzi fizioloji məsələləri və onların təhlilinə həsr olunmuş dərs vəsaiti ümumi mikrobiologiyanın nəzəri problemlərinə aid mövzuların yerinə yetirilməsində mühüm əhəmiyyətə malikdir. Vəsaitdə göstərilən təcrübələr, tapşırıqlar və s. bu kimi məsələlər mikrob hüceyrələrinin böyüməsinə, çoxalmasına, inkişafına və becərilməsinə həsr edilmiş və bu mövzular geniş işıqlandırılmışdır. Qidalı mühitlər və onların tərkiblərinin bakteriyalara təsiri xüsusi bölmələr üzrə göstərilmiş, kulturalarının qidalı mühitlərdə inkişaf xüsusiyyətləri və becərmə metodları haqqında geniş məlumat verilmişdir. Müvafiq mövzular üzrə hüceyrələrə mexaniki, fiziki, kimyəvi, fiziki-kimyəvi, kimyəvi-fiziki, bioloji və ekoloji amillərin təsirinə aid tapşırıqlar verilmişdir.

İnsan təbiətinin bir hissəsi olub çox saylı amillərlə şərtlənir, ətraf mühit və yaşayış məskəni onun cəmiyyətdə rifahını və inkişaf səviyyəsini müəyyən edir. İnsanın fəaliyyəti və onun canlı təbiətlə qarşılıqlı əlaqəsi onun həyat şəraitini dəyişir. Analitik informasiya məlumatlarına görə təbiətdə mövcud canlı aləm sistem şəkilində təzahür edir və müxtəlif bioekoloji qruplara (bitkilər, heyvanlar, mikroorqanizmlər və s.) bölünür. Bu qruplar arasında fasiləsiz qarşılıqlı əlaqə və zəncirvari kimyəvi reaksiyalar mövcuddur. Bu qarşılıqlı proseslər dinamik olaraq müvafiq təsir qüvvələrilə tənzimlənir. Bu qarşılıqlı münasibətlər canlı orqanizmlərdə biokimyəvi çevrilmələrlə müşahidə edilir, biosintetik proseslərlə nəticələnir, bioloji aktiv maddələr yaranır, biokütlə sintez olunur, məhsul əmələ gəlir və bioloji məhsuldarlıqla ifadə olunur.

Mikrobiologiya elminin tədqiqat obyektı olan canlılardan bir çox elm sahələri üzrə əsas istiqamətlərin tədqiqində bioloji model kimi istifadə olunur və bu elmi tədqiqatların əsas problemlərindən biridir. Vəsaitdə təhlil üçün nümunələrin hazırlanması, onların becərilməsi, çoxalması, inkişafı və s. haqqında mövzular ümumi mikrobiologiya kursunun tədris planına əsasən dərslər proqramına görə hazırlanmışdır. Laboratoriya məşğələlərinə dair məsələlər onlara aid tapşırıqlar verilmiş, üçün metodlar və digər qaydalar göstərilmişdir. Bu təcrübələrə dair laboratoriya tapşırıqlarının yerinə yetirilməsinə aid qaydalar təhlil edilmişdir. Qidalı mühitlər, onların hazırlanma üsulları göstərilmiş, sterilizasiyası və onun aparılması geniş şərh olunmuşdur. Bakteriyaların inkişafında qidalı mühitlər və onun tərkibi haqqında məlumatlar ətraflı işıqlandırılmışdır.

Qidalı mühitlərin fiziki-kimyəvi tərkibinə aid ( $pH$ ,  $eH$  və s. bu kimi amillər) müvafiq tapşırıqlar verilmişdir. Tapşırıqlar üzrə təcrübələrin gedişatı və onların təhlil üsulları göstərilmişdir. Təcrübənin məqsədinə uyğun olaraq tapşırıqların məzmunu izah edilmiş və müvafiq bölmələr üzrə tərtib edilmişdir. Alınan nəticələrin hesablanması, onlara aid qaydalar şərh olunmuş və təhlil edilmişdir.

Tərtib olunan vəsait mikrobiologiya dərslərində təcrübə məşğələlərə aid tapşırıqların yerinə yetirilməsi üçün nəzərdə tutulmuş mikrobioloji təcrübələrin gedişinə həsr edilmişdir. Vəsait biologiya, ekologiya, kənd təsərrüfatı və digər bu kimi elm sahələrində çalışan tədqiqatçılar, mütəxəssislər və tələbələr üçün nəzərdə tutulur.

## GİRİŞ

Bu dərs vəsaiti mikroorqanizmlərin əsas bioloji xüsusiyyətlərinə dair təcrübələrə aid tapşırıqların yerinə yetirilməsinə, ümumi mikrobiologiyanın nəzəri məsələlərin tədqiq olunmasına və tədqiqatların təhlil metodlarına həsr olunmuşdur.

Təcrübələrə aid tapşırıqların yerinə yetirilməsi üçün mikrobioloji laboratoriyaların iş prinsipinə ciddi əməl olunmalıdır. Mikroorqanizmlərin fiziki, kimyəvi, bioloji (morfologiya, biokimya, anatomiya, sistematika, genetika və s.) və digər xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi üçün təmiz kulturalardan istifadə edilir.

Təmiz kulturanın alınması üçün aşağıdakı işlərin yerinə yetirilməsi tələb olunur:

1. Təcrübə üçün sxemin tərtib edilməsi;
2. Təcrübənin qoyulması üçün hazırlıq işlərin görülməsi;
3. Laboratoriya qabların və reaktivlərin hazırlanması;
4. Qidalı mühitlərin hazırlanması və steril edilməsi;
5. Mikrobioloji nümunələrin seçilməsi və hazırlanması;
6. Təcrübənin qoyulması;
7. Təhlil üçün nümunələrin hazırlanması və becərilməsi;
8. Alınanların qeyd edilməsi, işlənməsi və müzakirə edilməsi.

Mikrobioloji tədqiqatın məqsədindən asılı olaraq təcrübələrin obyekt müxtəlif növ mikroorqanizmlər olub, onların bioloji xüsusiyyətləri nəzərə alınaraq müvafiq təhlil üsulları seçilir.

Mikroorqanizmlərin ən geniş yayılmış növləri bakteriyalardır və onların elmi-nəzəri əsaslarla tədqiq olunmasına böyük əhəmiyyət vardır.

Təbiətdə bakteriyalar geniş yayılmış və mikroorqanizmlər aləmində hüceyrə quruluşu, yayılması, təsnifatı, ekologiyası və əsas bioloji xüsusiyyətləri (morfologiyası, anatomiyası, fiziologiyası, biokimyası, sistematikası, irsiyyəti, dəyişkənlik və s.) ilə fərqlənən təkhüceyrəli canlı orqanizmlərdir. Bakteriya hüceyrələri də digər canlılardakı kimi eyni plan üzrə qurulmuş vahid struktura malikdir. Onlar qidalanırlar, tənəffüs edirlər, çoxalırlar, mad-

dələr sintez edir, bioloji proseslər və fizioloji funksiyalar yerinə yetirir. Mikrobioloji tədqiqatlarda “obyekt-model” olaraq bakteriyalardan geniş istifadə olunur.

Bakterioloji təhlil zamanı laboratoriya məşğələlərin iş prinsipinə ciddi əməl etmək və onlara yiyələnmək əsas şərtlərdən biridir. Bakteriyalar və onun kultural təhlili Berdc (Berqey, 2004) təyinedicisinə görə aparılır və identifikasiya olunur.

Mikrobioloji tədqiqatlarda obyekt model olaraq əsasən Acetobakter suboxydans bakteriya növündən geniş istifadə olunur. Bu bakteriya Berdc (Berqey, 2004) təyinedicisinə görə təyin olunmuşdur.

sinif – Shizomicetes-şizomisetlər (bu sinifə aid olan mikroorqanizmlər əsasən bakteriyalardan ibarətdir.)

sıra – Pseudomodales -psevdomonaleslər

ailə – Pseudomodaceae - psevdomonas kimilər

cins – Acetobakter-asotobakterlər

növ – Acetobakter suboxydans - Acetobakter suboksidans

Acetobakter suboxydans və onun ştamları çox kiçik (1,5-1,8, 0,5 mk) ölçülərə malik olub, mütləq aerob, \*Qram<sup>-</sup>, sporsuz, çöp şəkilli bakteriyadır. Bu bakteriyalar müxtəlif növ karbohidratları karbon turşularına, azotsuz birləşmələrə, bir və çoxatomlu spirlərə oksidləşdirmə qabiliyyətinə malikdir. Qlükozanı qlükon (qlükon turşusu nisbətən çox ayrılır) turşusuna mübadilə edir, 2-ketoqlükon, 2,5-diketoqlükon, 5-ketoqlükon, qliserini oksidləşdirib dihidrooksiaseton əmələ gəlir. Acetobakter suboxydans ketogen olub, sirkə turşusunu əmələ gətirir, etil spirtini isə zəif oksidləşdirir.

Acetobakter suboxydans muzey kulturaları da mövcuddur. Onlar müxtəlif tərkibə malik duru və bərk qidalı mühitlərdə saxlanılır.

1. 1 №-li qidalı mühit: – 0,5% -li çörək mayası məhlulu (q.ç.i.)<sup>\*\*</sup> + sorbit (C<sub>6</sub> H<sub>12</sub> O<sub>6</sub>)-50 q/l
2. 2 №-li (0,5% -li çörək mayası məhlulu q.ç.i.) + sorbit (C<sub>6</sub> H<sub>12</sub> O<sub>6</sub>) 50 q/l + aqar 15 q/l

---

\* Qram mənfı

\*\* Quru çəki ilə

### 3. 3 №-li + 2№-li qidalı mühitlər.

Bakteriyaların becərilməsi üçün istifadə olunan qidalı mühitlər əridilir, 5 ml götürülür, 10-12 mm diametrinə malik olan sınaq şüşələrinə daxil edilir. Sınaq şüşələri avtoklava yerləşdirilir və bir atmosfer təzyiqlə steril olunur. Sonra nümunələrdən bakterioloji həlqə ilə götürülür, 2-3 dəfə təkrar olaraq steril duru (1 №-li) və bərk (2№-li) qidalı mühitlərə əkilir.

Muzey kulturalarının saxlanması üçün xüsusi qaydalar mövcuddur. Bunun üçün koloniyalar vaxtaşırı olaraq (15-18 gün) təzə qidalı mühitlərə köçürülür. Bu zaman 2-3 dəfə təkrar olaraq 1№-li qidalı mühitdən 25 ml 250- yastıdib kolbalara daxil edilir və avtoklavda bir atmosfer təzyiqlə steril edilir. Sonra nümunə məhluldan 0,2 ml götürülür və kolbalara köçürülür, 29-30<sup>0</sup> hərərətdə termostata yerləşdirilir və 48 saat saxlanır.

Bir litr çörək mayası məhlulunun hazırlanması üçün 20 q. çörək mayasına 200-300 ml distillə edilmiş su əlavə edilir və qaynama anından sonra 10 dəqiqə qarışdırılaraq qaynadılır, sonra iki qat filtr kağızından süzülür. Alınmış filtrata distilə edilmiş su əlavə edilir, çörək mayasının (q.ç.i.) 0,5%-li məhlulu alınır. Bu məhlul bakteriyalar üçün qüvvəli qida maddəsi hesab olunur. Çörək mayasından alınan quru maddə qaynadılmış maya hüceyrələrindən əmələ gələn zülallar, karbohidrogenlər, estrogenlər, vitamin və vitaminabənzər maddələr ibarətdir.

Bütün canlı orqanizmlər kimi acetobakter suboxydans-ın həyat fəaliyyətində oksigen mühüm əhəmiyyət kəsb edir. Buna görə kolbalarda qida qatının oksigenlə tam təmin olunması üçün mühitin qalınlığı *lsm*-dən artıq olması məqsədəuyğundur.

Kolbalara hüceyrələrin kultural maye ilə köçürülməsi qəti qadağandır. Çünki kultural mayenin tərkibində maddələr mübadiləsinə məruz qalmamış qida elementləri və onların qarışıqları olur.

Kolbalar steril mühitdə sentrafuqa (mikrobioloji laboratoriyalarda ÜLR\*-1 tipli cihazdan geniş istifadə olunur) edilir və hüceyrələr kultural məhluldan ayrılır, sonra hüceyrə kütləsi 0,85%-li NaCl məhlulu (fizioloji məhlul) ilə yuyulur, yenidən

25 ml steril fizioloji məhlulə durulaşdırılır və nümunə məhlullardan hazırlanır. Bu qaydada hazırlanan nümunə məhlullardan mikroorqanizmlərin becərilməsi üçün əkin materialı kimi istifadə olunur.

Mikrobioloji tədqiqatlar üçün hüceyrələr mikroskoplanmalı, onların mikrobioloji təmizliyi və bioloji fəallığı mütləq yoxlanmalıdır.

Bakteriya kütləsini mühitdən ayırmaq üçün ÜLR-1 tipli cihazla (1/4000 dəq/dövr) qarışıq mühit 10 dəqiqə sentrafuqa edilir.

# I FƏSİL

## BAKTERİYALARIN İNKİŞAFINA QİDALI MÜHİTLƏRİN TƏSİRİ

Bakteriyaların becərilməsi üçün müxtəlif tərkibli qidalı mühitlərdən istifadə olunur. Bakteriyaların toplanması, ayrılması, becərilməsi, saxlanması və s. proseslərin gedişində qidalı mühitlər və onun tərkibi əhəmiyyət kəsb edir. Qidalı mühitlər hazırlanarkən bakteriyaların həyat fəaliyyəti üçün zəruri olan bütün amillər (qidalı mühitlərin növü, qidalılıq və onun keyfiyyəti, qida elementləri və miqdarı, mühitin osmotik təzyiqi və onun oksidləşmə-reduksiya potensialı (ORP), aerasiya, istilik, rütubət və s.) nəzərə alınmalıdır. Bakteriyalar müxtəlif tərkibli qida maddələrini mənimsəməklə, yanaşı azot tərkibli maddələri daha yaxşı mübadilə edir.

### §1. Bakteriyaların inkişafında azotlu qida mühitlərinin rolu

Azot tərkibli qidalı mühitlərin tərkibini əsasən azot və onun birləşmələri təşkil edir. Azotlu maddələr bakteriyanın növ tərkibinə müvafiq olaraq enerji və maddələr mübadiləsini tənzimləyir, amin turşuları və zülalları, karbohidratları, vitamin və vitaminəbənzər maddələrin və s. üzvi və qeyri-üzvi birləşmələrin sintezini təmin edir. Bir qrup bakteriyalar isə atmosferin sərbəst molekulyar azotunu mənimsəyir, digərləri sadə və mürəkkəb zülal molekullarından ibarət olan mühitlərdə yaxşı inkişaf edir.

Bakteriyaların azotlu maddələrin tərkibinə olan tələbatı müxtəlifdir.

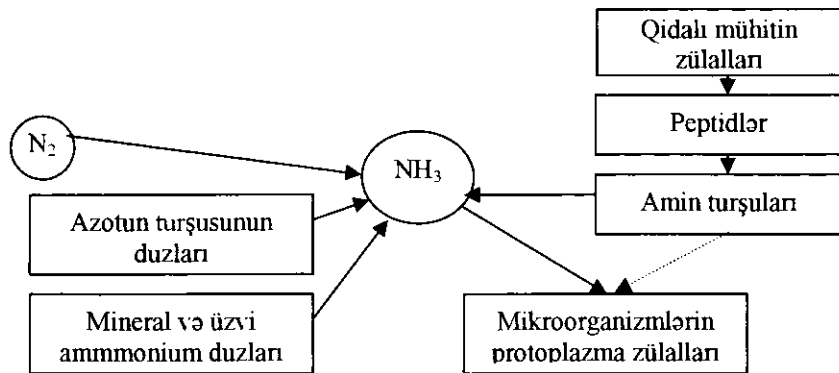
Mineral tərkibli azotlu birləşmələri mənimsəyən bakteriyalar ammoniumun mineral duzları və onun fizioloji turş birləşmələrindən istifadə edir, mineral azotu mənimsəyir və mübadilə edir. Bu mikroorqanizmlər laboratoriya şəraitində əsasən nişasta+ammonium+aqar (NAA) mühitində inkişaf edirlər.

Üzvi tərkibli azotlu birləşmələri mənimsəyən bakteriyalar ət bulyonu+pepton+aqar (ƏPA) mühitində inkişaf edir.

Onlar azotun üzvi tərkibli birləşmələrindən istifadə edir, ammoniumlu birləşmələri mübadilə edir və bu zaman mühitdə  $\text{SO}_2^-$ ,  $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$  və s. bu kimi anionlar toplanır,  $\text{H}^+$  ionların qatılığı artır, zəif turş mühit yaranır və bakteriyaların inkişafı üçün daha əlverişli şərait yaranır.

Azot turşuları və onun duzları fizioloji qələvi xassəyə malikdir. Bakteriyalar mühitdə əmələ gəlmiş  $\text{NO}_3^-$  ionunu və  $\text{NH}_3$  mənimsəyir. Lakin mühitdə toplanan metal ionları onların inkişafına mənfi təsir göstərir.

Ümumiyyətlə amin turşuları, peptonlar və s. bu kimi üzvi tərkibli azotlu birləşmələr bakteriyaların inkişafına əlverişli şərait yaradır. Azotun üzvi tərkibli birləşmələrinin bioloji mübadiləsi ammiakın əmələ gəlməsi ilə (sxem 1) nəticələnir və bu zaman ammiak qaz halında ayırılır və konstruktiv proseslərə daxil olur, biokimyəvi çevrilmələrə məruz qalır.



Sxem 1. Azotlu maddələrin mübadiləsi

Görünür ki, bakteriyalar tərəfindən mübadilə edilmiş azotlu maddələr ilk növbədə ammiakın ( $\text{NH}_3$ ) əmələ gəlməsinə səbəb olur. Ammiak isə bakteriyaların həyat fəaliyyətində həlledici rol oynayır və mühüm əhəmiyyət kəsb edir.

Azotlu maddələr hüceyrələrin bioloji xüsusiyyətlərinin tənzimlənməsini, fizioloji funksiyalarının yerinə yetirilməsini, hüceyrələrdə maddələr və enerji mübadiləsini və onların əsas yollarını müəyyən edir və əlaqələndirilməsini təmin edir.

Bakteriyaların inkişafı üçün azotlu maddələr labüddür və onların çoxalmasına əlverişli şərait yaradır, bu birləşmələrin qidalı mühitlərə əlavə edilməsi zəruridir.

**Tapşırıq.** Azotun müxtəlif birləşmələrindən ( $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ , çörək mayasının məhlulu) hazırlanmış qidalı mühitdə inkişaf etmiş *A. suboxydans* müşahidə etmək.

Təcrübənin yerinə yetirilməsi üçün tapşırığın sxemi tərtib olunur.

### **I. Qidalı mühitlərin hazırlanması**

1. Nəzarət mühit (azotlu maddələr daxil edilməmiş)
2. Nəzarət mühit +  $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$
3. Nəzarət mühit +  $\text{KNO}_3$
4. Nəzarət mühit + 2% -li çörək mayası məhlulu (q.ç.i.)

### **Qablar və reaktivlər**

1. 250 ml – lik konusvari kolba -16 ədəd
2. 250 ml – lik konusvari və ya yastıdib kolba-16-20 ədəd
3. 25 ml – lik kolba-4 ədəd
4. 25 ml – lik silindir-4 ədəd
5. 1-2 ml – lik pipetka-2 ədəd
6. quru çörək mayası (q.ç.i.)

**Təcrübənin qoyulmasına hazırlıq.** Əsas enerji mənbəyi kimi 5% – li sorbitin, 0,05% – li “B” vitaminlər kompleksinin, 0,4 mq/ml tiamin və pantoten turşusunun məhlullarından istifadə edərək, nəzarət qidalı mühiti hazırlanır.

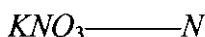
Nümunə məhlulların becərilməsi üçün istifadə olunan qidalı mühitlər isə aşağıdakı qaydada hazırlanır. Nəzarət qidalı mühitin üzərinə müvafiq olaraq ammonium sulfat  $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ , kalium nitrat ( $\text{KNO}_3$ ) duzu, və 2%-li çörək mayası məhlulu əlavə olunur. Məlumdur ki, azotlu maddələr əlavə edilmiş mühitlər qida elementləri ilə daha zəngin olub, bakteriyaların inkişafına əlverişli şərait yaradır, müqayisədə isə azotlu maddələr daxil edilməmiş nəzarət mühitində bakteriyalar nisbətən zəif inkişaf edirlər.

Bütün qidalı mühitlərdə təsiredici maddənin (azot) miqdarı bərabər olaraq təsiredici maddənin miqdarı 100 ml qidalı mühi-

tə görə hesablanır. Hesablamalar göstərir ki, 100 ml qidalı mühitə 15 mq. azot əlavə oluna bilər.

Azotlu birləşmələrin ("B" vitaminlər kompleksi, çörək mayası və s. maddələr) tərkibində azotun miqdarı Keldal üsulu təyin edilir.

