

Məşğələ 6

Bakteriyyaların (aerob, anaerob və s) kultivasiyası. Bakterioloji üsul, bakteriyyaların təmiz kulturasının alınması (I, II və III gün). Müasir identifikasiya üsulları.

Müzakirə olunan suallar:

1. Mikroorqanizmlərin kultivasiyası, “kultura”, “klon”, “koloniya” və “ştam” anlayışları.
2. Bakteriyyaların kultivasiya prinsipləri.
3. Aerob və anaerobların qidalı mühitlərə inokulyasiya (əkilmə) üsulları.
4. Kultural üsul: mahiyyəti və əhəmiyyəti, kultivasiya şəraiti (temperatur, aerasiya və müddət).
5. Aerob mikroorqanizmlərin təmiz kulturasının alınma üsulları (Driqalski, ştrixlə, Şukeviç üsulları, elektiv qidalı mühitlərin tətbiqi).
6. Anaerob mikroorqanizmlərin kultivasiyası və təmiz kulturasının alınma üsulları (Seysler və Veynberg üsulları).
7. Bakteriyyaların kultural xassələri - koloniyaların makroskopik və mikroskopik müayinəsi (ölçüsü, forması, rəngi, şəffaflığı, konsistensiyası, yerləşməsi, səthi, kənarları və strukturu).
8. Mikroorqanizmlərin həyat fəaliyyəti məhsulları: fermentlər və pıqmentlər, aromatik maddələr və onların əhəmiyyəti.
9. Bakterial fermentlərin təsnifatı, bakteriyyaların identifikasiyasında fermentlərin rolu.
10. Karbohidratları parçalayan fermentlər və onların təyini (Hiss və Kliqlər mühitləri).
11. Proteolitik fermentlər və onların təyini (jelatin, zərdab və süddə inkişaf, indol, ammoniak və hidrogen-sulfid təyini) və oksidləşmə-reduksiya fermentləri (oksidaza, katalaza, dekarboksilaza).
12. Aqressiya fermentləri və onların təyini (hialuronidaza, lesitinaza, fibrinolizin, plazmakoagulyaza).
13. Müasir identifikasiya üsulları (mikrotest sistemlər, Vitek analizatoru və s.).

Bakteriyyaların təmiz kulturalarının əldə edilməsinin, fiziologiyası və identifikasiyasının öyrənilmə üsulları infeksiyon xəstəliklərin mikrobioloji diaqnostikasının əsasını təşkil edir.

Təbiətdə mikroorqanizmlər qarışıq populyasiya şəraitində yaşayırlar. Mikroorqanizmlərin xassələrini öyrənmək və onların sistematik olaraq vəziyyətlərini təyin etmək üçün, hər şeydən əvvəl, onların ayrı-ayrı növlərini əldə etmək və “təmiz kultura” şəklində becərmək, sonra isə identifikasiya etmək lazımdır. Yəni qəbul edilmiş xüsusi təyinedicidə müqayisəli tərzdə əldə edilmiş mikrobun yerini müəyyən etmək vacibdir.

Kultural və ya bakterioloji müayinə üsulunun, yəni mikroorqanizmlərin təmiz kulturasının əldə edilməsinin, onun identifikasiyasının, antibiotiklərə qarşı mikrobun həssaslığının öyrənilməsinin yoluxucu xəstəliklərin diaqnostikasında və müalicəsində çox mühüm əhəmiyyəti vardır.

Bütün bunları həyata keçirmək üçün, xüsusən patoloji materialdan hər hansı bir mikrob növünü ayırmaq üçün həmin material mütləq müəyyən bir qidalı mühitə, hətta əgər xəstəlik təxminən müəyyən olduqda belə patoloji material həmin mikrob üçün ən əlverişli olan qidalı mühitə (elektiv mühitə) əkilməlidir. Bununla bərabər, hər hansı bir mikrob ştamını uzun müddət laboratoriya şəraitində saxlamaq lazım gələrsə, onu vaxtlı-vaxtında (təxminən 3-4 həftədən bir) bir qidalı mühitdən digər qidalı mühitə köçürmək lazımdır, çünki bir qidalı mühitdə mikroorqanizm uzun müddət qaldıqda orada olan lazımlı qida maddələri tükənir və eləcə də mikrobun ifraz etdiyi zərərli məhsullar (toksinlər) hətta onun özünün də normal yaşayışı üçün təhlükə yaradır.

