

2-AMALAYI MASHG'ULOT

MAVZU:PREPARATLARNI BO'YASH USULLARI

Mikrobiologiya amaliyotida bakteriya hujayjalari **Gram** bo'yicha differensial bo'yash usuli keng tarqalgan.

Bu usulda bo'yash 1884 yili daniyalik olim X. Gram tomonidan kiritilgan va o'sha davrdan boshlab diagnostika belgisi sifatida ishlatiladi. Bakteriyalar **grammusbat (Gram⁺)** **grammanfiy (Gram⁻)** deb farqlanadi. Grammusbat bakteriyalarni gensionviolet bo'yog'i bilan bo'yab, ba'zi moddalar bilan ishlov berib (protativlivanie), so'ngra 96⁰ etanol bilan ishlov berilsa, binafsha rang saqlanib qoladi. Grammanfiy bakteriyalarida esa, gensionviolet bilan bo'ysa ham, etanol ta'sir etganda rangsizlanib qoladi. Ularni qo'shimcha birorta bo'yoq masalan, fuksin bo'yash mumkin. Shunday qilib, Gram usulida bo'yashning bosqichlarini amalga oshirgandan so'ng, grammusbat bakteriyalar binafsha rangga, grammanfiylari esa – qizil rangga bo'yaladi.

Qator mualliflarning tadqiqotlari shuni ko'rsatadiki, Gram manfiy va Gram musbat bakteriyalar faqatgina bo'yashda farqlanmasdan, balki ba'zi antibiotiklarni (penitsillinga) ta'siriga, sulfamid preparatlarini, lizotsimni **proteolitik fermentlarni** va boshqalarni ta'sirlariga bo'lgan sezgirliklariga qarab ham farqlanadi. Yana aniqlashicha, Grammusbat bakteriyalar 1% NaOH da erimaydi. Grammanfiy bakteriyalar esa to'la erib ketadi.

Hozirgi vaqtda ko'pgina muoliflar Gram bo'yicha bo'yalgan bakteriyalarni bu xususiyatlarni hujayra devorini molekulyar qurulishi va kimyoviy tuzulishiga boshlanmoqda.

Odatda gram usulida bo'yaladigan hujayralar yosh, ko'pincha bir sutkalik kulturalar bo'ladi, chunki bo'yoqni titib qolish ma'lum darajada bakteriyani fiziologiya holatiga ham bog'liq bo'ladi.

Gram usulida quyidagicha bo'ladi. Moysizlantirilgan buyum oynasida 3 ta surtma tayyorlanadi – markazda tekshiriladigan kultura, chapda va o'ngda – nazorat kulturalar. Bitta kultura **Gram** manfiy va boshqasi **Gram** musbat bo'lishi kerak.

Tadqiqot qilinadigan kultura sifatida Petri kosachasida o'stirilgan havo mikroorganizmlarini ishlatish mumkin.

Bakteriyalarni **1% NaOH** ga nisbatan munosabatlarni buyum oynasida tekshirsa ham bo'ladi. buyum oynasiga uchta ishqor tomchisi tomiziladi. Har bir tomchiga ilmoq bilan kontrol va tekshirilayotgan bakteriya biomassasidan ayrim-ayrim solinadi. **Gram⁺** bakteriyalar biomassasi emulsiyalanmasdan parcha-parcha bo'lib qolsa, **Gram⁻** larniki esa to'liq erib ketadi, erittma tiniqlashadi.

Mikrobiologiya praktikasidan mikroblarni oddiy bo'yashdan tashqari bakteriyalarning turini aniqlash uchun murakkab, ya'ni gramm usulida bo'yash ham qo'llaniladi. Bu bo'yashning ahamiyati shundan iboratki, fiksatsiya qilingan prepartni genitsian-violet bo'yog'i yod eritmasi bilan birikkan bo'lib, spirta erimaydi. Ba'zi bakteriyalarni hujayrasi bo'yalganda u spirta erib ketadi. Shuning uchun ham murakkab bo'yash usulida 2-3 bo'yoq ishlatilib u mikroblarni turli bo'yoq va reaktivlarga turlicha munosabatda bo'lishiga asoslangan.

Gram usulida bo'yalganda mikroorganizmlar bo'yoqqa bo'lgan munosabatiga qarab ikki xil, ya'ni gram musbat va gramm manfiy bo'yaluvchi bo'ladi.

a) Gramm usulida bo'yalganda ba'zi mikroblar binafsha rangiga yaqinroq tusga kiradi. Bunday rangga bo'yaluvchi mikroorganizmlarni gram - musbat bo'yaluvchilar deyiladi.

b) Aksincha, ba'zi mikroblar gramm usulida fuksin rangiga, ya'ni och qizil rangga bo'yaladi, bu xilda och qizil rangga bo'yaluvchi mikroorganizmlar gram manfiy bo'yaluvchilar deb ataladi.