**Təsiredici maddələrin hesablanması.** Azotlu birləşmələrin tərkibində olan azotun miqdarı aşağıdakı qaydada hesablanır. Kalium nitrat duzunun tərkibində olan azotun mirdarının hesablanması üçün kalium nitrat və azotun molekul çəkisinə görə tənəsübün həddləri müəyyən olunur və mütənabsiblik qurulur:



$$92 \text{ ————— } 14$$

$$X \text{ ————— } 15$$

$$X = \frac{92 \cdot 15}{14} = 98,5 \text{ mg}$$

Tənəsüblükdən görünür ki, kalium nitrat duzunun tərkibində azotun mirdarı 15 mg -dır və 100 ml qidalı mühitə 98,5 mq  $KNO_3$  duzu əlavə edilir, mühitdə  $pH=6,0-6,2$  əmsalının təmin etmək üçün qatı natrium bikarbonat ( $NaHCO_3$ ) və ya 10%-li sulfat turşusundan ( $H_2SO_4$ ) istifadə olunur. Sonra isə beş dəfə təkrar olaraq 25 ml. qidalı mühit 250 ml –lik konusşəkili kolbalara tökülür və avtoklavda bir atmosfer təzyiqlə steril olunur.

**Təcrübənin qoyulması.** Kolbalardakı nəzarət və digər qidalı mühitlərə 0,2 ml nümunə məhlul əlavə edilir və  $30^0$  hərarətdə 48 saata termostata yerləşdirilir. Optiki sıxlığın və  $pH - m$  təyin edilməsi üçün iki kolba saxlanılır.

**Alınanların qeyd edilməsi.** Tədqiqatçı təcrübənin gedişinə nəzarət edir, müşahidələr aparır. Kulturalar mikroskoplanır, görüntülər qeydə alınır, məlumatlar sistemləşdirilir və ümumiləşdirilir, mühitin  $pH - t$  təyin edilir və bakteriyaların quru çəkisi hesablanır, digər çalışmalar aparılır və müvafiq işlər yerinə yetirilir.

Bakteriyaların kütləsi nefelometriya üsulu ilə təyin edilir. Hümunələr üzrə alınan rəqəmlər üzrə orta ədədi qiymət tapılır və ədədlər qiymətləndirilir, nəzarət və nümunə variantlarına gö-

rə standart kənarlaşmalar hesablanır və variantlararası fərqi etibarlılığı müəyyən olunur, alınan rəqəmlərin cəmi təcrübənin gedişi haqqında geniş məlumat verir, alınanlara görə cədvəllər (cədvəl 1.) tərtib olunur, konkret fikirlər ifadə olunur, fikirlər isə nəticələri formalaşdırır.

**Cədvəl 1.** Bakteriyaların inkişafına azotlu maddələrin təsiri

Fərdi nümunələr	Kolbaların N-si	Biokütlə				pH	
		Optiki sıxlıq, n.ş/v*		Quru çəki, ml/mg			
		0 saat	48 saat	0 saat	48 saat	0 saat	48 saat

## Ş2. Bakteriyaların inkişafına karbonlu maddələrin təsiri

Bir qrup bakteriyalar üçün əsas enerji mənbəyi karbonun müxtəlif birləşmələridir. Bakteriyalar bu birləşmələri hidroliz edib mənimsəyirlər. Bakteriyaların karbona və onun birləşmələrinə olan münasibəti müxtəlif olub avtotrof və heterotroflara ayrılır. Avtotroflar karbonlu birləşmələrin reduksiya olunan formalarını (neft, parafin, mum, qaz halında olan birləşmələr və s.) oksidləşdirir. Heterotroflar şəkər, spirt, üzvi karbon turşular və s. bu kimi birləşmələri mənimsəyir və mübadilə edir.

Təbiətdə geniş yayılmış karbon birləşmələri fasiləsiz olaraq bioloji proseslərə və biokimyəvi çevrilmələrə məruz qalır, kimyəvi mübadilə olunur, hidroliz edilir. Mürəkkəb karbohidratlardan olan sellüloza və sellüloza tərkibli digər birləşmələr sellüloza parçalayan mikroorqanizmlər (bakteriyalar, mikofitlər və s.) tərəfindən parçalanır və mənimsənilir.

Sellülozanı parçalayan bakteriyalar əsasən Pseudomonadles sırasına aiddir. Bu bakteriyalar müxtəlif kimyəvi quruluşa malik olan yüksəkmolekullu seluloza və digər seluloza tərkibli digər maddələri mənimsəyir, nisbətən aşağı molekül çəkisinə malik olan birləşmələrə

\* Nefelometr şkalası / vahid

çevirir, maddələr mübadiləsinə daxil edirlər. Maddələrin dövrünü təmin edilir, bunlar enerji mübadiləsinə tənzimləyir, hüceyrədə bioloji enerji şəkilində makroergik əlaqəyə malik olan birləşmələrin tərkibində toplanır və canlıların həyat fəaliyyəti davam edir.

### **Tapşırıq. Biokütlənin təyin edilməsi.**

Bakteriyaların əksəriyyəti qlükoza və qliserinli mühitlərdə inkişaf edirlər.

#### **Təcrübənin sxemi:**

1. Nəzarət mühit (0,5q q.c.i. çörək mayası məhlulu + karbonlu birləşmələr):
2. Nəzarət mühit+qliserin ( $C_3H_8O_3$ );
3. Nəzarət mühit+qlükoza ( $C_6H_{12}O_6$ );

#### **Qablar və reaktivlər:**

1. 250 ml – lik konus şəkilli kolba-15 ədəd;
2. 100 ml – lik konus şəkilli və ya yastıdib kolba- 3 ədəd;
3. 25 ml – lik ölçülü kolba-3 ədəd;
4. 25 ml – lik Mor pipetkası-3ədəd;
5. 1-2 ml – lik pipetka -10 ədəd ;
6. 250 ml – lik silindr -3 ədəd;
7. Quru çörək mayası+ susuz qlükoza (k. t.)\* + qliserin.

**Təcrübənin qoyulmasına hazırlıq.** Nəzarət qida mühiti nisbətən çox (0,5% – li quru çörək mayası məhlulu, azotlu üzvi birləşmələr, vitaminlər, vitaminəbənzər maddələr və ekstrojen) hazırlanır. Estrogen çörək mayasının hüceyrələrindən alınır karbondərkibli komponentlərlə zəngin olan qidalı maddədir.

Nəzarət qidalı mühiti üç (I, II, III) hissəyə ayıraraq müxtəlif tərkibə malik mühitlər hazırlanır:

I. Nəzarət qidalı mühit;

II. Nəzarət+qlükoza qidalı mühiti;

III. Nəzarət +qliserin qidalı mühiti;

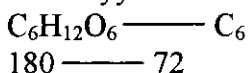
Nəzarət qidalı mühitinə (I) digər maddələr daxil edilmir, lakin nümunə variantları üçün (II və III) hazırlanan mühitə kar-

---

\* kimyəvi təmiz

bon atomlarının miqdarı bərabər olaraq  $100\text{ ml}$  qidalı mühitə görə  $2\text{ q}$  qlükoza (II) və ya  $2\text{ q}$  qliserin (III) əlavə olunur. Bu maddələr mühitdə bakteriyaların intensiv inkişafı üçün əlverişli şərait yaradır. Qidalı mühitin tərkibinə daxil edilən qlükoza və qliserin çəkisi təyin edilir.

**Qlükoza və qliserin çəkisinin təyin edilməsi.**  $100\text{ ml}$  mühitə əlavə olunan qlükozanın miqdarı aşağıdakı qaydada hesablanır. Qidalı mühitin tərkibinə  $2\text{ q}$  karbonun daxil edilməsi üçün qlükoza və karbonun molekul çəkilərinə görə tənəsübun həddləri müəyyən olunur və mütənasublik qurulur:



$$X \text{ --- } 2$$

$$X = \frac{180 \cdot 2}{72} = \frac{360}{72} = 5,0\text{q}$$

$100\text{ ml}$  qliserinli mühitinə də  $2\text{ q}$  karbonun əlavə olunması üçün qliserin və karbonun molekul çəkilərinin nisbətində görə tənəsübun həddləri müəyyən edilir və mütənasublik qurulur, hesablamalar aparılır.

Hesablamalar göstərir ki,  $100\text{ ml}$  nəzarət qidalı mühitə

$$(pH = 6,0 - 6,2)$$

$5\text{ q}$  qlükoza və ya qliserin əlavə olunur. Sonra 5 ədəd  $250\text{ ml}$  -lik yastıdib kolbanın hər birinə  $25\text{ ml}$  qidalı mühit daxil olunur,  $0,5$  atmosfer təziqlə avtoklavda steril olunur.

**Nümunələrin seçilməsi.** Tədqiqat obyekt müəyyən edilir və onun təhlil metodu təyin edilir, nümunələrin hazırlanma üsulları işlənir, nümunələr hazırlanır, hazırlanmış nümunələrin tərkibi, quruluşu, bioloji, fizioloji və digər xassələri tədqiq olunur, alınmış nəticələr ümumiləşdirilir, təkliflər işlənir.

**Nümunələrin hazırlanması.** Müxtəlif substratlardan mikroorqanizmlərin ayrılması, onların morfo-fizioloji, biokimyəvi xassələrinin və bioekoloji xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi üçün metodlar seçilir və müxtəlif üsullardan istifadə edilir. Müxtəlif fizioloji qrup mikoorqanizmlər müvafiq qidalı mühitlərdə becərilir, cins və növlərə görə identifikasiya aparılır.

Təcrübələri üçün nümunələrin hazırlanması və işlənməsi xüsusi diqqət tələb edir. Tədqiqatın məqsədinə müvafiq obyekt təyin edilir və təhlil üsulları müəyyən edilir.

**Nümunələrin götürülməsi.** Hər hansı substratdan nümunələrin götürülməsi üçün ləvazimatlar (paket, torbalar, bıçaq və s.) seçilir, steril (spirt, kimyəvi məhlullar, buxar, istilik və s.) olunur və təcrübə üçün hazırlanır. Nümunələr 3-4 dəfə təkrardan ibarət olaraq toplanır və eyni ölçülərə malik olan nümunələr steril kağızın üzərində birləşdirilir, möhkəm qarışdırılır, orta (fərdi nümunələr) nümunələr əldə edilir. Beləliklə fərdi nümunələr xüsusi qablara (torba və ya paket) toplanır və qeydlər edilir. Hər hansı obyektədən ayrılmış ümumi nümunələr 6-4 saat müddətində laboratoriyaya çatdırılır və təhlil olunur. Fərdi nümunələrin ilkin göstəriciləri (rütubətlik, qələvililik və s.) yoxlanılır və müvafiq qidalı mühitlərdə becərmək üçün hazırlanır.

Fərdi nümunələrin becərilməsi üç mərhələdən ibarətdir və müvafiq dövrə bölünür:

1. Nümunə məhlullarının (əkin materialı) hazırlanması,
2. Nümunə məhlullarının (Petr qabı, sınaq şüşəsi və s.) əkilməsi,
3. Koloniyaların sayılması.

Mikroorqanizmlərlə zəngin olan fərdi nümunələrdən nümunə məhlulları hazırlanır. Bunun üçün məhlulları durulaşdırma metodundan istifadə olunur. Bunun üçün kolbalar, sınaq şüşələri və pipetka hazırlanır. Fərdi nümunələrdən 10 q. götürülür və kolbada olan 90 ml steril suya əlavə edilir, 5 dəqiqə qarışdırılır və 1:10 nisbətində məhlul alınır. Bu məhluldan 1 ml steril pipetka ilə götürülür, ardıcıl olaraq 9 ml steril distillə suya II, III, IV və digər sınaq şüşələrinə əlavə edilir.

Beləliklə,

I	II	III	IV
1:10	1:100	1:1000	1:10000

Müxtəlif nisbətli durulaşdırılmış nümunə məhlulları alınır.

SUMQAYIT  
DÖVLƏT UNIVERSİTETİ  
KİTABXANA

50088

Mikrobioloji təhlillərin aparılması üçün 3-5 dəfə təkrar olaraq ƏPA (ətli peptonlu aqar), SA (səmənli aqar), ƏSPA (ƏPA+SA 1:1), NAA (nişastalı ammoniumlu aqar)) və s. təbii, sintetik, yarımsintetik quru və duru qidalı mühitlərdən istifadə olunur.

Nümunə məhlullar müvafiq qidalı mühitlərdə becərilir. Qidalı mühitlər əridilir, 40-45<sup>0</sup>-yə kimi soyudulur, Petr qallarına tökülür, mühit bərkiyir, sonra qabların yuxarı hissəsi aşağı qoyularaq quruducu şkafda 60-70<sup>0</sup> hərarətdə 10 dəqiqə qurudulur.

Petr qalları quruducu şkafdan çıxarılır, soyudulur və mikroorqanizmlərin becərilməsi üçün 3-4 dəfə təkrar olaraq 1:1000 nisbətli məhluldan 0,1 ml götürülür, ƏPA və NAA-ın, səthinə əlavə edilir və steril şüşə şpatellə yaxılır. Eyni nisbətli məhlulun əkilməsi üçün bir şpateldən istifadə olunur.

Mikroskopik göbələklərin becərilməsi üçün turşulaşdırılmış səmənli aqardan (tSA) geniş istifadə olunur. tSA-ın hazırlanması üçün 0,5-1l. qidalı mühit əridilir, 40-45<sup>0</sup>-yə kimi soyudulur və 0,5-0,25 q. limon turşusu əlavə olunur. Bunun üçün sınaq şüşəsinə bir qədər steril su tökülür və 0,5-0,25 q. limon turşusu əlavə edilir, qaynadılır, steril olunur və SA-a əlavə edilir və turşulaşdırılmış səmənli aqar (tSA) alınır. tSA-dan *Penisilium*, *Asperigulus* və s. mikroskopik göbələklər becərilməsi üçün istifadə olunur. Bu qrup mikroorqanizmlərin becərilməsi üçün 1:100 nisbətli durulaşmış nümunə məhluldan 1 ml. götürülür, steril Petr qablarına tökülür, üzərinə tSA əlavə edilir, ehtiyatla qarışdırılır qarışıq bərkiyir və termostata yerləşdirilir.

Sporlu bakteriyaların becərilməsi üçün 1:100-ə nisbətli məhlullardan istifadə edilir. Bu məhlullar buxarla (70-80<sup>0</sup>) 10 dəqiqə su hamamı üzərində pasterezə edilir. Bu zaman vegetativ hüceyrələr üçün qeyri-əlverişli şərait yaranır və sporlar əmələ gəlir. Sonra Petr qablarına ƏPSA tökülür, 0,1 ml. məhlul əlavə edilir, şpatellə yaxılır və termostata yerləşdirilir.

**Təcrübənin qoyulması.** qlükoza və qliserinli qidalı mühit olan kolbalara 0,2 ml. nümunə məhlulları əlavə edilir, 30<sup>0</sup> hərarətdə 48 saat termostata yerləşdirilir. Mühitin optiki sıxlığı və ümumi turşuluğunun təyin edilməsi üçün kolbalar saxlanılır.

**Alınanların qeyd edilməsi.** 48 saatdan sonra kolbalar termostatdan çıxarılır, nəzərdən keçirilir, fenoloji müşahidələr aparılır, koloniyaların ümumi görünüşü qiymətləndirilir və bütün hallarda kulturalar mikroskoplanır, mikrobioloji xüsusiyyətləri təhlil olunur, biotexnologiya aspektləri və tədqiq sahəsi müəyyən edilir. Sonra kolbalarda olan qarışıq ilkin həcminə (25 ml.) çatdırılır, sentratuqa edilir, bakteriya kütləsi ayrılır, mühitin optiki sıxlığı təyin edilir, rəqəmlər təhlil edilir və alınanlar cədvəllərdə yerləşdirilir.

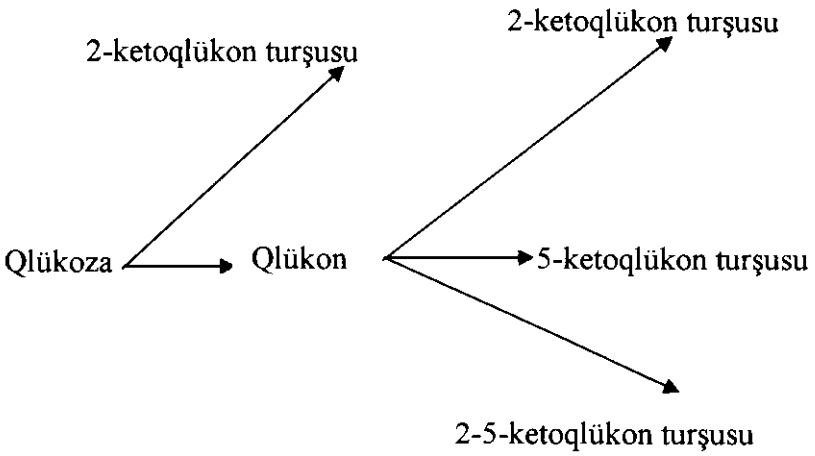
**Bakteriyalarda oksidləşmə məhsulları.** Bakteriyalar bir sıra maddələri oksidləşdirir, digər maddələri əmələ gətirir, qlükoza və qliserini daha fəal oksidləşdirir, oksidləşmə məhsulları isə kultural mayedə toplanır. Bu məhsullar xromoqrafiya metodu ilə təyin olunur. Alınan rəqəmlərə görə cədvəllər (cədvəl 2) tərtib olunur, hesablamalar aparılır.

Rəqəmlərin orta ədədi qiyməti, nəzarət və fərdi nümunələrin standartdan kənarlaşmaları, variantlararası fərqin etibarlılığı müəyyən olunur və alınanlar qiymətləndirilir.

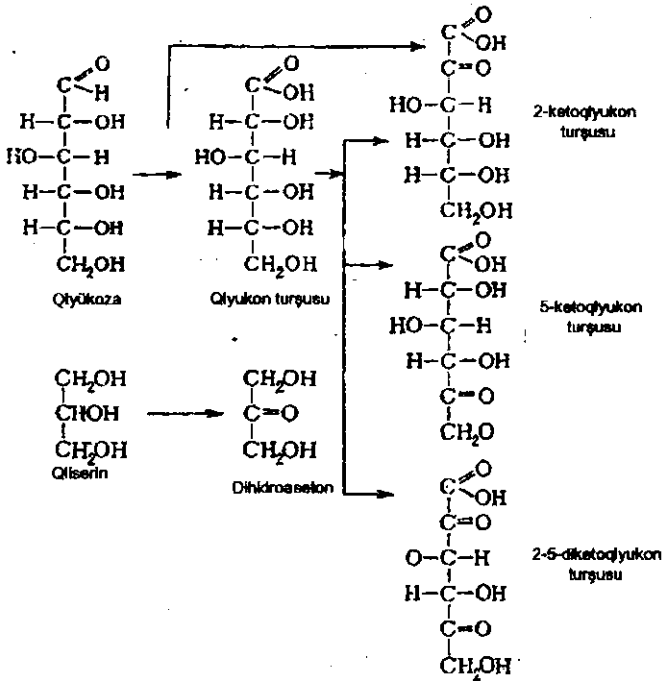
*Cədvəl 2.* Bakteriyalarda qlükoza və qliserinin oksidləşmə məhsulları

Fərdi nümunələr	Kolbaların N-si	Biokütlə, n.s./v.		pH 100ml/mg		Dihidrooksiaseton 100ml/mq		Qlükon turşusu 100ml/mq	
		0 saat	48 saat	0 saat	48 saat	0 saat	48 saat	0 saat	48 saat

Acetobakter suboksydans qlükoza və qliserinli mühitində qlükozanı oksidləşdirir, qlükon və keto turşular əmələ gəlir, qliserini isə dihidrooksiasetona mübadilə (sxem 2) edir.



Qliserin → dehidroaseton və s.



Sxem 2. Qlyukoza və qliserinin oksidləşmə məhsulları.

### **Qidalı mühitin ümumi turşuluğunun (*pH*) təyin edilməsi.**

Mühitin ümumi turşuluğunun təyin edilməsi üçün 10 ml qidalı mühit 0,01 *n.* NaON məhlulu ilə titirlənir. Fərz edək ki, 5 ml. qlükozalılı 10 ml. qliserinli qidalı mühit götürülmüş və 0,01 *n.* NaON məhlullu ilə titirlənmişdir. 5 ml. və 10 ml. qidalı mühitin titirlənməsinə sərf olunan 0,01 *n.* NaOH məhlulunun miqdarına görə mühitin turşuluğu hesablanır. Mühitin ümumi turşuluğu 100 ml. mühitin 0,01 *n.* NaON məhlul olan nisbəti ilə ölçülür.

### **§3. Bakteriyaların vitaminli qida mühitlərdə inkişafı**

Heterotrof bakteriyaların əksəriyyəti karbon və onun sadə, mürəkkəb birləşmələrini məninsəyir, mineral duzlarından ibarət olan qidalı mühitlərdə daha yaxşı inkişaf edirlər. Hüceyrələrində karbon elementinin çatışmaması bir çox bakteriyaların amin turşuları, purin və pirimidin əsasları, vitaminləri və digər bu kimi maddələr sintez edə bilmirlər. Bu kimi bio-kimyəvi çevrilmələr onların çoxalması və inkişafına mənfəət təsir göstərir. Bakteriyaların həyat fəaliyyətində vitamin və vitaminlərə bənzər maddələr mühüm rol oynayır və onların normal inkişafını təmin edir.

Vitamin və vitaminlərə bənzər maddələr hüceyrələrdə maddələr mübadiləsinə tənzimləyən, biokimyəvi prosesləri nizamlayan, mərhələlər üzrə zəncirvari mürəkkəb kimyəvi çevrilmələrin gedişini təmin edən və onun əsas istiqamətlərini müəyyən edən vacib amillərdən biridir.

Vitamin və vitaminlərə bənzər maddələr, onların təsir qüvvəsi müxtəlifdir. Bu maddələr qidalı mühitlərin tərkibinə cüzi miqdarda (iz halında) əlavə olunur və bakteriyaların tam inkişafını təmin edir. Məsələn, qidalı mühitlərin tərkibinə daxil edilən amin turşuları hüceyrədə zülalların, "B" vitaminlər kompleksi isə fermentlərin, kofermentlərin və onların tərkib hissələrinin sintez olunmasına səbəb olur. Mikrobioloji təcrübələrdə əsasən böyümə amili kimi vitamin, vitaminlərə bənzər maddələr və onların məhlullarından istifadə edilir. Bu maddələrə ehtiyacı olan bakteriyalar auksotroflarda adlandırılır. Auksotrof bakteriyaların bu amillərə qarşı münasibəti maddələr mübadiləsinin gedişatı ilə müəyyən

olunur və onların təsiri ilə biokimyəvi reaksiyaların istiqaməti dəyişir. Vitamin və vitaminə bənzər maddələr hüceyrə çatışmadıqda və ya digər maddələrlə əvəz olunmadıqda, bakteriyalar tam inkişaf edə bilmirlər. Vitaminlər hüceyrələrdə cüzi miqdarda sintez olunur, bəzən digər maddələrlə əvəz olunur.

Bir çox bakteriyalar pantoten, paraaminobenzoy və nikotin turşusuna görə aüksotrofdırlar. Qnların vitaminlərə olan tələbatının öyrənilməsi üçün sintetik qidalı mühitlərdən istifadə olunur. Bu mühitlər perokristallaşdırılmış reaktivlər, bidistillə\* suyu, yuyulmuş aqar və vitaminlərdən (k.t.) hazırlanır. Mühitə pantoten, paraaminobenzoy və nikotin turşuları ilə yanaşı tiamində əlavə olunur. Tiamin kulturalarının böyüməsinə və inkişafına müsbət təsir göstərir.

Vitamin və vitaminlərə bənzər maddələrin bakteriya hüceyrələrinə təsirini öyrənmək üçün müxtəlif nisbətli (1:10; 1:100; 1:1000 və s.) məhlullar hazırlanır.

**Tapşırıq. Bakteriyaların inkişafına tiamin və pantoten turşusunun təsiri.** Bakteriyaların inkişafına vitaminlərin təsirinin öyrənilməsi üçün tiamin və pantoten turşusu əlavə edilmiş qidalı mühitlər hazırlanır, nümunə məhlulları becərilir, koloniyaların inkişafına nəzarət edilir və müşahidələr aparılır.

#### **Təcrübənin sxemi:**

1. nəzarət qida mühiti (vitaminlər əlavə edilməmiş);
2. nəzarət qida mühiti+ pantotenat kalsium;
3. nəzarət qida mihiti+tiamin;
4. nəzarət qida mühiti+ pantotenat kalsium+ tiamin;

#### **Qablar və reaktivlər:**

1. 250 ml – lik dairəvi kolba-20 ədəd;
2. 100 ml – lik steril kolba -3-4 ədəd
3. 1-2 ml – lik steril pipetka -3-4 ədəd ;

---

\* **Bidistillə suyunun hazırlanması:** Adi su ilə kalium permanqanat (su + 0,01%-li  $\text{KMnO}_4$ ) məhlulu 100<sup>0</sup> hərarətdə buxarlandırılır.

4. 5 ml – lik Mor pipetka -5ədəd;
5. 20 ml – lik steril Mor pipetka -5ədəd;
6. 100 ml – lik steril distelə su - hər kolbada 50 ml – lik - 2 ədəd kolba ;
7. 50 ml steril fizioloji məhlul (0,85 % NaCl);
8. sorbit, ammonium sirkə duzu, quru çörək mayası, B-vitaminlər kompleksi, pantotenat kalsium, tiamin, natrium xlorid.

**Təcrübənin qoyulmasına hazırlıq.** Təcrübə üçün nəzarət qidalı mühiti (sorbitin 5%-li, ammonium sirkə duzunun 0,1%-li “B” vitaminlər kompleksinin 0,05%,-li məhlulu) hazırlanır, mühitin turşuluğu ( $pH = 6,0 - 6,2$ ) təyin edilir. 250 ml – lik 20 kolbanın hər birinə 25 ml. qidalı mühit tökülür, avtoklavda bir atmosfer təzyiqlə steril olunur.

Qidalı mühitlərin hazırlanması üçün istifadə olunan “B” vitaminlər kompleksin faizli məhlul aşağıdakı qaydada hazırlanır.

100 ml – lik iki konusşəkilli steril kolbaya 20 ml. steril distillə suyu tökülür, bir kolbaya 20 mq. pantotenat kalsium, digərinə isə 20 mq. tiamin əlavə edilir, qarışdırılır, 0,01 % – li məhlulu alınır, bu məhlul 30 dəqiqə buxarla steril olunur.

**Təcrübənin qoyulması.** Steril boksda dörd fərdi nümunələr üzrə beş dəfə təkrar olaraq nümunə məhlulların becərilməsi üçün 20 kolba götürülür və onlara nəzarət qidalı mühit daxil edilir. İşin gedişində nəzarət qidalı mühit olan kolbalara vitaminli məhlullar əlavə edilmir. Lakin digər üç nümunə variantlar üzrə təkrar kolbalara 0,01%-li vitaminli məhlullar əlavə edilir. 1 ml. pantoteinat kalsium (II), 1 ml. tiamin (III), 1 ml. pantoteinat kalsium + 1 ml. tiamin məhlulu (IV) əlavə edilir. IV variant üzrə kolbalara əlavə olunmuş 2 ml. vitaminli məhlullar kolbada qidalı mühitin həcmi dəyişdirir. Beləliklə, digər (I, II, III) təkrar kolbalara 1 ml. steril su əlavə edilir.

Sonra bakteriyaların fizioloji məhlulla işlənmiş nümunələrindən 0,2 ml. götürülür, kolbalara əlavə edilir. Fərdi nümunələr üzrə variantların hər birindən üç kolba 30<sup>0</sup> hərərdə termostata

yerləşdirilir. İki kolbadan isə mühitin fiziki, kimyəvi və digər göstəricilərin təyin olunması istifadə olunur.

48 saatdan sonra kolbalar termostatdan çıxarılır, 1 ml. qidalı mühitdə inkişaf etmiş koloniyalar sayılır.

**Alınanların qeyd edilməsi:** Kolbalar nəzərdən keçirilir, koloniyaların böyüməsi təsvir edilir, müşahidələr aparılır və biokütlə təyin olunur. Sonra kolbada olan qarışıqlar 25 ml-ə çatdırılır və biokütlə nefelometriya metodu ilə təyin edilir. Biokütlənin çəkisinə görə 1 ml. mühitdə inkişaf etmiş hüceyrələrin sayı müəyyən olunur. Fərdi nümunələr üzrə (I, II, III, IV) bakteriyaların kütləsi əmələ gəlmiş zülalın miqdarına görə də təyin edilir. Alınanlara görə cədvəllər (cədvəl 3.) tərtib olunur və uyğun ədədlər yerləşdirilir.

*Cədvəl 3.* Bakteriyaların çoxalmasına vitaminli mühitlərin təsiri

Fərdi nümunələr	Kolbaların №-si	Biokütlə n.ş/v	Hüceyrələrin ümumi sayı ml/hüc.	Zülalın miqdarı 100 ml/mq

Təcrübənin nəzarət variantı ilə müqayisədə variantlar arasındakı etibarlılıq, onun fərqi və səviyyəsi müəyyən edilir, nəticələr statistik qiymətlərdir.

\* 1 milli litrdəki hüceyrələrin sayı

## II FƏSİL

### BAKTERİYALARIN İNKİŞAFINA FİZİKİ-KİMYƏVİ AMİLLƏRİN TƏSİRİ

Təbiətdə fasiləsiz olaraq orqanizmlərlə ətraf mühitin arasında maddələr və enerji mübadiləsi gedir, orqanizmlərin arasında maddələr dövr edir. Bu proseslərin təsiri ilə mikrobioloji aktivlik əhəmiyyətli dərəcədə dəyişilir. Bütün canlıların kimi tək hüceyrəli mikroorqanizmlər ətraf mühitlə daha sıx əlaqədədir. Mikroorqanizmlər ətraf mühitin təsirlərinə məruz qalır, inkişafına təsir göstərir, həyat fəaliyyətində həlledici rol oynayır.

Bakteriyaların inkişafına fiziki-kimyəvi amillərin güclü təsiri vardır.

Mikrobioloji tədqiqatlarda mühitin turşuluğu ( $pH$ ), oksidləşmə-reduksiya potensialı ( $ORP$ ) və s. bu kimi fiziki-kimyəvi amillərə diqqət yetirilməli və məşğələlər yerinə yetirilərkən nəzərə alınmalıdır.

Mikroorqanizmlər və ətraf mühitin qarşılıqlı əlaqəsi ion mübadiləsi ilə tənzimlənir. Mühitdə olan nitröz və hidrokoksil ionları bakteriyaların inkişafı əlverişli şərait yaradır. Ətraf mühitdəki qida elementlərinin dəyişilməsi hüceyrələrlə ↔ mühitarası ion nisbətinin qeyri-tarazlığına səbəb olur.

Xarici mühitin turşuluğu ( $pH$ ) əvvəl hüceyrələrin səthinə təsir göstərir və sonra onun daxili quruluşunda əks olunur. Bu zaman mühitarası (canlı və cansız mühit) mübadiləsi baş verir. Bu prosesin nəticəsi olaraq ardıcıl kimyəvi çevrilmələrin mərhələli gedişi və onun əsas yolları müəyyən olunur. Biokimyəvi proseslərin istiqamətləri isə bioloji xüsusiyyətlərin formalaşmasına və bioekoloji problemlərin yaranmasına səbəb olur.

Hüceyrə daxili fermentlər mühitin turşuluğuna ( $pH$ ) qarşı həssasdır və onların aktivliyi hidrogen ionlarının ( zəif, orta və yüksək) qatılığından asılıdır. Fermentlər mühitdəki  $pH$  – dan asılı olaraq hüceyrə daxilində baş verən fizioloji proseslərə və bakteriyaların həyat fəaliyyətinə birbaşa (vasitəsiz) və ya dolayı

(vasitəli) təsir göstərir, dissosiasiya prosesini təmin edir, atomların ionlaşmasına səbəb olur.

Bakteriyalara hidrogen ionları müxtəlif formada təsir göstərir və onlar turş, qələvi və neytral mühitdə inkişaf edirlər. Bəzi bakteriya növləri yüksək turş, bəzən neytral və ya həddindən artıq qələvi mühitə qarşı ferment sisteminə malik olub mühitin reaksiyasını özünə məxsus formada dəyişə bilirlər. Onlar həddindən artıq turş mühitdə neytral məhsullar sintez edir, qələvi mühitdə isə güclü turşular əmələ gətirir. Bir çox bakteriya növləri mühitin turşuluğuna görə "uyğunlaşmış mübadilə" (Rabotnova, 1958) qabiliyyətinə malikdir.

Təbii şəraitdə mühitin reaksiyası bakteriyaların istifadə edə bilən təbii ehtiyatlar və digər maddələrdən asılıdır. Fərz edək ki, bakteriyalar azotsuz qida maddələrdən istifadə edir, müvafiq maddələr sintez edir.

Mühit↔mikrob sistemində zülallar və onun birləşmələri parçalanır, ammiak əmələ gəlir və onun törəmələri toplanır. Bu sistemlə maddələrin fasiləsiz bioloji dövrəni baş verir və sonlu olaraq sonsuzluqlar davam edir.

Laboratoriya şəraitində bakteriyaların inkişafının təmin edilməsi üçün quru və duru qidalı mühitlərin turşuluğu ( $pH$ ) təyin edilir.

Qidalı mühitlərdə  $pH$ -in təmin olunması üçün bufer məhlullarından istifadə edilir. Bu zaman mühitin tərkibinin dəyişmə xassəsinə malik olan maddələr (turşu və ya qələvi) daxil edilir. Kulturaların inkişafına  $pH$ -in təsirin öyrənmək üçün mühitə 0,01-0,02  $M$ . bufer məhlulu əlavə olunur.

Mühitin reaksiyası bəzən eyni növ kulturanın inkişaf mərhələlərindən asılı olaraq dəyişilir. Bu maddələr mübadiləsi, və onun gedişinə, fermentlərin hasil olunmasına, aralıq məhsulların əmələ gəlməsinə və s. bu kimi proseslərə təsir göstərir. Göründüyü kimi mühit ilə maddələr mübadilənin son məhsulları arasında qarşılıqlı (Rabotnova, 1957) əlaqə və məyyən nisbilik mövcuddur.

Fiziki-kimyəvi amillərdən biri də mühitin oksidləşmə-reduksiya potensialıdır. Oksidləşmə-reduksiya potensialı ( $ORP$ )\*

---

\* Oksidləşmə-reduksiya potensialı

bütün canlı orqanizmlərdəki kimi bakteryalarda da oksidləşmə-reduksiya reaksiyaları ilə (*ORR*)\*\* ifadə olunur. Bu reaksiyalar maddələr mübadiləsinin biokimyəvi dairəsini təşkil edir və bakteriyaların həyat fəaliyyətində mühüm rol oynayır.

Təbiidir ki, ətraf mühit üzvi və qeyri-üzvi birləşmələrdən ibarətdir, bu maddələr mühit↔orqanizm səviyyəsində hidroliz olunur, kimyəvi çevrilmələrə məruz qalır, ionlara ( $O_2$ ,  $H_2$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Mn^{+3}$ ,  $Mn^{+4}$  və s.) ayrılır. Mühitdə oksidləşdiricilərlə (mənfi yüklənmiş) reduksiyaedicilər (elektron verən) qarşılıqlı vəhdət təşkil edərək, oksidləşmə-reduksiya proseslərini tənzimləyir. Anion və kationlar mübadilə olunaraq, elektron axını *ORP*-nin əmələ gəlməsinə səbəb olur.

Ətraf mühitin oksidləşdirici maddələrindən asılı olaraq oksidləşmə reduksiyaasiya prosesi baş verir və prosesin ümumi gedişi ilə nəticələnir. Oksidləşdirici və reduksiyaedicilərin miqdarından asılı olaraq yüksək qarışıqlara malik olan mühitlər oksidləşdirici, aşağı potensiallı maddələr isə reduksiyaedicilərdir. Bu mühitdə kimyəvi reaksiyalar qeyri-müəyyən tarazlıq əmələ gələ-nə qədər davam edir. Qarışıqlarda oksidləşdiricilər və reduksiya-edicilər buxarına görə təyin edilir.

Məlumdur ki, sulu məhlullar  $H^+$  və  $OH^-$  ionlarına malikdir, bəzən ionların birinə təsadüf olunur.

*ORP*-nin təyin edilməsi üçün hidrogenin oksidləşmiş ( $H^+$ ) və ya reduksiya olunmuş ( $H_2$ ) formaları eləcə də  $2H \rightleftharpoons H_2$  sistem halında götürülür. Hidrogen atomuna görə təyin olunmuş *ORP*-nin intensivliyi. *Eh* – la işarə edilir və milli voltla (*mv*) ölçülür.

Məlumdur ki, ətraf mühitlə fərdlər arasında mübadilə olunan oksidləşdirici və reduksiyaedici maddələrin miqdarı müxtəlifdir. Zəif qarışıqlarda *ORP*-i əvvəl oksidləşdirici, sonra isə reduksiyaedici xassəyə malik olur və bu proses məhlullarda oksidləşdiricilərlə reduksiyaedicilər arasında kimyəvi tarazlıq əmələ gələ-nə kimi davam edir.

---

\*\* Oksidləşmə-reduksiya reaksiyaları

Təbii ki, digər canlılar kimi bakteriya hüceyrələrində də fasiləsiz olaraq *ORR* – *1* baş verir və hüceyrələr *ORP* -na malik olur. Qeyd edək ki, bioloji oksidləşmə prosesində elektron və protonların ( $H^+$  və s. ionları) keçiriciliyi müxtəlif olub yüksək *ORP* -na malik olan fermentlər, sitoxromlar və digər bioloji aktiv maddələrin iştirakı *ORR* – *1* baş verir, Sitoxrom sisteminin oksidləşmə və reduksiya prosesi yüksək olub müsbət, dihidrogenaza fermenti isə mənfi *ORP* – *na* malikdir. Bioloji sistemlərdə *ORR* zəncirvari biokimyəvi reduksiyalar olub, yüksək molekullu biopolimerlər əmələ gəlir.

Oksidləşmə-reduksiya prosesi hüceyrənin daxili hissələrdə eyni potensiala malik deyil, onun intensivliyi (bioloji sürəti) biokatalizatorlarla (fermentlər) tənzimlənir. Ümumiyyətlə *ORP* -nin hüceyrə daxili biosürəti fermentlərin iştirakı ilə nizamlanır və bərabər deyil. Fərz edək ki, bu proses nüvədə yüksək, nüvəcüklərdə isə nisbətən aşağı və ya əksinə olur. Bakteriyaların növ xüsusiyyətindən asılı olaraq *ORR* -*1* aktivliyi və *ORP* -*1* zaman və məkan daxilində dəyişilir.

Mikrorqanizmlərdə baş verən bioloji proseslər və onların inkişaf dinamikası *ORP* ilə bağlıdır. Mikrobioloji tədqiqatlarda *ORP* geniş tədqiq olunur, ona aid təcrübələr aparılaraq təhlil olunur.

Qeyd etmək lazımdır ki, qidalı mühitlər steril edildikdə mühitin *ORP* -in aktivliyi dəyişilir. Bu zaman *pH* yenidən yoxlanmalı və təcrübə davam etdirilməlidir.

## **§1. Bakteriyaların çoxalması və inkişafına *pH* təsiri**

*pH* bakteriyaların çoxalması və inkişafına təsir göstərir. Bu məsələyə aid tapşırıqların təhlil edilməsi üçün bakteriyaların karbonlu maddələrə olan təlabatı nəzərə alınır. Məlumdur ki, bir çox bakteriyalar sorbit, qliserin, qlükoza və s. bu kimi karbon tərkibli mühitlərdə yaxşı inkişaf edirlər.

**Tapşırıq. Bakteriyaların çoxalmasına *pH* – *m* təsiri:** *pH* -dan asılı olaraq bakteriyaların çoxalması və inkişafına nəzarət edilir, müşahidələr aparılır, morfo-fizioloji xüsusiyyətləri təhlil edilir.

### **Təcrübənin sxemi:**

1. nəzarət mühit (sorbit 50 q/l. + "B"-vitaminlər kompleksi 0,05%);
2. nəzarət mühit+10% fosfat-sitrat bufer ( $pH = 3,0$ );
3. nəzarət mühit+10% fosfat-sitrat bufer ( $pH = 4,6$ );
4. nəzarət mühit+10% fosfat-sitrat bufer ( $pH = 8,0$ );

### **Qablar və reaktivlər:**

1. 250 ml – lik konussəkilli kolba-20 ədəd;
2. 500 ml – lik yastıdib kolba-4 ədəd;
3. 250 ml – lik yastıdib kolba-4 ədəd;
4. 25 ml – lik kolba-5 ədəd;
5. 25 ml – lik Mor pipetkası-5 ədəd;
6. 10 ml – lik pipetka-5 ədəd;
7. 5 ml – lik pipetka-5 ədəd;
8. 1 ml – lik pipetka-15 ədəd;
9. sorbit, "B" vitaminlər kompleksi, natrium hidrofosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), limon ( $\text{C}_2\text{H}_8\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$ ) turşusu.

**Təcrübənin qoyulmasına hazırlıq.** Qidalı mühitləri və bufer məhlulunun komponentləri hazırlanır, steril edilir və sonra bufer məhlulu ilə hazırlanmış qidalı mühitlər steril olunur,  $pH$  təyin edilir.

16 ədəd 250 ml – lik kolba hazırlanır, pambıq tıxacla bağlanır, bir atmosfer təzyiqlə steril edilir. 400 ml (16 kolba x 25 ml) nəzarət qidalı mühit hazırlanır və steril kolbalara (16 kolba x 25 ml) tökülür və avtoklavda bir atmosfer təzyiqlə steril olunur.

400 ml qidalı mühitin tərkibinə daxil edilən maddələrin miqdarı 500 ml -ə görə (sorbit 20 q. və "B" vitaminlər kompleksi 2,0 ml) hesablanır. Sterilizasiyadan sonra qidalı mühitə 10% – li bufer məhlulu və 360 ml steril su əlavə edilir. Qidalı mühit 250 ml – lik dörd kolbanın hər birinə 90 ml tökülür və avtoklavda bir atmosfer təzyiqlə steril olunur.