Gram-manfiy va gram-musbat bo'yalishning sababi, mikrob tanasida ribonuklein kislotasi magniyli tuzining bor yo'qligiga bog'liqdir. Mikroorganizmlarning tanasida ribonuklein kislotasining magniyli tuzi bo'lsa, unda mikrob genitsian-violet bo'yog'i bilan bo'yalganda ham u bo'yoqni o'z tanasida mahkam saqlab qoladi, preparatga spirt bilan ta'sir etilsa ham genitsian-violet tusda bo'yalgan bo'ladi. Bu rangdagi mikroblarni gram-musbat dedik.

Gram-manfiy bo'yaluvchi mikroorganizmlarda esa ribonukloyein kislotasining magniyli tuzi bo'lmaydi. Shuning uchun unday mikroorganizmlar genitsian-violet bo'yog'ini tanasida mahkam

saqlab qololmaydi. Preparatga spirt bilan ta'sir ettirilganda genitsian-violet bo'yog'i mikroorganizmlar tanasidan yuvilib ketadi, och qizil rangga bo'yalib qoladi.

Ko'pchilik sharsimon bakteriyalar, achitqi nursimon zamburug'lar gramm-musbat bo'yaladi. Ayrim tayoqchasimon bakteriyalar (kolibakteriod, paratif, brusellez va boshqa kasalliklarni qo'zg'atuvchilar), vibriionlar, spirillalar, rikketsiyalar gramm –manfiy bo'yaladi.

Mashg'ulotning maqsadi: mikroblar turini aniqlash va tuzilishini aniq o'rganish, shu asosda mikroblarni murakkab usul, ya'ni bir necha xil bo'yoqlar yordamida bo'yab o'rganish.

Mashg'ulot uchun kerakli asbob va reaktivlar. Mikroskop, oddiy buyum oynasi, bakterial ilmoq, spirt lampasi, achigan pivo, yod eritmasi, 96% spirt, fuksin, gensian-violet bo'yog'i, filtr qog'oz, immersion moy.

Ishning borishi. Mikroorganizmlarni gram usulida manfiy va musbat bo'yalishini aniqlash uchun bakterial ilmoq yordamida achib qolgan pivo betidagi pardadan olinadi. Pivo betidagi parda tarkibida musbat bo'yaladigan achitqi zamburug'lari (drojilar) hamda sirka kislotali bijg'ish jarayonini qo'zg'ovchi manfiy bo'yaladigan bakteriyalar to'plangan bo'ladi. Unda buyum oynasiga yupqa qilib, mazok tayyorlanib fiksatsiya qilinadi, fiksatsiyalangan va yuvilgan mazok ustiga gensian-violet bo'yog'i tomiziladi, 1-2 daqiqadan so'ng u yaxshilab yuviladi. So'ngra yod eritmasi tomiziladi va 1-2 daqiqadan keyin u ham yuvib tashlanadi. Yod eritmasi suv bilan yuvilgandan so'ng preparat ustiga 96% etil spirt tomizilib, 0,5-1 daqiqaga tinch qoldiriladi.

Spirtni yuvib tashlagandan keyin preparat ustiga suyultirilgan fuksin bo'yog'i tomiziladi va 1-2 daqiqa davomida bo'yaladi. Shundan so'ng fuksin bo'yog'i yuvilib, preparat filtr qog'ozi bilan quritiladi. Keyin ustiga bir tomchi immersion moy tomizilib immersion ob'yektiv orqali mikroskopda ko'riladi. Preparatda musbat bo'yaladigan achitqi zamburug'lari to'q binafsha (yumaloq, ovalsimon) manfiy bo'yaladigan sirka bakteriyalari qizil rangda (tayoqchasimon) tovlanib turadi.

VAZIFA

1. Buyum oynasini tayyorlash;
2. Kulturani tayyorlash;
3. Mazok tayyorlash;
4. Fiksatsiyalash;
5. Gramm usulida bo'yash;
6. Mikroblarni manfiy va musbat bo'yalishini kuzatish hamda rasmlarni chizish;

SAVOLLAR

1. Nima maqsadda gramm usulida bo'yash qo'llaniladi?
2. Gramm usulida bo'yashning ahamiyati nimadan iborat?
3. Gramm usulida bo'yashda nechta bo'yoq ishlatiladi?
4. Mikroblar turli bo'yoq va reaktivlarga kanday munosabatda bo'ladi?
5. Gramm usulida bo'yalganda qanday rangga kiradi?
6. Gramm manfiy va gram musbat bo'yalish deb nimaga aytiladi?
7. Sharsimon bakteriyalar va zamburug'lar qanday bo'yaladi?
8. Mikroorganizmlardagi ribonuklein kislotasining magniyli tuzi qanday ahamiyatga ega?