Mak-İlven cədvəlinə görə fosfat-sitrat bufer məhlulu hazırlanır. 250 ml – lik iki kolba götürülür. 100 ml "A" (limon turşusunun 0,1M) və "B" (natrium hidrofosfatın 0,2M) məhlulları

(cədvəl 5) hazırlanır. Digər bir 250 ml – lik kolbaya 100 ml distillə suyu tökülür və bütün kolbalar avtoklavda bir atmosfer təzyiqlə steril edilir.

**Təcrübənin qoyulması.** Təcrübə steril boksda aparılır və kolbalara bufer məhlulları steril pipetka ilə daxil edilir. Fərdi nümunələr və nümunə məhlulların üçün qidalı mühitlər aşağıdakı qaydada hazırlanır.

1. 90 ml. n.q.m.\* + 10 ml. steril su ;
2. 90 ml. n.q.m. +7,9 ml “A” + 2,1 “B” ( $pH = 3,0$ );
3. 90 ml. n.q.m. + 5,3 ml “A” + 4,7 “B” ( $pH = 3$  “ “=4,6 );
4. 90 ml. n.q.m.i + 0,3 ml “A” + 9,7 “B” ( $pH = 8,0$ )

25 ml. qidalı mühit steril pipetka ilə götürülür, variantlar üzrə 4 dəfə təkrar olaraq ( $4 \times 4 = 16$ ) 250 ml – lik boş steril kolbalara köçürülür və 05-1,0 ml nümunə məhlulu əlavə edilir. Sonra kolbalar  $30^0$  hərarətdə 24 saat termostata yerləşdirilir, bir neçə kolba bəzi fiziki-kimyəvi göstəricilərin təyin olunması üçün istifadə olunur.  $pH$  potensiyometrlə ölçülür, biokütlə neflometriya üsulu ilə təyin olunur.

**Alınanların qeyd edilməsi.** 24 saatdan sonra termostatdan götürülmüş kolbalar ilkin həcminə çatdırılır. Optiki sıxlığa görə biokütlənin çoxalması və mühtin reaksiyası təyin edilir. Alınanlara görə cədvəllər (cədvəl 4) tərtib olunur, rəqəmlər hesablanır, biokütlənin miqdarı və quru çəkisi təyin edilir.

*Cədvəl 4.* Bakteriyaların inkişafına fiziki-kimyəvi amillərin təsiri

Fərdi nümunələr	Kolbaların № -si	$pH$	Biokütlə, n.ş / v	Biokütlə q.ç.i. 100ml / mq
$pH = 3,0$				
$pH = 4,6$				
$pH = 8,0$				

Nümunə məhlullarına görə fərdi nümunələr arasında olan fərqlər hesablanır və etibarlılığı müəyyən olunur.

\* Nəzarət qidalı mühit

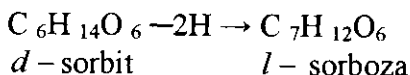
## §2. *pH* -in bakteriyaların hərəkətlər hüceyrələrinə təsiri

Bəzən bakteriyalar ətraf mühitin qeyri-əlverişli şəraitin təsirinə məruz qalır, hüceyrələr sükunətdə olur. Lakin onlar üzür və qeyri-üzvi birləşmələrdən istifadə edir, sintez edir, oksidləşdirir, reduksiya edir və digər bioloji prosesləri yerinə yetirir.

### *pH* -in hərəkətsiz hüceyrələrinə təsiri.

Bakteriyaların ətraf mühitə qarşılıqlı münasibətini təhlil edərkən “hərəkətsiz kultura” metodundan istifadə olunur. Bu metodla işlədikdə bakteriyalar kultural məhluldan ayıraraq, onların nisbətən qatı kütləsi əldə olunur, fizioloji və ya bufer məhlulu ilə suspenziya hazırlanır.

Bakteriyalar karbon mənşəli substansiyaları oksidləşdirir, hidroliz olunmamış maddələr isə mühitdə toplanır və bu birləşmələrdən biri də sorbitdir. Bu mühitdə bakteriyaların hərəkətsiz hüceyrələri sorbiti oksidləşdirib sorbozanı əmələ gətirir. Beləliklə:



Sorbitin sorboza kimyəvi çevrilməsi hüceyrələrin bioloji aktivliyindən asılı olub ətraf mühitin (Razumovska 1956, Jdana-Puşkina 1965.) fəal turşuluğu ilə tənzimlənir.

**Tapşırıq. Ətraf mühitin *pH* - dan asılı olaraq bakteriyaların çoxalmayan hüceyrələrində sorbitin oksidləşməsinin təyin edilməsi.**

### **Təcrübənin sxemi:**

1. Sorbit məhlulu + fosfat-sitrat buferi (*pH* = 3,3);
2. Sorbit məhlulu + fosfat-sitrat buferi (*pH* = 4,6);
3. Sorbit məhlulu + fosfat-sitrat buferi (*pH* = 6,0);
4. Sorbit məhlulu + fosfat-sitrat buferi (*pH* = 8,0)

### **Qablar və reaktivlər.**

1. 100 ml – *lik* hündür boğazlı yastıdib kolba-16 ədəd;
2. 250 ml – *lik* konusşəkilli kolba-14 ədəd;
3. 500 ml – *lik* konusşəkilli kolba-4 ədəd;
4. 20 ml – *lik* Mor pipetka-5 ədəd;
5. 1-2 ml – *lik* pipetka-10 ədəd;
6. 50 ml – *lik* silindr -2 ədəd;
7. sorbit, çörək mayası, natrium hidrofosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), limon ( $\text{C}_2\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) turşusu.

**Təcrübənin qoymasına hazırlıq.** 200 ml. distillə suyuna 20 q. sorbit əlavə olunur və həll edilir. 10% – *li* sorbitli məhlul alınır və bu məhlul 250 ml – *lik* dörd kolbaya bərabər (50 ml.) miqdarda tökülür.

Mak-İlven cədvəlinə görə fosfat-sitrat bufer məhlilləri hazırlanır. Bunun üçün 250 ml – *lik* 2 kolba götürülür, 100 ml. “A” (0,1M limon turşulu məhlul) və “B” (100 ml. 0,2 M iki əsaslı natrium hidrofosfat) məhlulları hazırlanır. Sonra 16 ədəd 100 ml – *lik* boş yastıdib kolba götürülür, pambıq tıxacla bağlanılır. 1№-li qidalı mühit (0,5% – *li* çörək mayasının məhlulu + 50 q/l sorbit) hazırlanır. Qidalı mühit 250 ml – *lik* konusşəkilli on kolbaya tökülür. Bütün ləvazimatlar (16 ədəd boş kolba, 10 qidalı mühit, 2 bufer məhlulu) avtoklavda bir atmosfer təzyiqlə steril edilir.

**Təcrübənin qoyulması.** Kolbalara (1№-li qidalı mühit olan 10 steril kolba) 0,5-1 ml. nümunə məhlullar əlavə olunur və 30<sup>0</sup> hərətdə termostata yerləşdirilir. 24-26 saatdan sonra kolbalar termostatdan çıxarılır və iki dəfə sentrafuğa edilir, alınan kütlə fizioloji məhlula iki dəfə yuyulur və 5-7 ml. fizioloji məhlula resuspenziya edilir. Hesablamalar göstərir ki, 1 ml. qatı suspenziyanın (q.ç.i.) tərkibində olan bakteriyaların kütləsi ≈ 15 – 20 qramdır.

*pH* bufer komponentləri (cədvəl 5) ilə hazırlanır, onların cəminə görə miqdarı təyin olunur. Bufer komponentlərinin nisbətində görə *pH* -ın qatılığı müəyyən edilir.

**Cədvəl 5.** Bufer məhlulunun hazırlanması

<i>pH</i>	"A" məhlul, <i>ml.</i>	"B" məhlul, <i>ml.</i>	"A" + "B" məhlul, <i>ml.</i>
3,3	39,5	10,5	50,0
4,6	26,5	23,5	50,0
6,0	18,5	31,5	50,0
8,0	1,5	48,5	50,0

Cədvəldən görünür ki, istənilən qatılığa malik olan *pH*-ın hazırlanması üçün bütün komponentlərin miqdarına istinad olunur, müxtəlif nisbətdə bufer məhlulu alınır və müvafiq mühit reaksiyası yaranır.

Dörd kolbada (*pH* = 3,3;4,6;6,0 və 8,0 ) 100 *ml.* 5 %-li (50 *ml* bufer məhlulu + 10 %-li 50 *ml.* sorbitli məhlul) sorbit məhlulu hazırlanır və *pH* potensiometriya üsulu ilə təyin edilir.

5%-li sorbitli məhluldan steril pipetka götürülür, dörd ədəd 250 *ml* –lik boş konus şəkilli steril kolbaya daxil edilir və 1 *ml.* suspenziya əlavə edilir. Kolbalar yırğalanan kürsüyə yerləşdirilir, iki saat 30<sup>0</sup> hərarətdə termostata yerləşdirilir. Suspenziya ilə fizioloji məhlul və suspenziyanın hazırlanmasına sərf olunan fizioloji məhluldan 0,5-0,6 *ml.* diskə köçürülür, 2-3 saat 105<sup>0</sup> hərarətdə quruducu şkafa yerləşdirilir, sabit çəki alınana qədər qurudulur və dəqiq çəkisi təyin olunur. Beləliklə suspenziyanın fizioloji məhlulla (*S<sub>ç</sub>*) çəkisi fizioloji məhluldan hüceyrələrin çəkisi (*H<sub>ç</sub>*) ilə eyni həcmdə təmiz fizioloji məhlulun çəkisinin (*F<sub>ç</sub>*) fərqiə görə hesablanır.

$$S_{\text{ç}} = H_{\text{ç}} - F_{\text{ç}}$$

**Alınanların qeyd edilməsi.** Kolbalar yırğalanan kürsüdən götürülür və termostatdan çıxarılır. Kolbada olan qarışıqlar 21 *ml*-ə çatdırılır, sentrafuqa (5000 dövr/dəqiqə) edilir. Bakteriya kütləsi digər qarışıqlardan ayrılır və hüceyrələr çökür, yuyulur, təmizlənir və sorboza digər maddələrdən ayrılır, onun miqdarı (cədvəl 6) Bertran metodu ilə təyin edilir.

**Cədvəl 6.** Sorbozanın təyin edilməsi

Fərdi nümunələr	<i>pH</i>	Kolbanın № – si	Nümunənin miqdarı, ml	KMnO <sub>4</sub> ml	Sorboza. mq/ml

Alınanlar hesablanır, orta ədədi qiymətlər tapılır, təcrübənin nəticələri formalaşır.

### **§3. Bakteriyalarda oksidləşmə-reduksiya potensialının inkişaf dinamikası.**

Laboratoriya məşəğələlərində bakteriyaların (*ORP*) inkişaf dinamikasına aid təcrübələr aparılır, tapşırıqlar yerinə yetirilir, təhlil edilir.

Bakteriyaların mərhələlər üzrə inkişaf dinamikası ümumi xüsusiyyətləri və xüsusi cəhətləri ilə fərqlənir. *ORP* bakteriyaların inkişaf mərhələləri üzrə dəyişilir. Bakteriyanın növ xüsusiyyətlərindən də asılı olaraq *ORP*-in intensivliyi sabit deyil.

#### **Tapşırıq. Bakteriyalarda *ORP*-in təyin edilməsi.**

*ORP*-nin təyin edilməsi üçün, 1№-li qida mühitindən istifadə olunur və sorbitli qidalı mühit hazırlanır, nümunə məhlullarını səthi becərilir.

#### **Təcrübənin sxemi.**

1. 1№-li qida mühit (nümunə məhlulları əlavə edilməmiş);
2. 2№-li qida mühit (nümunə məhlulları ilə);

#### **Qablar və reaktivlər.**

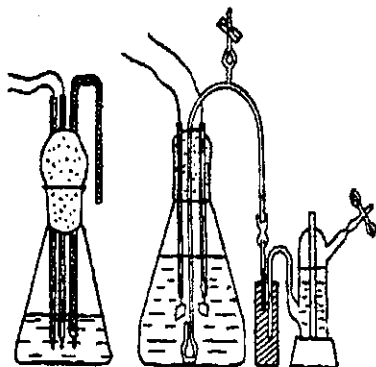
1. 1000 ml – lik kolba-8 ədəd;
2. Platin elektrod-8 ədəd;
3. Kalomel elektrod-4 ədəd;
4. Aqar körpücük-4 ədəd;
5. Sınaq şüşəsi – 8 ədəd;
6. 500 ml – lik şüşə stakan-2 ədəd;

7. *pH* – metr (LP – 58);

7. 1 ml – lik pipetkalar-2ədəd;

8. sorbit, B vitaminlər kompleksi, kalium xlorid (KCl), aqar;

**Təcrübənin qoyulmasına hazırlıq.** 1000 ml -lik 4 ədəd konusşəkilli kolbaya 150 ml. 1 №-li qidalı mühit (sorbit + B vitaminlər kompleksi) daxil edilir.



Şəkil 1. Bakteriyaların kultivasiyası və “Eh” -i ölçən qurğu

Qidalı mühitdə *ORP*-in ölçülməsi üçün xüsusi qurğudan (şəkil 1) istifadə olunur. Bu qurğu platin elektrodlar, pambıq tıxaclar, kolbalar, kalibrlənmiş lövhələr və şüşə borulardan ibarətdir. Platin elektrodlar pambıq tıxacı keçirilir, boş kolbalar bağlanılır. Kalibrlənmiş lövhələrlə anod-katod qalıqları sınaqdan keçirilir, şüşə borularla aqar daxil edilir və aqar körpüsünün əmələ gəlməsi üçün istifadə olunur. Bütün bu əşyalar bir-birinə bağlanır və qurğu quraşdırılır.

Aqar körpüsü üçün “n” şəkilli əyilmiş şüşə borulardan istifadə olunur. Onlar sınaq şüşələri ilə yüklənir və 10% –li KCl + 3% –li aqar məhlulü doldurulur. Aqar körpüçüklərinin hazırlanması üçün sınaq (1x2, 2x4, 3x6, 4x8) şüşələrindən istifadə olunur. Aqar körpüçükləri hündür şüşə stəkanlara yerləşdirilir və yuxarı hissəsi kağızla möhkəm bükülür.

Bütün ləvazimatlar avtoklavda steril olunur və nümunə məhlulları kultivasiya edilir.

**Təcrübənin qoyulması.** Dörd steril qidalı mühit olan 2 ədəd kolbaya 1,2 ml. nümunə məhlulu, digər iki kolbaya isə 1,2 ml. steril su əlavə edilir. Kolbalara elektrodlu tıxac bağlanır və elektrodların yüklənməsi üçün qidalı mühitin 1 sm. dərinliyinə yerləşdirilir. Sonra kamel elektrodlar olan stəkanlar (şəkil 1) aqar körpücüyü ilə birləşdirilir və qurğu 30<sup>0</sup> hərarətdə termostata yerləşdirilir.

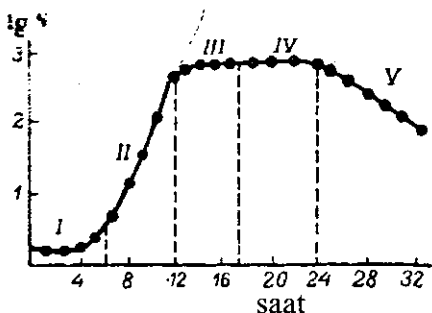
**Alınların qeyd edilməsi.** Qurğunun göstəricisi ilə birləşdirilmiş elektrodlar bakteriyaların inkişafına müvafiq ədədləri qeyd edir, müəyyən vaxta (0-, 4-, 8-, 12-, 24...., saat) görə ölçülər təyin olunur.

Alınmış ölçülər koordinatlar sistemi üzrə absis (*saatla*) və ordinat oxu (*Eh – millivolt.*) üzərində qrafik olaraq göstərilir və *ORP* -nin dəyişmə sürəti təyin olunur.

### III FƏSİL

## BAKTERİYALARIN İNKİŞAF MƏRHƏLƏLƏRİNDƏN ASILI OLARAQ FİZİOLOJİ AKTİVLİYİ

Bütün canlılar kimi bakteriyalar da böyüyür, inkişaf edir və çoxalır. Böyümə silsiləli proses olub dairələrdən təşkil olunmuş və mərhələlər üzrə bir-birini əvəz edir. Bu zaman üç mərhələ (fəal böyümə, zəifləmə və tələf olma) üstünlük təşkil edir, hüceyrələr biokimyəvi və morfofizioloji dəyişikliklərə məruz qalır, ölçüləri artır, inkişaf edir və s. bioloji proseslərlə sona yetir. Qidalı mühitlərə əkilmiş bakteriyaların böyüməsi laq faza ilə başlanır, ekspotensiial və ya loqarifm fazası ilə davam edir, çoxalmanın zəifləmə və ya onun inkişaf sürətinə mənfi təsir göstərən faza ilə əvəz olunur, stasionar və məhvolma mərhələsi ilə nəticələnir. Mikrobioloji tədqiqatlarda inkişaf mərhələləri ilə təzahür olunan və müşahidə edilən fizioloji dəyişikliklər böyümə əyrisi şəkilində (*şəkil 2*) təsvir olunur. Kulturalar üçün xarakterik olan böyümə əyrisi qidalı mühit və onun tərkibindən, aerasiya, hərəkət, rütubət və s. amillərdən asılı olaraq dəyişilə bilər. Mərhələlər üzrə böyümə əyrisi özünəməxsus xüsusiyyətlər ilə səciyyələnir. Məsələn laq fazasında çoxalmanın sürəti üstünlük təşkil edir və bu zaman hüceyrələrin ölçüləri artır, sonuna yaxın yüksək molekullu polifosfat və nuklein turşuları sintez olunur, maddələri mübadiləsinə tənzimləyən fermentlərin aktivliyi yüksəlir. Bu fermentlər loqarifm fazada hüceyrələrin böyümə və çoxalma sürətini tənzimləyir və aktivliyini yüksək səviyyədə saxlayır, lakin fazasının sonuna yaxın böyümə sürəti azalır, fermentlərin aktivliyi nisbətən yüksək səviyyədə qalır və bunun nəticəsi olaraq hüceyrənin ölçüləri kiçilir, nukleinin turşuları və polifosfatların miqdarı tədricən aşağı düşür. Stasionar fazada böyümə və inkişaf sürətinin maksimal həddi sifra yaxınlaşır, biosintetik və energetik reaksiyaların sürətini kataliz edən fermentlərin aktivliyi əhəmiyyətli dərəcədə azalır.



Şəkil 2. Mikrob kulturasının böyümə əyrisi.  
I-laq; II-loqarifim; III-zəifləmə; IV-stasionar; V-məhvölma.

Qeyd etmək lazımdır ki, bakteriyaların inkişaf mərhələlərindən asılı olaraq hüceyrələrin morfoloji ölçüləri, biokimyəvi tərkibi, morfofizioloji xüsusiyyətləri deyil, onların xarici mühit (rəng qəbul etmə xüsusiyyəti, müxtəlif cinsli zədələyici agentlərə qarşı həssaslığı,  $H^+$  ionların qatılığı, hərərət, osmotik təzyiq və s.) amillərinə münasibəti dəyişilir.

Mikrobioloji tədqiqatlarda digər mikroorqanizmlər kimi, bakteriyalar da müxtəlif markalı mikroskoplarla təhlil olunur. Hüceyrələrin eni, uzunluğu və digər ölçüləri “asılı damla” və ya “nazik aqarlı lövhə” üsulu ilə təyin edilir, alınanlar müvafiq düsturlarla hesablanır. Dairə və kok şəkilli bakteriya hüceyrələrinin həcmi (1), səthi isə (2) düsturu ilə hesablanır.

Beləliklə:

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3; \quad (1)$$

$$A = 4 \pi r^2 \quad (2)$$

burada  $\pi^3 = 3,14$

Çöp səkilli və silindrik formalı bakteriya hüceyrələrinin həcmi (3), səthi isə (4) düsturları ilə hesablanır.

Beləliklə:

$$V = 2 \pi ab \quad (3)$$

$$A = 2\pi b(b + 2a) \quad (4)$$

burada  $a$  – hüceyrənin uzuluğu,  $b$  – isə onun enidir.

Malekə (1968) görə bakteriyalarda “bioloji aktivlik” bir qədər başqa tərzdə ifadə olunur və “fizioloji hal” adlandırılır. Bu ifadə orqanizmlərin morfoloji, biokimyəvi göstəricilərlə və mühüm fizioloji xüsusiyyətlərini özündə birləşdirir, növ əlamətlərinin əsas göstəriciləri ilə təzahür olunur. *DNT* və *RNT* – nin quruluşu, ribosomun kəmiyyət və keyfiyyət tərkibi, hüceyrənin digər quruluş elementləri, konstruktiv və induktiv fermentlər və s. bioloji proseslərlə əks olunur.

### §1. Bakteriyaların fasiləsiz becərilməsi

Bakteriyaların fasiləsiz becərilməsi, onların ümumi kütləsi ilə və böyümə sürətinin müvəqqəti azalmasına səbəb olur. Böyümə sürəti isə bir sıra göstəricilərlə ( $v$ -böyümənin sürəti,  $x$  - vahid zamanda əmələ gələn biokütlənin miqdarı,  $\mu$  - böyümənin nisbi və ya xüsusi sürəti,  $t$  - biokütlənin əmələ gəlməsinə sərf olunan vaxtı,  $\hat{c}$ -biokütlənin əmələ gəlməsinə sərf olunan artırılmış vaxt və s.) xarakterizə olunur və mütləq qiyməti vahid zamanda əmələ gələn biokütlənin miqdarı ilə ölçülür və aşağıdakı tənliklə hesablanır:

$$V = \frac{\hat{c}x}{\hat{c}t}, \quad (5)$$

burada  $V$  -böyümə sürəti,  $\hat{c}x$  - vahid zamanda əmələ gələn biokütlənin miqdarı,  $\hat{c}t$  - biokütlənin əmələ gəlməsinə sərf olunan vaxt ilə ifadə olunur.

Böyümənin xüsusi sürət vahidi zamanda əmələ gələn biokütlənin çəkisi ilə mütənasibdir. Alınanlar aşağıdakı tənliklə hesablanır:

$$\mu = \frac{\hat{c}x}{\hat{c}t} \cdot \frac{1}{x}, \quad (6)$$

burada  $\mu$  - xüsusi sürətlə əmələ gələn biokütlənin çəkisi,  $x$  - vahid zamanda əmələ gələn biokütlənin miqdarı,  $t$  - biokütlənin əmələ gəlməsinə sərf olunan zamandır.

Buradan görünür ki, böyümənin sürəti biokütlənin ( $x$ ) əmələ gəlməsinə sərf olunan zamanla ( $t$ ) ifadə olunur. Biokütlə-

nin əmələ gəlməsinə sərf olunan artırılmış vaxt ( $\nu$ ) isə əmələ gələn kütlə ilə mütləq zaman arasındakı asılılıqla ifadə olunur və aşağıdakı mütənasıblıqla təyin edilir:

$$\nu = \frac{t_2 - t_1}{3,32(\lg x_2 - \lg x_1)}$$

burada  $x_1 - t_1$  və  $x_2 - t_2$  biokütlənin əmələ gəlməsinə sərf olunan mütləq zamandır.

**Tapşırıq. Fasləsiz kultivasiya olunan bakteriyaların inkişafı.** Bakteriyaların dərin becərmə usulundan istifadə olunur və fasləsiz inkubasiya olunması üçün güclü aerasiya olunmuş şəraiti yaradılır. Laboratoriya məşğələlərində bakteriyalar fasləsiz becərilir, nəzarət edilir və müşahidələr aparılır.

#### **Qablar və reaktivlər:**

1. 1000 ml – lik kolba-2 ədəd;
2. 50 ml – lik kolba-12 ədəd;
3. Petr qabları -30 ədəd;
4. Tıxacla bağlanmış boş sınaq şüşəsi-40 ədəd;
5. Bakteriyaların dərin becərməsi üçün borular (filtr, nəmləndirici, boru)-2 ədəd;
6. 1; 5; 10 ml – lik pipetkalar 40; 4; 14 ədəd;
7. Ammonium sirkə turşusu, sorbit, B vitaminlər kompleksi, vitaminli məhlullar: (-10,0 mq/% kasiyum pantoteinat; 10,0 mq/% tiamin), quru çörək mayası, aqar, natrium xlorid.

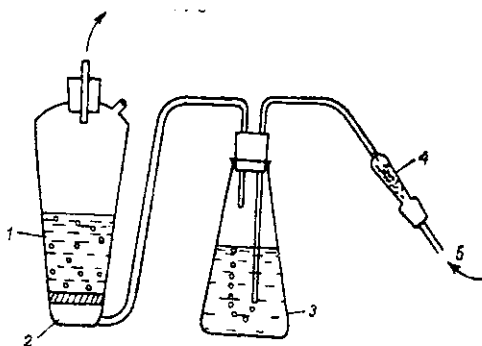
**Təcrübənin qoyulmasına hazırlıq.** Bakteriyaların dərin becərməsi üçün 3 № -li qidalı mühit, məsaməli dibi olan şüşə qablar, 3-nəmləndirici (Bobrov qabı), pambıq filtr və kompressordan istifadə olunur. Bobrov qabına 200 ml distillə suyu tökülür, 1000 ml – lik məsaməli şüşə qablara yerləşdirilir, pambıq tıxacla bağlanır. Nəmləndirici ilə şüşə borular birləşdirilir və şüşə tıxaclarla bağlanır. Bobrov qabı ilə kompressor pambıq filtrlə quraşdırılır. Bütün tıxaclar kağızla bükülür və avtoklavda bir atmosfer təzyiqlə steril olunur. Sonra 1000 ml – lik iki kolbada 3% – li 700 ml. duru (1 q/l.  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ , 0,5 ml/l., B

vitaminlər kompleksi və 5 q/l. sorbit) və bərk (çörək mayası məhlulu+ 20 q sorbit+15 q aqar) qidalı mühit hazırlanır.

3 №-li adarlı mühitin hazırlanması üçün çörək mayası ilə sorbit (q.ç.i. çörək mayasının 5% – li. və 20 q/l. sorbit məhlulu) məhlulları qarışdırılır, məhlula aqar (15 q/l. ) əlavə edir, qatışıq qaynadılır, aqar əridilir, bundan 200-250 ml. götürülür, 50 ml. – lik kolbalara tökülür, avtoklavda bir atmosfer təzyiqlə steril edilir. Bu qidalı mühiddən aqarlı lövhələrin alınması üçün istifadə olunur.

Steril boksda qidalı mühit Petr qablarına tökülür, mühit soyuyur, bərkidir və aqar lövhələri alınır. Mikrobioloji tədqiqatlarda bu lövhədən koloniyaların sayılması üçün geniş istifadə edilir.

**Təcrübənin qoyulması.** Steril boksda bakteriyaların becərilməsi üçün qurğu (şəkil 3) quraşdırılır.



Şəkil 3. Kompessor və nəmləndirici ilə bakteriyaların dərin becərilməsi üçün qabların birləşmə sxemi

1-qidalı mühit, 2-məsəmali dibli şüşə qablar, 3-nəmləndirici (Bobrov qabı), 4-pambıq filtr, 5-kompessordan hava.

3 №-li qidalı mühit (0,4 mq/l. pantoteinat kalsium və tiamin) vitaminlərlə zənginləşdirilir, steril olunur, 1,0 ml. nümunə məhlulları borulara keçirilib kolbalara əlavə edilir, qurğu termostata yerləşdirilir, nəmləndiricidən havanın verilməsinin təmin edilməsi üçün qablar borular vasitəsi ilə kompressarla birləşdiri-

lır. Borudan keçən hava cərəyanının sürəti 1 ml. qidalı mühitə görə təyin edilir və 3-4 ml / dəq. ilə ölçülür.

**Alınanların qeyd edilməsi.** Təcrübənin gedişində (-0; 4; 8; 12; 24; 36; 48; 52..., saat) fərdi nümunələr təhlil olunur. Bunun üçün inkişaf etmiş müxtəlif koloniyalardan steril pipetka ilə 10 ml. götürülür, boş steril kolbaya yerləşdirilir, qarışdırılır, bundan da steril pipetka ilə 1 ml. götürülür, canlı hüceyrələr sayılır və biokütlə təyin olunur. Canlı hüceyrələrin sayı aqarlı lövhədə aparılan “səthi becərmə” metodu ilə təyin edilir, onların kütləsi nefelometriya üsulu ilə ölçülür, quru çəkisi (q.ç.i.) hesablanır. Bakteriyaların inkişaf mərhələləri ilə ifadə olunan sayı və fizioloji aktivliyindən asılı olan kütləsi (q.ç.i.) müəyyən olunur, alınanlar qeyd olunur və cədvəllər (cədvəl 7) tərtib edilir.

**Cədvəl 7.** Dərin becərmələrin bakteriyaların inkişaf dinamikasına təsiri

İnkişaf mərhələləri	Biokütlə		Mütləq çəki, I*	Xüsusi çəki, μ	Artırılmış zamanla biokütlə, mq / dəq.
	Optiki sıxlıq n.ş. / v	ml / mq.			

Cədvəldən görünür ki, alınanlar bakteriyaların inkişaf mərhələləri üzrə biokütləsi (q.ç.i.) zamanla ifadə olunur və hüceyrələrin sayını əks edir.

## §2. Bakteriyalarda oksigenin mənimsənilməsi

Bütün canlılar kimi bakteriyalar da böyüyür, mərhələlər üzrə inkişaf edir, coxalır və digər orqanizmlər kimi oksigeni mübadilə edir, onu udur və tənəffüs edir. Oksigen isə hüceyrələrin bioloji aktivliyini və onun intensivliyini təmin edən əsas biogen elementlərdən biridir.

Lakin bütün mikroorqanizmlər oksigeni eyni deyil, müxtəlif formada qəbul edir və ona münasibətinə görə fərqlənir. Bu xüsu-

\* 100 quru çəki ilə

siyyətinə görə onlar aerob və anaerob mikroorqanizmlərə bölünürlər.

Bakteriyaların inkişaf mərhələlərinin laq və loqarifm fazasında oksigenin udması daha yüksək və effektiv olur.

Bakteriyalarda oksigenin udulma prosesinin öyrənilməsi üçün hərəkətsiz hüceyrələrdən istifadə olunur. Bu hüceyrələrdən suspenziya alınır və nümunə məhlullar hazırlanır.

### **Tapşırıq. Hüceyrələrdə oksigenin mənilsənilməsi.**

Bu tapşırığın yerinə yetirilməsi üçün bakteriyaların sorbiti oksidləşdirmək qabiliyyətinə malik olan hərəkətsiz hüceyrələrdən istifadə olunur və fərdi nümunələr hazırlanır.

**Təcrübənin sxemi.** Laq və stasionar fazasında bakteriyaların yuyulmuş hüceyrələrindən fərdi nümunələr götürülür, suspenziya hazırlanır və tənəffüs substratı kimi sorbitdən istifadə edilir. Hərəkətsiz hüceyrələrdə sorbitin oksidləşməsi prosesində udulan oksigenə görə tənəffüsün intensivliyi təyin edilir.

### **Qablar və reaktivlər.**

1. Bakteriyaların dərin becərilməsi üçün boru -1 ədəd;
2. 100 ml – lik Mor pipetka – 4 ədəd;
3. 1 və 2 ml – lik pipetka – 2 və 4 ədəd;
4. 1000; 500; 100; 50 ml – lik kolba – 1; 6; 6; 6; 1 ədəd;
5. Aliminium lövhə (susenziyanın quru çəkisini təyin edilməsi üçün əyilmiş aliminium lövhə) –12 ədəd;
6. Eksikator (fosfor anhidridi və ya qatı sulfat turşusu ilə);
7. Sorbit, amonium sirkə turşusu, “B” vitaminlər kompleksi, vitaminli məhlullar: pantoteinat (10 mq / %), tiamin (10 mq / %), bufer sisteminin komponentləri, NaCl.

**Təcrübənin qoyulmasına hazırlıq.** Bakteriyaların dərin becərilməsi üçün borular, nəmləndiricilər və filtrlər hazırlanır və steril edilir. 1000 ml – lik kolbada 700 ml – lik 3N<sub>2</sub>-li qidalı mühit, iki 500 ml – lik kolbanın hər birində 400 ml. fizioloji məhlul (0,85 % – li NaCl məhlul) hazırlanır və avtoklavda bir atmosfer təzyiqlə steril edilir. Aliminium lövhələr quruducu şkafda 102-105<sup>0</sup> hərarətdə yerləşdirilir, dəqiq və sabit çəki alana qədər qurudulur.

**Təcrübənin qoyulması.** Kolbalara 3 №-li qidalı mühit tökülür, vitaminli məhlullar daxil edilir və 1 ml. nümunə məhlul əlavə edilir. Bakteriyaların dərin becərilməsi üçün istifadə olunan qablar pambıq filtrlə quraşdırılmış nəmləndirici borularla birləşdirilir, qurğu 30<sup>0</sup> hərarətdə termostata yerləşdirilir və qidalı mühitə hava cərəyanının daxil olması üçün kompressorla birləşdirilir. Böyümənin loqarifim fazasında steril pipetka ilə 100 ml. nümunə götürülür və 2 ədəd 500 ml – lik steril kolbaya daxil edilir. Kulturenin boruda qalan digər hissəsi çoxalmanın stasionar fazasında maksimum həddə çatana qədər saxlanılaraq inkişaf edir. Fərdi nümunələr loqarifim fazasının başlanğıcında və stasionar inkişaf mərhələsindən götürülür, suspenziya hazırlanır, sentrafuqa edilir və bakteriya kütləsi kultural mühitdən ayrılır, alınmış kütlə yuyulur və 3-10 ml. fizioloji məhlulə resuspenziya edilir, quru çəkisi təyin edilir. Bu kütlədən 0,5-0,6 ml. götürür, lövhələrə yaxılır, quruducu şkafa yerləşdirilir, 102-105<sup>0</sup> hərarətdə qurudulur, dəqiq və sabit çəki alınana qədər təcrübə davam etdirilir. Alınan ədədlər hesablanır, hüceyrələrin quru kütləsi təyin olunur.

Beləliklə:

$$H_1 = S_1 - F_1$$

$H_1$  - hüceyrə kütləsinin quru çəkisi,  $S_1$  - suspenziyanın quru çəkisi,  $F_1$  - fizioloji məhlulun çəkisi

Görünür ki, hüceyrələrin quru çəkisi suspenziya ilə fizioloji məhlulun və fizioloji məhlulun miqdarı arasındakı fərqi görə müəyyən edilir.

Bakteriyaların müxtəlif inkişaf mərhələlərin ( $pH = 4,6$ ) hazırlanmış suspenziyadan 0,5-1,0 ml. (1 ml. məhlulda bakteriyaların quru çəki 0,5-1,0 mq.) götürülür, 25 ml. sorbitli (0,25 M.) məhlulla əlavə olunur və nisbətən durulaşdırılmış məhlul alınır, bu məhluldan 2 ml. götürülür, Varburq borusuna daxil edilir və ayrılan oksigenin miqdarı ölçülür. Ölçmələrə monometr üsulu ilə aparılır və alınanlar diaqram halında göstərilir, Monometr loqarifim fazasının başlanğıcında və stasionar inkişaf mərhələsində

hələnin maksimum həddində 1 saata 1 *mq.* quru çəkisi olan bakteriya kütləsi tərəfindən udulan oksigenin miqdarını əks edir və göstəricilər mikrolitrlə (*mkl.*) ifadə olunur.

### **§3. Bakteriyaların hüceyrələrində sorbitin sorbozaya oksidləşməsi**

Bakteriyalarda maddələr və enerji mübadiləsini tənzimləyən fermentlərin aktivliyi karbohidratlar daha çox asıdır. Bu maddələr hüceyrələrdə kimyəvi çevrilmələrə məruz qalır, o cümlədən bir sıra maddələr əmələ gəlir, sorbit isə sorbozaya çevrilir.

**Tapşırıq. Bakteriya hüceyrələrində oksidləşmə aktivliyinin təyin edilməsi.** Bakteriya hüceyrələrində oksidləşmə aktivliyinin təyin edilməsi loqarifm və stasionar fazada yuyulmuş hüceyrələrdən nümunələr hazırlanır və təhlil edilir, sorbitin oksidləşməsi nəticəsində əmələ gələn reduksiyaedici və onların miqdarı təyin olunur.

#### **Reaktivlər və qablar:**

1. 1000; 500; 250; 100 *ml* – *lik.* kolba-1; 2; 4; 4 ədəd;
2. Şüşə boru - 1 ədəd ;
3. Yeləncək-1 ədəd;
4. 1; 2; 5 *ml* – *lik.* pipetka – 8; 4; 4 ədəd;
5. Aliminium lövhə -6 ədəd;
6. Eksikator (qatı sulfat turşusu və ya fosfor anhidridi ilə)- 1 ədəd
7. Ammonium sirkə turşusu, sorbit, “B”-qrup vitaminlər kompleksi, vitaminli məhlullar; (10,0 *mq.*% pantoteinat kalsium, 10,0 *mq.*% tiamin), bufer məhlulunun komponentləri, NaCl.

**Təcrübənin qoyulmasına hazırlıq.** Bakteriyaların dərin becərilməsi üçün şüşə boru, nəmləndirici, filtr, 3 №-li qidalı mühit və fizioloji məhlul hazırlanır. Bakteriya hüceyrələrində oksidləşmə aktivliyinin təyin olunması üçün 0,25 *M.* sorbitli

məhlulundan ( $pH = 4,6$ ) istifadə edilir. Bu məhlul aşağıdakı qayda ilə hazırlanır. 50 ml. 0,5 M. sorbitli məhluldan götürülür və distillə suyu ilə qarışdırılır. 25 ml. məhlul 100 ml –lik iki ədəd kolbaya tökülür. Sonra 50 ml. bufer ( $pH = 4,6$ ) məhlulu hazırlanır və məhlullar avtoklavda steril edilir.

25 ml. 0,5M. sorbitli məhlula 25 ml. bufer məhlulu əlavə edilir və iki hissədən ibarət olan 50 ml. 0,25 M. sorbitli məhlul ( $pH = 4,6$ ) alınır. 500 ml. –lik 2 ədəd kolbada 800 ml. (2x400ml.) fizioloji məhlul hazırlanır.

Aluminium lövhələr termostata yerləşdirilir, dəqiq və sabit çəkisi alınana qədər qurudulur. Suspenzyanın quru çəkisi təyin edilir, hesablamalar aparılır.

**Təcrübənin qoyulması.** Steril boksda qurğu (şəkil 3) quraşdırılır. 700 ml. qidalı mühitə vitaminli məhlullar, və 1,0 ml. nümunə məhlul əlavə olunaraq və becərilir və boruya keçirilir, qurğu termostata yerləşdirilir və kompressorla birləşdirilir.

Nümunələr loqarifm və ya stasionar mərhələyə qədər becərilir. Fərdi nümunələr götürülür, sentrafuqa edilir, bakteriyalar mühütdən ayrılır, qalıq kütlə yuyulur və fizioloji məhlulla resuspenziya edilir. Bu suspenziyadan 0,5-1,0 ml. götürülür, üzərinə 20 ml. 0,25 M. sorbitli məhlula ( $pH = 4,6$ ) əlavə edilir. Kolbalar  $30^0$  hərarətdə 1-2 saat yeləncəyə (100-120 dövr/dəqiqə) yerləşdirilir, 2 saatdan sonra götürülür 10 dəqiqə (4000 dövr/dəqiqə) sentrafuqa edilir, reduksiyaedici maddələr ayrılır və bu maddələrin miqdarı Bertran metodu ilə təyin edilir. Qeyd etmək lazımdır ki, adətən 1 ml. suspneziyada olan hüceyrələrin quru çəki  $\approx 15,0-20,0$  mq. olur.

**Alınanların qeydə alınması.** Alınanlar bir saata 1 ml. 0,25 M. sorbitli ( $pH = 4,6$ ) məhlulda əmələ gəlmiş 1 mq. bakteriyanın quru çəkisinə sərf olunan sorbozanın miqdarını göstərilir.

## IV FƏSİL MİKROORQANİZMLƏRİN SAYININ TƏYİN EDİLMƏSİ

Mikroorqanizmlərin sayının və növ tərkibinin təyin edilməsi üçün bir sıra üsullar vardır. Klassik üsullara və müasir texnologiyalara əsaslanar təhlil qaydaları mikrobioloji tədqiqatlarda geniş istifadə olunur.

**1. Vahid sahədə inkişaf edən müxtəlif növ bakteriaların sayılması.** Bu metodlarla canlı hüceyrələr hesablanır, ümumi sayı təyin edilir və bunun üçün aşağıdakı işlər yerinə yetirilir.

**1.1. Canlı hüceyrələrin hesablama kamerası ilə sayılması.** Canlı bakteriyaların sayılması üçün Perfeliyev hesablama kamerası, preparatlar, lüminesent mikroskopu və elektron hesablayıcılarından istifadə edilir. Fərdi nümunələrdən ardıcıl durulaşdırılmış nümunə məhlullar alınır, qidalı mühitlər hazırlanır. Nümunə məhlullar duru və quru qidalı mühitlərdə becərilir, bərk mühitlərdə səthi və dərin becərmələr aparılır.

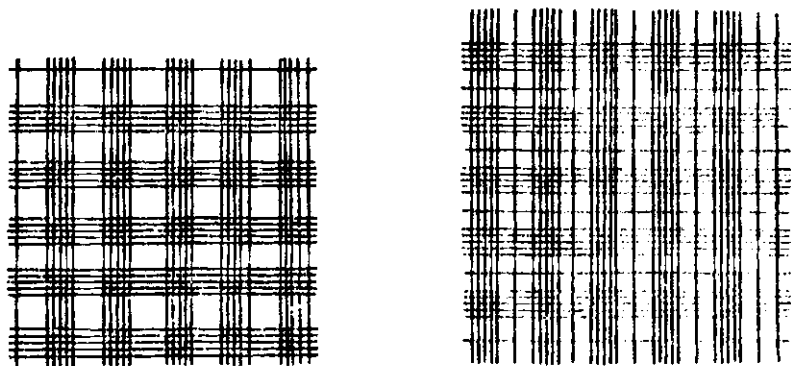
**1.2. Biokütlənin təyin edilməsi.** Bakteriyaların biokütləsi hüceyrələrin sayı və ölçülərinə görə hesablanır. Bunun üçün canlı hüceyrələrin sayı müəyyən olunur, ölçüləri təyin edilir. Bəzən vahid sahədə əmələ qələn zülalın miqdarına görə də biokütlənin çəkisi müəyyən edilir. Bəzi hallarda biokütlə azot və fosforun miqdarına görə təyin olunur. Əksər hallarda biokütlənin çəkisi nefelometriya üsulu ilə təyin edilir. Bu zaman 1 mq. biokütlənin quru çəkisi və ya 1mq əmələ gələn zülalın miqdarı ilə cihazın göstəriciləri arasında yaranmış asılılığa görə hesablanır. Alınanlara görə kalibr əyrisi qurulur və ya cədvəl tərtib olunur.

### § 1. Mikroorqanizmlərin ümumi sayının hesablanması

Bütün mikroorqanizmlər kimi, bakteriyaların ümumi sayının hesablanması üçün müxtəlif klassik və müasir metodlalar mövcuddur.

**Bakteriyaların hesablama kamerası ilə sayılması.** Hazırda müxtəlif tipli hesablama kameraları (Steysa, Toma, Qoryayeva, Klyuçarevski və s.) vardır və onlar kvadratların düzülüşünə görə fərqlənir.

Hesablama kamerası böyük və kiçik kvadratlardan və hündürlüyü  $0,1\text{mm}$ . çökək mərkəzə malik olan qalın əşya şüşəsindən ibarətdir. Əşya şüşəsinin dibinə kvadratlardan ibarət olan tor (*şəkil 4*) yerləşdirilmiş, böyük kvadratlar 16 kiçik kvadrata bölünmüş, kiçik kvadratların tərəfləri  $1/20\text{mm}$ .-dir.



Şəkil 4. Qoryayev hesablama kamerasının torları

Hesablama kameraları tipindən asılı olmayaraq kiçik kvadratların sahəsi eyni olub ( $1/20 \times 1/20 = 1/400\text{mm}^2$ )  $1/400\text{mm}^2$  -dir. Hesablama kamerasının torlu oyuğu cilalanmış şüşə ilə örtülür. Bu zaman örtücü şüşəni əks tərəfə hərəkət etdirsək Nyuton həlqəsi əmələ gəlir, örtücü şüşə ilə əşya şüşəsi möhkəm yapışır, torlu oyuq tam örtülür. Sonra isə örtücü şüşə ilə torun arasında qalan hissəyə ehtiyatla damcı şəklində tədqiq olunan nümunə məhlul daxil edilir. Hesablamalara görə torlu oyuğun dərinliyi  $1/10\text{mm}$ . və bir kiçik kvadratının sahəsi  $1/400\text{mm}^2$  olub, kiçik kvadratda yerləşən mayenin həcmi ( $M_n$ ) təyin edilir.

$$400\text{mm}^2 \times 1/10\text{mm} = 1/4000\text{mm}^3 = 1/4000000\text{sm}^2 \\ = 1/4 \cdot 10^6\text{sm}^3 \text{ və ya } = 1/4 \cdot 10^6\text{ml}$$

Hesablama kamerasına ( $pH = 7,5$ ) hüceyrələrin aqlütinasiya olunmaması (0,85 % – *li* natrium xlorid) və bakteriyaların çoxalmaması üçün (10% – *li*  $H_2SO_4$  və ya 0,5% – *li* formalin) məhlullar daxil edilir. Kiçik kvadratlara daxil edilmiş nümunə məhlullarında hüceyrələrin sayı  $\approx 5-15$  olmalıdır. Bunun üçün fərdi nümunələrin nisbətən yüksək durulaşma dərəcəsinə malik olan nümunə məhlullarından istifadə olunur. Hüceyrələrin dəqiq sayının təyin edilməsi üçün kameranın üst səthi örtücü şüşə ilə möhkəm örtülür.

1 ml fərdi nümunədə olan bakteriyaların ümumi sayı aşağıdakı qayda da hesablanır. 3-4 dəfə təkrar olaraq hesablama kamerasının beş böyük ( $5 \times 16 = 80$  kiçik kvadrat) kvadratında olan bakteriyalar sayılır və kiçik kvadratlarda tapılmış hüceyrələrin orta ədədi sayı ( $\bar{N}$ ) müəyyən edilir.  $\bar{N}$ -nin qiymətini bilərək  $1 \text{ sm}^3$  olan hüceyrələrin ( $V = 1/4 \times 10^6 \text{ sm}^3$ ) sayı müəyyən edilir və tənəsüb qurulur:

$$1/4000000 \text{ sm}^3 - \bar{N} \text{ hüceyrə}$$

$$X - \bar{N} \text{ hüceyrə}$$

$$X = \frac{1 \cdot N}{1/4000000} = \bar{N} \cdot 4000000 \text{ ml.}$$

Qeyd edək ki, mikroskopda baxılması üçün istifadə olunan kameradakı nümunə məhlullar fərdi nümunələrdən “k” dəfə fərqlənir və aşağıdakı formul ilə ifadə edilir:

$$c = \frac{\bar{N}}{v} \cdot k, \quad (7)$$

burada  $C-1 \text{ sm}^2$  səthdə tapılan hüceyrələrin sayı,  $\bar{N}$  - bir kiçik kvadratda olan məhlulda hüceyrələrin orta sayı,  $k$  - məhlulların durulaşma nisbətidir.

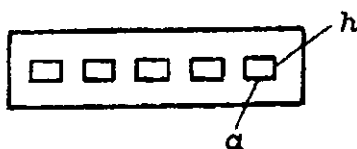
**Nümunənin hesablanması.** Fərz edək ki, fərdi nümunələr 100 dəfə durulaşdırılmış və 80 kiçik kvadratda 160 hüceyrə tapılmışdır. Hesablamalara görə hər kiçik kvadrata iki hüceyrə ( $\bar{N} = 2$ ) olmuşdur.

Məlumdur ki, kiçik kvadratin sahəsi ( $\nu$ )  $1/4 \times 10^6 \text{ sm}^3$  – dir .  
Alınanları formulda yerinə qoyaraq:

$$C = \frac{N}{\nu} \cdot k = \frac{2}{1/4 \cdot 10^6} \cdot 100 = 2,4 \cdot 10^6 \cdot 10^2 = 8 \cdot 10^8 \text{ kl/ml}$$

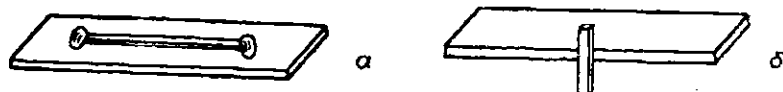
Nəzərə almaq lazımdır ki, kameranın dibi kifayət qədər ( $1/100$  və ya  $100mk.$ ) dərinidir, lakin bəzi bakteriyaların ölçüləri çox kiçik olduğu üçün əşya şüşəsinin dibinə keçir və görmə sahəsindən uzaqlaşır. Onlar mikroskopda görünmür, səhvə yol verilir və alınan nəticələr qənaətbəxş hesab olunmur. Bu tipli hesablama kameralarında yosunların, maya və sporlu göbələklərin və s. bu kimi nisbətən böyük ölçülərə malik olan mikroorqanizmlərin sayılması çətinlik törədir. Ümumiyyətlə hüceyrələrin sayılması üçün hesablama kameralarına daxil olunan nümunə məhlulların durulaşma dərəcəsi nisbətən yüksək və örtücü şüşələrin qalınlığı kifayət qədər nazik olmalıdır.

**Perfeliev hesablama kapilyarlarında hüceyrələrin sayılması.** Perfeliev hesablama kapilyarı hüceyrələrin sayılması üçün bir sıra üstün cəhətlərə malikdir. Belə ki, kapilyarlara daxil edilən fərdi nümunələrdə olan hüceyrələr mikroskopda aydın görünür və onların birbaşa sayılması mümkündür. Perfilyev hesablama kamerası düzbucaqlı tora malik olan kapilyar (1-5 ədəd) kanallardan (*şəkil5*) təşkil olunmuş yastıparalel nazik şüşə lövhədən ibarətdir.



*Şəkil 5.* B.V.Perfilevin hesablama kamerası. Kanalların en kəsiyinin görünüşü: a - kapilyar kanalın eni, h - kapilyar kanalın hündürlüyü

Təcrübədən əvvəl kapilyar kanalın hündürlüyü və eni təyin edilir, lövhə düzbucaq şəkilində kəsilir, kapilyarın kəsiyi əşya şüşəsinin yuxarı hissənin yan tərəfinə (*şəkil 6*) plastilinlə yapışdırılır.



Şəkil 6. B.V.Perfilevin hesablama kamerası.

a- Əşya şüşəsində ümumi görünüşü, b- kanalın uzunluğunun və eninin ölçülməsi üçün əşya şüşəsinə yapışdırılmış kapilyarın kəsiyi

Sonra şüşələr əşya masasına bərkidilir, kondensor aşağı endirilir, mikroskopun (əvvəl  $\times 8$ , sonra  $\times 40$ ) böyüdücüləri ilə baxılır və lövhələrdə köndələn yerləşmiş kapilyarlar tapılır. Okulyar mikrometrin köməyi ilə kanalların hündürlüyü ( $h$ ) və eni ( $a$ ) ölçülür, orta ədədi qiymətlər hesablanır. Kanalın uzunluğu isə mikroskopun böyüdücüsünə uyğun olan görmə sahəsinin diametrinin ( $d$ ) cəminə görə hesablanır. Buna görə də “ $h$ ” və “ $a$ ” ilə yanaşı “ $d$ ”-də təyin olunur. “ $d$ ”-ni təyin etmək üçün okulyar mikrometrdən istifadə olunur. “ $d$ ”, “ $h$ ” və “ $a$ ”-nın qiymətlərinin tapılması üçün lövhə 3-5 hissəyə bölünür.

Tədqiq olunan fərdi nümunələr qarışdırılır, “ $k$ ” dəfə durulaşdırılır və kapilyar borulara daxil edilir. Sonra lövhənin hər iki tərəfi möhkəm silinib təmizlənir, kəsiklər əşya şüşəsinin üst səthinə düzülür. Lövhənin şüşəyə yapışmaması və kanalın daxilində olan mayenin qurumaması üçün şüşənin üst səthinin yan tərəfindən bir damla əridilmiş parafin əlavə olunur və ya plastilinlə bərkidilir. Sonra preparat ( $\times 40$  və ya  $\times 90$ ) mikroskoplanır və 50-100 görmə sahəsində olan bakteriyalar sayılır. Bakteriyaların ümumi sayına görə vahid görmə sahəsi üçün hüceyrələrin orta ( $N$ ) sayı müəyyən edilir.

$$\bar{N} = \frac{T}{n}$$

burada  $T$  -hüceyrələrin ümumi sayı,  $n$  - görmə sahəsinin cəmi,  $N$  -hüceyrələrin orta ədədi qiyməti və bu kəmiyyətlər isə “ $a \cdot h \cdot d \text{ mm}^3$ ” cəminə bərabərdir.

Burada “*h*” kapilyarların hündürlüyü, “*a*” kapilyarların eni, “*d*” isə görmə sahəsinin diametrinə bərabər olan kəsiyinin uzunluğunu göstərir.

0,5 ml. nümunə məhlulunda olan bakteriyalarının sayına nəzərən 1 ml. fərdi məhluldakı hüceyrələrin ümumi sayı təyin edilir və aşağıdakı tənliklə ifadə edilir. Beləliklə:

$$“a \cdot h \cdot d” — \bar{N}$$

$$1000 \text{ mm}^3 — X \quad X = \frac{N \cdot 1000}{a \cdot h \cdot d} \cdot k$$

*X* - 1 ml. fərdi nümunədə tapılan hüceyrələrin ümumi sayı; *k* - durulaşma dərəcəsi; *N* - 1 mm görmə sahəsində olan “nümunə məhlullar”dakı hüceyrələrin orta sayı; “*a*”görmə sahəsində olan kapilyarın eni, “*h*”görmə sahəsində olan kapilyarın hündürlüyü; “*d*” - mikroskopun böyüdücüsünə görə görmə sahəsinin diametri.

**Alınanların hesablanması.** Okulyar mikrometrin (şək.7, 8) bölgələrinə görə kapilyarın hündürlüyü, eni və görmə sahəsinin diametri təyin edilir.

Okulyar mikrometrin x 40 böyüdücüsünə (bir bölgü=3 mk.) görə kapilyarın eni 17 (*a*=17 x 3=51 mk.=0,051 mm.), hündürlüyü 10 (*h*=10 x 3=30 mk.=0,03 mk.), görmə sahəsinin diametri isə 86 (*d*=86 x 3=258 mk.=0,26 mm.) bölgüyə uyğun gəlir.

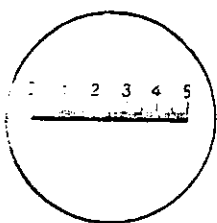
Fərz edək ki, fərdi nümunələr *k* (*k*=100) dəfə durulaşdırılmış, 50 görmə sahəsinə (*n*=50) baxılmış və hüceyrə tapılmışdır. Bakteriyaların sayına nəzərən orta ədədi qiymət ( $\bar{N}$ =70) 70-dir.

$$\bar{N} = \frac{3500}{50} = 70 \text{ hüceyrə}$$

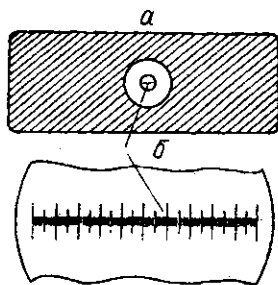
Alınanları aşağıdakı düsturda yerinə qoyaraq, 1ml fərdi nümunəli olan bakteriyaların sayı tapılır.

$$x = \frac{N \cdot 1000}{a \cdot h \cdot d} = \frac{70 \cdot 1000 \cdot 100}{0,051 \cdot 0,26 \cdot 0,03} = 19,0 \cdot 10^6 \text{ kl/ml.}$$

Okulyar mikrometr (şəkil 7) mərkəzinə 5 mm və 50 hissəyə bölünmüş xətkəş olan dairəvi şüşə lövhədən yerləşdirilmiş və bölgünün ölçüləri obyektiv mikrometrlə təyin olunur.



Şəkil 7. Okulyar mikrometr  
(5 mm. 50 hissəyə bölünmüşdür)



Şəkil 8. Obyektiv mikrometr  
a - ümumi görünüşü -  
b - obyektiv mikrometrin  
bölgüləri

Obyektiv mikrometr (şəkil 8) mərkəzinə 100 hissəyə bölünmüş 1 mm –lik şüşə xətkəş yerləşmiş metal lövhədən ibarət olub mikroskopun masasına bərkidilmişdir. Şüşə xətkəşin bir bölgü 0,01 mm və ya 10 (1 mk. = 10mm. 10) mk -dir.

Əşya şüşəyə bir damla immersiya yağı əlavə edilir və mikroskopun görmə sahəsində obyektiv mikrometrin xətkəşi tapılır, okulyar mikrometrin yuxarı linzasını buraraq xətkəşin üzərində yerləşdirilir, mikrometr aşağı endirilir və yenidən linzaları buraraq bölgülər uyğunlaşdırılır, sayılır, müqayisə edilir və əmsal hesablanır, xətkəşin ölçüləri təyin edilir.

Fərz edək ki, obyektiv mikrometrin beş bölgüsü okulyar xətkəşin 10 ədədinə uyğun gəlmiş, obyektiv mikrometrin bir bölgüsü 10 mk. olub, beş 50 ( $10 \times 5 = 50$ ) mk. -dur, müqayisədə okulyar xətkəşin bir bölgüsü ( $50:10=5$ ) 5 mk. -dur.

Hesablamalar göstərir ki, mikroskoplar tipindən asılı olaraq müəyyən “uyğunlaşma əmsalına” malikdir və bu əmsal okulyar və obyektiv mikrometrlərin uyğun göstəricilərinə əsasən təyin edilir. “Uyğunlaşma əmsalı” sabit kəmiyyətdir, mikroskoplar uyğunlaşma əmsalına görə qeydiyyatata alınır, laboratoriyada saxlanılır, mikrobioloji tədqiqatların yerinə yetirilməsi üçün bu əmsallardan istifadə edilir.

**I nümunə. Torlu kapilyar kəsiklərinin hündürlüyü və uzunluğunun ölçülməsi.** Mikroskopla okulyarın x 15 və obyektiv

tivin  $\times 40$  böyütməsinə görə (*şəkil 5*) kapilyarların şüşə lövhə üzərində köndələn kəsikləri tapılır və okulyar mikrometr əksin üzərinə qoyulur və xətkəş kəsiklərinə yerləşdirilir, kapilyarın hündürlüyü və eni ölçülür, xətkəşin bölgüləri sayılır.

Fərz edək ki, kapilyarın hündürlüyü ( $h$ ) 20, eni ( $a$ ) isə 40 bölgüyə uyğun gəlmiş və uyğunlaşma əmsalına görə xətkəşin bir bölgüsünün ölçüsü  $4mk.$  -dur. Bu kəmiyyətə görə kapilyarların eni və uzunluğu təyin edilir. Xətkəşin 20 bölgüsünə uyğun olan kapilyarın hündürlüyü  $8mk.$ , eni isə  $0,16mm$  -dir.

$$\text{Beləliklə: } h = 20 \times 4 = 80mk.;$$

$$a = 40 \times 4 = 160mk. = 0,16mm.$$

## **II nümunə. Mikroskopunda görmə sahəsi və onun diametrin təyin edilməsi.**

Mikroskopun görmə sahəsindən asılı olaraq okulyar mikrometrin köməyi ilə xətkəşin kəsiklər üzərində yerləşən bölgülərinin sayına müvafiq olan əmsal təyin olunur. Əmsala görə görmə sahəsinin diametri təyin edilir və diametrə nəzərən səthin radiusu tapılır. Görmə sahəsinin səthi isə  $\pi^2$ -la hesablanır.

Fərz edək ki, mikrometrlərin ( $\times 90$  və  $\times 15$ ) böyütməsinə görə nizamlanmış xətkəşin bir dərəcəsinin uyğunlaşmış əmsalı  $1,5mk.$  olmuş və görmə sahəsinin diametri okulyar xətkəşin 65 bölgüsünə uyğun gəlmişdir. Bu göstəricilərə görə görmə sahəsinin diametri  $97,5mk.$ , radiusu  $48,7mk.$  olub, səthi isə  $0,0075mm^2$  olaraq alınanlar aşağıdakı kimi hesablanır.

Beləliklə:

$$d = 65 \cdot 1,5 = 97,5mk. ; r = 97,5mk. ; 2 = 48,7mk.$$

$$\pi^2 = 3,14 \cdot 48,7^2 = 3,14 \cdot 2371,69 = 7447,1006mk. = 0,0075mm^2.$$

## **III nümunə. Bakteriya hüceyrələrinin ölçülərinin təyin edilməsi.**

Nümunə məhlullardan preparatlar hazırlanır və okulyar mikrometrlə ölçmələr aparılır. Mikroskopun köməyi ilə görmə sahəsinin səthində yerləşən obyektin ölçülərinə görə xətkəşin

bölgüləri təyin edilir və 50-100 hüceyrə sınaqdan keçirilir. Alınanlar hesablanır, orta qiymətlər tapılır, alınanlar təhlil edilir.

Fərz edək ki, mikroskopun uyğunlaşma əmsalı  $1,5mk.$  olub, hüceyrələrin uzunluğu ( $l=4,05mk.$ ), okulyar xetkeşin  $2,7$ , eni ( $E=1,2mk.$ ) isə  $0,8$  bölgüsünə uyğun gəlmişdir.

Beləliklə:

$$l = 2,7 \cdot 1,5 = 4,05mk. \quad E = 0,8 \cdot 1,5 = 1,2mk.$$

### **Daimi preparatların hazırlanması və bakteriyaların hesablanması.**

Mikrobioloji tədqiqatlarda daimi preparatlardan geniş istifadə olunur. Bu preparatlar üçün əşya şüşələri xüsusi qaydada hazırlanır. Bu zaman adi əşya şüşəsini millimetrlik kağız üzərinə yerləşdirilir, şüşəkəsənlə mərkəzindən yan tərəflərə doğru  $2 sm.$  hissə cızılır və səthi  $4sm^2$  -ə bərabər olan kvadrat alınır. Sonra təhlil olunan nümunə məhlulları möhkəm qarışdırılır və mikro-pipetka ilə  $0,01-0,03 ml.$  götürülür, əşya şüşəsinə köçürülür və çevrəsi cızılmış  $4sm^2$  səthə bərabər olaraq yaxılır. Yaxma steril boksda havada qurudulur, müvafiq boylarla (torpaq bakteriyaları metil göyü, hensialinviolet və erotrozinslə yaxşı boyanır) rənglənilir və spirt lampasının alovunda qurudulur. Hazırlanmış preparat mikroskopun masasına yerləşdirilir və mikroskoplanır, bakteriyalar 50-100 görmə sahəsində sayılır və orta ədədi qiymət ( $N$ ) tapılır.

Mikroskopun  $x 90$  və  $x 15$  - böyüdücləri uyğunlaşdırılır, əmsal təyin edilir, görmə sahəsinin diametri, radiusu və səthi təyin olunur, bir görmə sahəsinin orta ədədi qiymətini ( $N$ ) bilərək  $4 sm^2$  səthdəki bakteriyalar ümumi sayı hesablanır. Alınanlara görə tənəsüb qurulur və hesablanır:

Beləliklə:

$$N \text{ ————— } \pi^2$$

$$X \text{ ————— } 4 sm^2 \quad X = \frac{\bar{N} \cdot 4}{\pi^2} \cdot 4 / \pi^2$$

burada  $X$  -  $4 \text{ sm}^2$  səthdəki bakteriyaların ümumi sayı;  $\pi^2$  - görmə sahəsinin səthi;  $\bar{N}$  - bir görmə sahəsindəki bakteriyaların orta ədədi sayıdır.

Fərz edək ki,  $4 \text{ sm}^2$  səthə  $0,01-0,03 \text{ ml}$ . nümunə məhlul yerləşdirilmiş, onda  $X$  kəmiyyəti  $4 \text{ sm}^2$  səthə  $v$  qədər olan məhluldakı hüceyrələrin ümumi sayı ilə ifadə edilir.  $1 \text{ ml}$ .  $n$  - ilə ifadə olunan hüceyrələrin sayını bilərək  $1 \text{ ml}$ . fərdi nümunədə olan hüceyrələrin sayı ( $y$ ) aşağıdakı mütənasib ilə ifadə edilir.

Beləliklə:  $x$  —————  $v \text{ ml}$ .

$$y$$
 —————  $1 \text{ ml}$ .  $y = \frac{x \cdot 1}{v}$

$x$  -in qiymətini yerinə qoysaq “ $y$ ” kəmiyyəti aşağıdakı şəkildə ifadə olunur:

$$y = \frac{\bar{N} \cdot 4}{v \cdot \pi^2}$$

burada  $N$  - bir görmə sahəsindəki hüceyrələrin orta sayı,  $v - 4 \text{ sm}^2$  -a yerləşdirilmiş nümunə məhlul,  $\pi^2$  - görmə sahəsinin səthidir.

Formula  $k$  kəmiyyəti əlavə edilir və  $1 \text{ ml}$  məhlulda olan bakteriya hüceyrələrinin sayı hesablanır.

Beləliklə:

$$y = \frac{\bar{N} \cdot 4}{v \cdot \pi^2} \cdot k$$

**Məsələnin həlli.** 100 dəfə durulaşdırılmış nümunə məhlulundan  $0,03 \text{ ml}$ . götürülüb  $4 \text{ sm}^2$  səthə kvadrata köçürülmüş, preparat rənglənmiş, fiksasiyası edilmiş və 50 görmə sahəsində 2500 hüceyrə aşkar edilmişdir.

Görmə sahəsində bakteriyalar ümumi ( $2500:50=50$ ) sayına görə müəyyən olunmuş orta sayı ( $\bar{N}=50$ ) təyin edilmişdir. Okulyar mikrometrin köməyi ilə görmə sahəsinin radiusu ( $45 \text{ mk} = 0,045 \text{ mk} = 0,0045 \text{ sm}$ ) hesablanmış və onun qiyməti ( $0,0045 \text{ sm}$ )

təyin edilmişdir. Alınanlar ( $\bar{N} = 50$  hüceyrə,  $v = 0,03$  ml.,  $r = 0,0045$  sm,  $k = 100$ ) alınan qiymətləri aşağıdakı formulda yerinə qoyulur və hesablamalar aparılır:

$$y = \frac{\bar{N} \cdot 4}{v \cdot \pi^2} \cdot k = \frac{50 \cdot 4}{0,03 \cdot 3,14 \cdot 0,0045^2} \cdot 100 = \frac{20 \cdot 10^2}{18 \cdot 10^{-4}} = 1,1 \cdot 10^2$$

Hesablamalar göstərir ki, 1 ml mühidə bakteriyaların ümumi sayı  $1,1 \cdot 10^2$  olmuşdur. Verilənlərin etibarlılığı (3-4 dəfə təkrar) müəyyən edilmişdir.

### **Lüminesent mikroskopunun köməyi ilə bakteriyaların hesablanması.**

Mikrobioloji tədqiqatlarda lüminesent mikroskopundan geniş istifadə olunur. Bu mikroskopda bakteriyaların bütün (canlı, cansız hüceyrələr və s.) hüceyrələri sayılır və onları fərqləndirmək mümkündür. Bu zaman xüsusi boyalardan (füroxrom, auramin, bənövşeyi akridin və s.) istifadə olunur. Flüroxrom, ultrabənövşeyi və ya göy şüalarla işlənmiş hüceyrələr müxtəlif rənglərə flüoresensiya edirlər. Flüroxromların cüzi (1:30000; 1:40000) miqdarını bakteriyalar absorbsiya edir və hüceyrələr intensiv işıq saçır, onların nisbətən yüksək dozası (1:1000; 1:10000) bakteriosid təsir göstərir və bakteriostatik effektdə malikdir. Boyalar bakteriyalara müxtəlif təsir göstərir. Bakteriyaların bioloji xüsusiyyətləri nəzərə alınaraq boyaların durulaşmış məhlullarından istifadə olunur.

Bakteriyalar əsasən bənövşeyi akridin boyası ilə rənglənilir. Tədqiqatlara (Razumovski və Osipov 1958, Loystyanski, Plyai, Aravin 1965, 2001 və s.) görə sirkə turşulu bakteriyaları bənövşeyi akridin (1:30 000 və 1:40 000) boyası ilə rənglənilir. Bu zaman canlı bakteriyalar yaşıl rəngə lümunisensiya edir, cansız bakteriyalar isə çəhrayı və ya açıq-qırmızı işıq saçırlar.

Lüminisent mikroskopunda bakteriyaların ümumi sayının hesablanması üçün bənövşeyi akridin boyasının 1:3000-ə (10

*mq.* bənövşeyi akridin +30 *ml.* distellə su) nisbətində olan məhlulundan istifadə edilir. Bu boya mikroskoplanmada əvvəl hazırlanır və soyuducuda saxlanılır. Bu məhlulun hazırlanması üçün bənövşeyi akridin boyasının 1:100-ə nisbətli məhluldan bir damla saat şüşəsinin üzərinə tökülür və 29-39 damla distillə suyu əlavə olunur. Beləliklə bənövşeyi akridinin 1:30000 nisbətində olan məhlulu alınır. Bu məhluldan pipetka ilə 0,1 *ml* götürür, digər saat şüşəsinə keçirilir və 0,1 *ml.* nümunə məhlul əlavə edilir, möhkəm qarışdırılır, mikropipetka ilə 0,1 *ml.* götürülür, təmiz əşya şüşəsinə köçürülür, 4 *sm*<sup>2</sup> səthə bərabər paylanır və örtücü şüşə ilə örtülür. Preparatın qurumaması üçün əşya şüşəsinin kənarlarına vazelin çəkilir və ya əridilmiş parafin tökülür. Sonra flüoresensiya etməyən xüsusi yağlardan (dimetilftalat) istifadə edilərək preparat mikroskoplanır, 50 görmə sahəsindəki hüceyrələr sayılır və 1 *ml.* fərdi məhlulda olan hüceyrələrin sayı hesablanır. Bu hesablamalar preparatların mikroskopda birbaşa sayılması metodundan əsaslanaraq aparılır.

Tədqiqatın məqsədindən asılı olaraq canlı və ya cansız hüceyrələrin sayı təyin edilir. Bu zaman lüminesent mikroskopunda hüceyrələrin ümumi sayı müəyyən olunur və onların nisbəti təyin edilir. Bunun üçün mikroskopun 50 görmə sahəsindəki bakteriyaların ümumi sayı ilə yanaşı, işıq saçıq, yaşıl və qırmızı rəngə lüminensasiya edən hüceyrələrdə sayılır. Bakteriyaların ümumi sayını 100% qəbul edib canlı və ya cansız hüceyrələrin faizlə miqdarı hesablanır.

Fərz edək ki, 50 görmə sahəsində 1500 bakteriya hüceyrəsi tapılmışdır. Onların 1300 yaşıl, 200 isə narıncı rəngə flüoresensiya edir.

$$\begin{array}{l}
 1500 \text{ ————— } 100\% \\
 1300 \text{ ————— } X \quad X = \frac{1300 \cdot 100}{1500} = 87\%
 \end{array}$$

Hesablamalar göstərir ki, fərdi məhlulun 87%-ni canlı hüceyrələr təşkil edir.

## **Bakteriyaların elektron hesablayıcı ilə hesablanması.**

Mikrobioloji tədqiqatlarda bakteriyaların hesablanması üçün geniş istifadə olunan cihazlardan biri də elektron hesablayıcıdır. Bu cihazlar özünə məxsus iş prinsipinə malikdir ki, onun köməyi ilə bir neçə saniyə ərzində bakteriyaların dəqiq sayı müəyyən edilir. Cihazın iki elektrodu arasından keçən elektron seli bakteriyalara təsir göstərir, ionlar elektron selinin tezliyini dəyişdirir, bu selin dəyişmə tezliyi cihazda qeyd olunur, müvafiq göstəricilərlə ifadə edilir və bakteriyalar sayılır.

## **§2. Məhlulların ardıcıl durulaşdırılma metodu ilə canlı hüceyrələrin sayılması.**

Canlı hüceyrələrin sayının təyin edilməsi üçün bir sıra metodlar vardır. Bunlardan biri mikrobioloji tədqiqatlarda geniş istifadə edilən məhlulların ardıcıl durulaşdırılması metodudur.

Adətən fərdi nümunələr ardıcıl durulaşdırma üçün duru mühitlərdən (distilə və ya steril su, fizioloji məhlul və s.) istifadə edilir. Bunun üçün duru mühitə fərdi nümunə (9 ml. + 1 q.) əlavə olunur və 1:10 nisbətində nümunə məhlullar alınır. Bu məhlul bir neçə dəfə ardıcıl olaraq təkrar durulaşdırılır və müxtəlif nisbətdə durulaşdırılmış nümunə məhlullar (1:10; 1:100; 1:1000 və s.) alınır. Nümunə məhlullar duru qidalı mühitdə (Vinoqradski və s.) əkilir.

Sonra termostatdan çıxarılır, sınaq şüşələrinin üzərində müşahidələr aparılır. Nümunə məhlullarının durulaşma nisbətindən asılı olaraq qidalı mühitləri dəyişmiş (tündləşmiş) və dəyişməmiş (şəffaf) şüşələrin sayı müəyyən edilir. Mikrobioloji tədqiqatlarda tündləşmiş və şəffaf sınaq şüşələrin sayına görə canlı hüceyrələrin sayı təyin edilir və bunun üçün xüsusi cədvəllər vardır. Belə cədvəllərdən biri də Mak-Kredi (cədvəl 8) tərəfindən hazırlanmışdır. Bu cədvələ görə tündləşmiş sınaq şüşələrin sayına uyğun gələn ədədlər seçilir, ədədi ifadəsi müəyyən olunur və əmsallar təyin edilir.

Nümunə məhlulların ardıcıl durulaşdırılması üçün aşağıdakı işlər yerinə yetirilir.

1. Fərdi nümunələr fizioloji məhlul və ya steril su ilə ardıcıl (1-3-5-....., qat) durulaşdırılır müxtəlif nisbətli nümunə

məhlullar alınır. Bunun üçün pambıq tıxacla bağlanmış 8-10 ədəd boş sınaq şüşələri, 50-100 ml.-lik kolbalar, 10ml –lik pipetkalar, steril su və 0,85% –li. NaCl məhlulu hazırlanır. Kolbalar, pipetkalar sınaq şüşələri və məhlullar steril olunur.

4,5 -9 ml. fizioloji məhlul olan sınaq şüşələrinə 0,5 - 1,0 q. fərdi nümunə əlavə olunur. Bu qarışıq möhkəm qarışdırılır, ardıcıl olaraq bir neçə dəfə durulaşdırılır və müxtəlif nisbətli (I→ II→ III →IV →V →...və.s) nümunə məhlulları alınır. Nümunə məhlulların durulaşdırılması üçün 0,5 –1,0ml –lik. steril pipetkalardan istifadə olunur.

2. Nümunə məhlulların becərilməsi üçün duru qidalı mühitlər, sınaq şüşələri və digər ləvazimatlar hazırlanır, 3-5 dəfə təkrar olaraq qidalı mühitlərə əkilir. Bu üçün sınaq şüşələrinə müvafiq duru qidalı mühitlər daxil edilir və 0,5 - 1 ml. ardıcıl durulaşmış nümunə məhlullar əlavə edilir. Eyni durulaşma nisbətində malik olan nümunə məhlulların təkrar sınaq şüşələrinə əkilməsi üçün bir steril pipetkadan istifadə olunur. Sınaq şüşələri termostata yerləşdirilir və bir müddətdən sonra termostatdan çıxarılır, müşahidələr aparılır və müvafiq qeydlər edilir.

Qidalı mühitlərin tündləşməsi (köpük, pərdə və s. kimi əlamətlər) sınaq şüşələrində bakteriyaların inkişaf etməsini göstərir və ya əksinə mühitin şəffaf olması nümunə məhlullarında vegetativ hüceyrələrin olmamasına dəlalət edir. Əksər hallarda 1:10 və 1:10<sup>2</sup> nisbətli məhlullarla aparılan becərmələr bütün hallarda qidalı mühitlərin tündləşməsinə səbəb olur, zəif məhlullar (1:10<sup>6</sup> - 1:10<sup>8</sup> və s.) əkilmiş qidalı mühitlər demək olar ki, şəffaf qalır, orta nisbətli (1:10<sup>3</sup> - 1:10<sup>4</sup>) nümunələr isə paralel sınaq şüşələrində qidalı mühitlərin bir neçəsinin tündləşməsi, digərlərinin şəffaf qalması ilə müşahidə olunur. 1 ml. bakteriyaların həqiqi və ya ehtimal olunan sayının ədədi ifadəsi tündləşmiş sınaq şüşələrinin sayına görə müəyyən olunur və Mak-Kredi (cədvəl 8) ilə təyin edilir və müvafiq hesablamalar aparılır .

Məsələ 1. Fərz edək ki, fərdi nümunələr ardıcıl durulaşdırılmış və müxtəlif nisbətli (1:10; 1:10<sup>2</sup>; 1:10<sup>3</sup>; 1:10<sup>4</sup>) məhlullar alınmışdır. 1 ml. götürülür, 5 dəfə təkrar olaraq sınaq şüşələrindəki

qidalı mühitə əlavə edilir, inkubasiya olunur, sonra termostatdan çıxarılır. Tündləşmiş və şəffaf sınaq şüşələr ( $10^{-1} \Leftrightarrow 4$  s.ş\* ;  $10^{-2} \Leftrightarrow 2$  s.ş ;  $10^{-3} \Leftrightarrow 1$  s.ş;  $10^{-4} \Leftrightarrow 0$  s.ş.;  $10^{-5} \Leftrightarrow 0$  s.ş.) sayılır.

Nümunə məhlullar	I	II	III	IV	V
Tündləşən sınaq şüşələrinin sayı	4	2	1	0	0

Alınan 4, 2 və 1 rəqəminə görə tündləşmiş sınaq şüşələrinin ədədi ifadəsi 421-dir. Mak-Kredi cədvəlinə görə 421 ədədinə görə bakteriyaların ehtimal olunan sayının ədədlərlə ifadəsi 2,5-dir. Buradan görünür ki, 1 ml. nümunə məhlulda olan bakteriyaların sayı ( $S$ ), onların ehtimal olunan ədədi ifadəsi (2,5) ilə məhlulun durulaşma nisbətini ( $10^{-1}$ ) hasilinə bərabərdir.

Beləliklə:  $S = 2,5 \times 10 = 25$  ml./hüc.

Burada  $S$  - bakteriyaların sayı; 2,5 1 ml. nümunə məhluldakı bakteriyaların ehtimal olunan sayı ədədi ifadəsi;  $10^{-1}$  məhlulun durulaşma nisbətini göstərir.

**Məsələ 2.** Fərz edək ki, fərdi nümunələr ardıcıl durulaşdırılmış və müxtəlif nisbətlə ( $1:10$ ;  $1:10^2$ ;  $1:10^3$ ;  $1:10^4$ ;  $10^5$  və s.) məhlullar alınmışdır. Bu məhlullardan 1 ml. götürülür, 3 dəfə təkrar olaraq sınaq şüşələrindəki qidalı mühitə əlavə edilir, inkubasiya olunur. Sonra termostatdan çıxarılır, tündləşmiş və şəffaf sınaq şüşələr ( $10^{-1} \Leftrightarrow 3$  s.ş\*;  $10^{-2} \Leftrightarrow 3$  s.ş ;  $10^{-3} \Leftrightarrow 2$  s.ş;  $10^{-4} \Leftrightarrow 1$  s.ş;  $10^{-5} \Leftrightarrow 0$  s.ş.) sayılır.

Nümunə məhlullar	I	II	III	IV	V
Tündləşən sınaq şüşələrin sayı	3	3	2	1	0

Alınmış 3, 2 və 1 rəqəmlərinin ədədi ifadəsi 321-dir. Mak-Kredi cədvəlinə görə 1,5 rəqəmi ilə ifadə olunur. Buradan görünür ki, 1 ml. nümunə məhlulda bakteriyaların sayı ( $S$ ) onların ehtimal olunan ədədi qiyməti (1,5) ilə mühitin tündləşməsinə səbəb olan məhlulun durulaşma nisbətini ( $10^{-1}$ ) hasilinə bərabərdir.

Beləliklə:  $S = 2,5 \times 10 = 25$  ml./hüc

\* s.ş.- sınaq şüşələri

burada  $S$  - bakteriyaların sayı; 1,5 l *ml.* nümunə məhlulunda bakteriyaların ehtimal olunan sayı ədədi ifadəsi;  $10^{-1}$  məhlulun durulaşma nisbətindədir.

*Cədvəl 8. Mak-Kredi cədvəli*

Tündlənmiş sınaq şüşələrinin ədədi ifadəsi	Bakteriyaların ehtimal olunan sayının ədədi ifadəsi			Tündlənmiş sınaq şüşələrinin ədədi ifadəsi	Bakteriyaların ehtimal olunan sayının ədədi ifadəsi		
	3	4	5		3	4	5
000	00	00	00	300	2,5	1,1	0,8
001	0,3	0,2	0,2	301	4,0	1,6	1,1
002	-	0,5	0,4	302	6,5	2,0	1,4
003	-	0,7	-	303	-	2,5	-
010	0,3	0,2	0,2	310	4,5	1,5	1,5
011	0,5	0,5	0,4	311	7,5	2,0	1,4
012	-	0,7	0,5	312	11,5	3,0	1,7
013	-	0,9	-	313	16,0	3,5	2,0
020	0,6	0,5	0,4	320	0,5	2,0	1,4
021	-	0,7	0,6	321	15,0	3,0	1,7
022	-	0,9	-	322	20,0	3,5	2,0
030	-	0,7	0,6	323	30,0	-	-
031	-	0,9	-	330	25,0	3,0	1,7
040	-	0,9	-	331	45	3,5	2,0
041	-	1,2	-	332	110,0	4,0	-
100	0,4	0,3	6,2	333	140,0	5,0	-
101	0,7	0,5	0,4	340	-	3,5	2,0
102	1,1	0,8	0,6	341	4,5	2,5	-
103	-	1,0	0,8	350	-	2,5	-
110	0,7	0,5	0,4	400	2,5	1,3	-
111	1,1	0,8	0,6	401	3,5	1,7	-
112	-	1,1	0,8	402	5,0	2,0	-
113	-	1,3	-	403	7,0	2,5	-
120	1,1	0,8	0,5	410	3,5	1,7	-
121	1,5	1,1	0,8	411	5,5	2,0	-
122	-	1,3	1,0	412	8,0	2,5	-
123	-	1,6	-	413	11,0	-	-
130	1,6	1,1	0,6	414	14,0	-	-
131	-	1,4	1,0	420	6,0	2,0	-
132	-	1,6	-	421	9,5	2,5	-
140	-	1,4	1,1	422	13,0	3,0	-

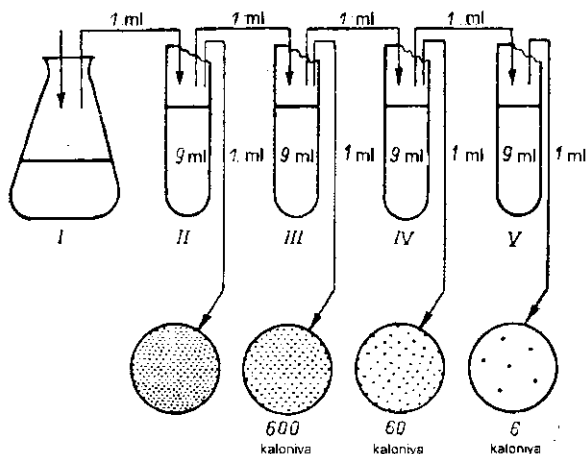
141	-	1,7	-	423	17,0	-	-
200	0,9	0,5	0,5	424	20,0	-	-
201	1,4	0,9	0,7	430	11,5	2,5	-
202	2,0	1,2	0,9	431	16,5	3,0	-
203	-	1,6	1,2	432	20,	4,0	-
210	1,5	0,9	0,7	433	30,0	-	-
211	2,0	1,3	0,9	434	35,0	-	-
212	3,0	1,6	1,2	440	25,0	3,5	-
213	-	2,0	-	441	40,0	4,0	-
220	2,0	1,3	0,9	442	-	70,0	-
221	3,0	1,6	1,2	443	-	140,0	-
222	3,5	2,0	1,4	444	-	160,0	-
223	4,0	-	-	450	-	-	4,0
230	3,0	1,7	1,2	451	-	-	5,0
231	3,5	2,0	1,4	500	-	-	2,0
232	4,0	-	-	501	-	-	3,0
240	-	2,0	1,4	502	-	-	4,0
241	-	3,0	-	503	-	-	6,0
504	-	-	7,5	533	-	-	17,5
510	-	-	3,5	534	-	-	20,0
511	-	-	4,5	535	-	-	25,0
512	-	-	6,0	540	-	-	13,0
513	-	-	8,5	541	-	-	17,0
520	-	-	5,0	542	-	-	25,0
521	-	-	7,0	543	-	-	30,0
522	-	-	9,5	544	-	-	35,0
523	-	-	12,0	545	-	-	45,0
524	-	-	15,0	550	-	-	25,0
525	-	-	17,5	551	-	-	35,0
530	-	-	8,0	552	-	-	60,0
531	-	-	11,5	553	-	-	90,0
532	-	-	14,0	554	-	-	100,0
				555	-	-	180,0

### **Canlı hüceyrələrin bərk qidalı mühitlərdə sayılması və hesablanması**

Bərk qidalı mühitdə inkişaf etmiş koloniyaların sayılması üçün Petr qablarından istifadə edilir, səthi və dərin becərmələr aparılır. Nümunə məhlullar qidalı mühitin üst səthinə əlavə edi-

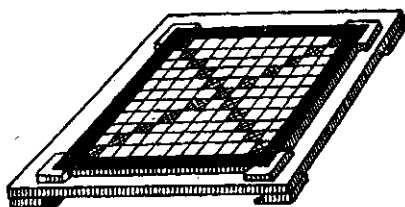
lır və şpatelə yaxılır. Əksinə dərin (aşağı) becərmələrdə məhlul qabların dibinə köçürülür, qidalı mühit əlavə edilir, aramla qarışdırılır, termostata yerləşdirilir, koloniyalar sayılır. Koloniyalar eyni bir hüceyrənin inkişaf etmiş nəsili olub, onların sayına görə canlı bakteriyaların sayı ilə hesablanır. Təhlillər göstərmişdir ki, səthi becərmələr koloniyaların inkişafına daha əlverişli şərait yaradır. Petr qablarında koloniyaların sayı 20-300 olmalıdır.

Bərk qidalı mühitdə tədric edilmiş koloniyaların inkişafının təmin edilməsi üçün durulaşdırılmış suspenziyalar (şəkil 9.) hazırlanır.



Şəkil 9. "Fərdi nümunələrin" "dən durulaşdırılmış "nümunə məhlulları"nın hazırlanması sxemi

Xırda koloniyaların sayılması üçün qabın dib hissəsi bərabər seqmentlərə bölünür və ya xüsusi kameralardan (*Volfxquqeliya kamerası, şəkil 10*) istifadə olunur.



Şəkil 10. Koloniyaların hesablanması üçün Volfxquqeliya kamerası.

Volfxquyeliya kamerasının iş prinsipinə ciddi əməl olunmalı, aparat “0” göstəricisinə bağlanmalı, sakit işləməsi təmin olunmalı, peronun şüşəyə toxunmasına nəzarət edilməlidir.

Mikrobioloji tədqiqatlarda aqar lövhəsindən geniş istifadə olunur. Bu lövhələrin hazırlanması üçün steril Petr qablarına 0,8-1,0 ml. əridilmiş aqarlı (ƏPA,SA, ƏPSA,NAA və s.) mühit tökülür, soyuyaraq bərkiyir, səthi quruyur və lövhə formasını alır. Lövhənin səthində su damlalarının əmələ gəlməməsi üçün Petr qablarının qapaqları açılır, qaz lampasının alovunda qızdırılır, sonra mühitin üst səthi aşağı çevirilib, qapaqlar müəyyən bucaq altında 60-70<sup>0</sup> hərarətdə 20-30 dəqiqə termostata yerləşdirilir və aqar lövhəsi hazır olur və onun əsas göstəricəri (nəmlilik yox olur, mühitin üst səthində “mərməlik” yaranır, və s.) bərpa olunur və bu lövhələrdən nümunə məhlulların səthi becərilməsi üçün istifadə edilir.

Nümunə məhlullar 3-4 dəfə təkrar olaraq steril pipetka ilə 0,5 - 0,1 ml. məhlul götürülür, aqar lövhələrinə əlavə olunur, steril (Driqalski) şpatellə lövhənin səthinə hopana qədər bərabər paylanır, sonra mühitin səthində rütubətin yaranmaması və su damlalarının əmələ gəlməməsi üçün Petr qabları qapaq üstə çevrilir və termostata yerləşdirilir. 48-72 saatdan sonra termostatdan çıxarılır. lövhələrin sətinə baxış keçirilir, 20-300 koloniya olan Petr qabları seçilir, qapağı üstə çevrilir, müşahidələr aparılır, inkişaf etmiş koloniyalar tuşla işarə edilir və sayılır.

Bərk qidalı mühitlərdə koloniyaların sayılması üçün impulsu hesablayıcıdan geniş istifadə olunur. İmpulsu hesablayıcı batareya, hesablayıcı və iti pero şəkilli yaylı zondan ibarətdir. Zond qapağın səthində hərəkət edir, iti uclu pero koloniyaları seçir, bir an dayanır, ucu ilə təzyiq göstərir, işarələr edir, sivri saxlayıcı yuxarı qalxır, zəncir açılır və qapanır, yay peronu ilk vəziyyətinə qaytarır, impulslar hesablayıcıda fiksə olunur, göstəricilər şkalada əks olunur və qeydə alınır.

Canlı bakteriyaların sayının hesablanması üçün koloniyaların ümumi sayının ( $T$ ) qabların sayına ( $n$ ) olan nisbətinə görə orta ədədi qiymət ( $\bar{N}$ ) tapılır.

Beləliklə:

$$\bar{N} = \frac{T_1 + T_2 + T_3 + \dots + T_n}{n} = \frac{T}{n}$$

Məlumdur ki, durulaşdırılmış nümunə məhlullarda koloniyaların orta ədədi qiyməti, onun durulasma nisbəti ilə ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  və. s) ölçülür və 1 ml. fərdi nümunələrdə olan bakteriyaların sayı aşağıdakı formül ilə ifadə olunur:

Beləliklə: 
$$C = \frac{\bar{N}}{v} \cdot k$$

Burada  $C$  - 1 ml. fərdi nümunədə olan bakteriya hüceyrələrinin sayı,  $\bar{N}$  - koloniyaların orta ədədi qiyməti,  $v$  - aqar lövhəsinə əlavə olunan məhlulun miqdarı,  $k$  - durulaşma nisbətini göstərir.

**Nümunənin hesablanması.** Ətli peptonlu bulyonda (ƏPB) bakteriyaların sayılması üçün durulaşdırılmış nümunə məhlullar hazırlanır, 7 ədəd Petr qabına ətli peptonlu aqar (ƏPA) tökülür, (üç qaba  $10^{-5}$ , 4 qaba isə  $10^{-6}$  nisbətli məhlullar) 0,05 ml. məhlul əlavə edilir, termostata yerləşdirilir. 48 saatdan sonra Petr qabları termostatdan çıxarılır və koloniyalar (cədvəl 9) sayılır.

**Cədvəl 9.** Bakteriyaların durulaşmış nümunə məhlullarının nisbətinə görə sayılması

Fərdi nümunələr	Təkrarlar	Məhlullar	Koloniyaların sayı
I.	1	$10^{-5}$	250
	2		252
	3		249
II.	1	$10^{-6}$	25
	2		29
	3		24
	4		30

Cədvəldən göründüyü kimi,  $10^{-6}$  nisbətli məhlulda müqayisədə  $10^{-5}$  məhlula görə koloniyaların sayı az olmuşdur. Koloniyalara görə bakteriyaların cəmi hesablanır.

Beləliklə:  $T_1 + T_2 + T_3 = 250 + 252 + 240 = 751$  koloniya

$$\bar{N} = \frac{T}{n} = \frac{751}{3} = 751 : 3 = 250; k = 5 \cdot v = 0,05 ml.$$

Beləliklə:  $C = \frac{N}{v} \cdot k$  formulunda alınanları yerinə qoyaraq:

$$C = \frac{N}{v} \cdot k = \frac{250}{0,05} \cdot 10^{-5} = 5 \cdot 10^8 ml./ hüç$$

Alınanlara görə fərdi nümunədə olan bakteriyaların orta ədədi qiyməti tapılır. Beləliklə:

$$\bar{C} = \frac{5,2 \cdot 10^8 \cdot 5 \cdot 10^8}{2} = 5,1 \cdot 10 ml./ hüç$$

Bərk qidalı mühitlərdə bakteriyaların səthi becərilməsi ilə yanaşı digər becərmə üsulları da vardır. Bunlardan biri olan dərin (aşığı) becərmə üsuludur və mikrobioloji praktikada geniş istifadə olunur.

Bərk qidalı mühitdə dərin becərmələrin aparılması steril pipetka ilə 0,5-1 ml. durulaşdırılmış məhluldan götürülür, Petr qablarının dibinə tökülür və 20-30 ml. əridilmiş, 45<sup>0</sup>-yə kimi soyudulmuş müvafiq aqarlı mühit əlavə olunur, qabın qapağı örtülür, möhkəm qarışdırılır, mühit bərkidir və qablar termostata yerləşdirilir.

Bərk qidalı mühitlərdə dərin becərmələr aparılmasının digər üsulları da mövcuddur. Bunun üçün qidalı mühit əridilib 40<sup>0</sup>-yə kimi soyudulmuş 20-30 ml. aqarlı mühit sınaq şüşələrinə tökülür və 0,5 ml. nümunə məhlul əlavə edilir, qarışdırılır və steril Petr qablarına tökülür, mühit bərkidir və qablar 48-72 saat termostatlarda saxılır. Sonra qablar termostaddan çıxarılır və qidalı mühitin bütün qatlarında əmələ gələn koloniyalar sayılır və müvafiq hesablamalar aparılır.

**Biokütlənin nefelometriya üsulu ilə təyin edilməsi.** Mikrobioloji laboratoriyalarda biokütlənin təyin edilməsi üçün kifayət qədər dəqiq və iş prinsipi sadə olan nefelometriya üsulundan geniş istifadə olunur. Məlumdur ki, kolloid məhlulundan keçən işıq şüalarının bir hissəsi dispersiya fazasında işıq saçır, digər hissəsi isə udulur. Təbii olaraq işıq şüaları qidalı mühitdə yayılmış bakteriya hüceyrələrinə təsir göstərir və bakteriyalar sayılır.

**Optiki sıxlığa görə biokütlənin təyin edilməsi.** Nefelometr cihazının iş rejmi onun markalarına görə təyin edilir. Nümunə məhlullarının optiki sıxlığının təyin edilməsi üçün nümunələr möhkəm qarışdırılır, kyuvet qablarına tökülür və cihaza yerləşdirilir. Müəyyən olunmuşdur ki, bakteriyaların sayı ilə optiki sıxlıq arasında müəyyən mütənəsiblik mövcuddur. Fərz edək ki, məhluldakı bakteriyaların sayı həddindən artıqdır, onda mühitin optiki sıxlığı yüksək olub cihazın “mümkünlük” həddini aşır. Bu nəzərə alınaraq fərdi nümunələr ardıcıl durulaşdırılaraq müxtəlif nisbətli nümunə məhlulları alınır, təhlil üçün hazırlanır, nefelomeriya edilir, optiki sıxlığı təyin edilir. Optiki sıxlığa görə biokütlənin çəkisi hesablanır.

### §3. Biokütlənin quru çəkisinin təyin edilməsi

Mikrobioloji tədqiqatlarda adətən biokütlənin quru çəkisi aşağıdakı qayda üzrə hesablanır. Qidalı mühitdə inkişaf etmiş kulturaların məlum çəkisinin artmaması üçün mühitə 1 % – *li* formalin məhlulu əlavə olunur və bundan müəyyən qədər götürülür, sentrafuqa edilir, gərəksiz maye axıdılır və bakteriya kütləsi alınır. Bu qalıq əvvəl fizioloji məhlulla və sonra isə distillə suyu ilə yuyulur, 3-4ml distillə suyu ilə resuspenziya edilir. Bu kütlədən 0,2-0,3 *ml*. götürülür və çəkisi müəyyən edilmiş çökək alimiunium lövhəyə ( $d = 2,5sm$ ) yaxılır, lövhələr  $105^0$  hərərdə termostata yerləşdirilir, lövhələr qurudulur. Sonra termostatdan çıxarılır və eksikatora (dibində  $P_2O_5$  və va qatı sulfat turşusu olan) yerləşdirilir, 20-25<sup>0</sup>-ə kimi soyuyur, dəqiq və sabit çəkisi (*cadval 10*) təyin edilir.

*Cədval 10.* Biokütlənin quru çəkisinin təyin edilməsi

Lövhanin № – si	Lövhanin çəkisi, <i>mq</i> -la			Nümunə ilə lövhanin çəkisi, <i>mq</i> -la			Biokütlənin quru çəkisi, <i>mq</i> -la	Məhlulun miqdarı <i>mq</i> -la
	I	II	III	I	II	III		

Bütün hallarda alınanlararası fərqlər hesablanır və 0,0001 dəqiqliyi müəyyən edilir. Bu zaman lövhənin və üzərinə yaxılmış kütlənin yaş və quru çəkisini bilərək, biokütlənin quru çəkisi təyin edilir.

Fərz edək ki, ətli peptonlu bulyonda (ƏPB) kulturanın 24 saatda əmələ gəlmiş biokütləsinin quru çəkisi təyin olunur. Bunun üçün nümunə sentrafuqa edilir, mühitin digər komponentləri və bakteriya kütləsi ayrılır. Bu kütlə iki dəfə yuyulur və 2 ml. distillə suyu ilə resuspenziya edilir. Sonra lövhələr nömrələnir, çəkisi müəyyən edilir və hazırlanmış nümunədən üç alimunium lövhəyə 0,3 ml. və dördünə isə 0,6 ml. əlavə edilir, nümunə ilə lövhələrin çəkisi təyin edilir, onlar termostata yerləşdirilir və lövhələr dəqiq və sabit çəki alana kimi termostatda qurudulur.

Hesablamalar göstərmişdir ki, 0,3 ml. və 0,6 ml. məhluldakı biokütlənin quru çəkisi müvafiq olaraq 6 mq. və 12 mq. olmuş, müəqayisədə 0,1 ml. suspenziyanın tərkibində olan bakteriyaların kütləsinin quru çəkisi 2 mq. olmalıdır.

$$0,1ml. \text{ ————— } 2mq.$$

$$4,0 \text{ ————— } Xmq. \quad X = \frac{4 \cdot 2}{0,1} = 80mq.$$

Buradan görünür ki, 24 saata 50 ml. ƏPB-də becərilmiş kulturanın quru çəkiyə görə biokütləsi 80 mq. -dir.

Əksər hallarda bakteriyalar kultural məhluldan dəqiq və sabit çəkiyə malik olan filtr membranları ilə filtrlənərək ayrılır. Bu filterlərlə nümunə məhlulları filtrlənir, membranlar qurudulur, membranların yaş və quru çəkisi təyin olunur, alınmış fərqi görə bakteriyaların quru çəkisi və biokütləsi hesablanır. Bakteriyaların quru çəkiyə görə biokütləsinin təyin edilməsi nisbətən sadə üsullardan biri olub dəqiq nəticələr əldə etməyə imkan verir.

**Kalibr əyrisinin tərtib edilməsi.** Bakteriyanın quru çəkisinin miqdarı ilə optik sıxlığın qiymətləri arasında müəyyən asılılıq vardır. Buna görə də kalibr əyrisinin qurulması məqsədə uyğun he-

sab olunur. Kalibr ayrısının qurulması üçün aşağıdakı işlər yerinə yetirilir. Nümunə məhlullar becərilir, sentrafuqa (4-5 min dövr/dəq., 7-10 dəqiq) edilir, mühitdən ayrılmış bakteriya kütləsi fizioloji məhlul və distillə suyu ilə yuyulur, sonra az miqdarda distillə suyuna\* yerləşdirilir, sıra ilə durulaşdırılır, müxtəlif nisbətli (1:100; 1:200; 1:300; 1:400; 1:500) məhlullar hazırlanır. Bu məhlulların 3-4 dəfə təkrar olaraq nefelometriya üsulu ilə optik sıxlığı, bakteriyaların (7 ml. məhlula) quru çəkisinə görə biokütləsi təyin edilir. 1 ml. \*\* nümunə məhlulda olan biokütlənin quru çəkisinə görə 100 ml. durulaşdırılmış məhluldan ayrılmış kütlədə olan bakteriyaların sayı hesablanır, müvafiq ədədi qiymətlər alınır, qrafik qurulur, alınanlara görə absis oxu üzərində bakteriyaların quru çəkiyə görə kütləsinin ( $m_q - la$ ), ordinat oxunda optiki sıxlığın qiymətləri göstərilərək kalibr ayrısı tərtib olunur.

---

\* Çökmüş bakteriya kütləsinə əlavə edilən distillə suyunun miqdarı

\*\* 1 ml. məhlulda quru çəkiyə görə bakteriyaların tutumu 8,0-12,0 mq. olmalıdır. Bu zaman yaxşı nəticələr əldə olunur.

## ƏDƏBİYYAT SİYAHISI:

1. Большой практикум по микробиологии. Под ред. Г.Л.Селибера. М., из-до «Высшая школа» 1962, 491 стр .
2. Виноградски С.Н. Микробиология почвы. Москва.1952.
3. Герхардх Ф. Методы общей бактериологии. 1983,1272 str.
4. Герхардх Ф. Методы общей бактериологии в 3 томах. Том 1. М.:Мир, 1984, 536 стр.
5. Герхардх Ф. Методы общей бактериологии в 3 томах. Том 2. М.:Мир, 1984, 472 стр .
6. Герхардх Ф. Методы общей бактериологии в 3 томах. Том 3. М.:Мир, 1984, 264 стр.
7. З. Гусев М.Р. и др. Микробиология.2001.300. стр .
8. Гусев М.В. , Минеева Л.А. Микробиология, 8-е изд., 2008. 464с.
9. Мишустин Е.Н. и Емсев В.Т. Микробиология. Москва. «Колос»,1972.342 стр.
10. Мейнел Дж., Мейкел Э. Экспериментальная микробиология ( пер. с англ.) М., «Мир». 1967.347 стр.
12. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М.” Практикум по Микробиологии”. 2005 г. 608 стр.
13. Работнова.И.Л. «Объщая микробиология» М., из-во «Высшая школа» 1966, 271 стр .
14. Решетник О.А. , Никитина Е.В. , Киямова С.Н. “Микробиология” Учебник . изд.ВУЗ . 2008.368 стр .
15. Щлегель Г. Общая микробиология.1987.567 стр .
16. Bergey”s Manual of deteminative bakteriology. Seventh edition.Baltimore, 2004, 923 p.

**M.R.ŞƏFİYEVƏ**

**MİKROBİOLOJİ TƏCRÜBƏLƏRƏ  
aid  
TAPŞIRIQLAR**

**Dərs vəsaiti**

**Nəşriyyat redaktoru: Suğra OSMANOVA  
Texniki redaktor: Rauf KƏRİMOV  
Bədii redaktor: Elnur ƏHMƏDOV  
Səhifələyici: Fəxri VƏLİYEV**

**Yığılmağa verilmişdir: 04.12.2010.  
Çapa imzalanmışdır: 28.12.2010.  
Nəşrin ölçüsü: 60x90 1/16.  
Fiziki çap vərəqi: 4,50.  
Sifariş: 287/10. Sayı: 500 ədəd.  
Müqavilə qiyməti ilə.**



**NURLAR**

**NƏŞRİYYAT-POLİQRAFİYA MƏRKƏZİ**

**Bakı, Az1122, Zərdabi pr. 78 / Tel: 4977021  
Faks: 4971295 / E-poçtu: office@nurprint.com**