Patoloji materialı kultivasiya etmək üçün, əsasən bərk və duru qidalı mühitlərdən istifadə olunur.

Bərk qidalı mühitdə kultivasiya. Mikrobun kultivasiyasının texnikası qidalı mühitin bərkliyindən asılıdır. Ümumiyyətlə, kultivasiya əməliyyatı bokslarda və ya gediş-gəliş az olan laboratoriyalarda aparılır. Bunun üçün qaz və ya spirt lampası, steril qidalı mühitlər, bakterial ilgək və ya pipetkalar (yogun ucuna pambıq tıxanmış), şpatellər, steril fizioloji məhlul, içərisində dezinfeksiyaedici məhlul olan qab və s. lazımdır.

Petri kasasında inokulyasiya. Təmiz mikrob kulturası əldə etmək üçün, bakteriya gəzdircilik öyrənilən zaman, mikrob kulturası çirkləndikdə onu təmizləmək məqsədilə və s. hallarda geniş qidalı mühit səthində materialın əkilməsi lazım gəlir. Bunun üçün içərisində qidalı mühit olan Petri kasasının qapağı sol əllə yarım açılır, oradakı qidalı mühitin səthinə bakterial ilgək və ya pipetka ilə 1 damla material qoyulur (mikrob kulturası bərk qidalı mühitdədirsə, onu fizioloji məhlulla əvvəlcədən

durulaşdırmaq lazımdır), sonra sağ əldə olan steril şpatel ilə həmin damla qidalı mühitin səthinə yayılır, bu müddətdə Petri kasası sol əllə dairəvi hərəkət etdirilir.

Kultivasiyadan sonra şpatel içərisində dezinfeksiyaedici məhlul olan qaba salınır, kasa isə tərsinə çevrilərək termostata qoyulur.

Tədqiq olunan material ilgəklə əkildikdə isə Petri kasasının bir kənarından başlayaraq paralel cizgilərlə qidalı mühitin səthinə yayılır.

Hər iki halda Petri kasasının qapağını tam açmaq olmaz, yoxsa qidalı mühitin səthinə havadan əlavə mikroblar düşə bilər. İçərisində patoloji material və ya mikrob qarışığı əkilmiş Petri kasası tərsinə çevrilir, onun qapağında yox, qidalı mühit olan yerində xəstənin soyadı, ayın tarixi qeyd edilir və dibi yuxarı baxmaq şərti ilə kasa termostata qoyulur.

Sektorlar üzərinə əkmək. Kasanın altı cizgilənərək sektorlara bölünür. Material ziq-zaq şəkilli hərəkətlə kasanın kənarından mərkəzə doğru yayılır. Bu zaman elə hərəkət edilməlidir ki, ştrixlər bir sektordan başqa sektora keçməsin.

Qazonla əkmək. Bəzən Petri kasasındakı qidalı mühitin hər yerində, başqa sözlə qazonla əkmə lazım gəlir. Məsələn, faqa görə mikrobun tipinin təyin edilməsində. Bunun üçün təmiz mikrob kulturasından emulsiya hazırlanır və Petri kasasında olan qidalı mühitin səthinə tökülür, sol əllə kasa yüngülcə elə çalxalanır ki, məhlul hər tərəfə eyni bərabərlikdə yayılsın. Sonra artıq qalan emulsiya steril pipetka ilə ehtiyatla sorulur və içərisində dezinfeksiyaedici məhlul olan qaba salınır, və lazım olan əməliyyat aparılır, sonra kasa bir qədər sonra, yəni məhlul aqara tam hopduqdan sonra termostata qoyulur.

Çəp aqara əkmə. Bir sınaq şüşəsindən digər sınaq şüşəsinə bakteriya kulturasının keçirilməsi zamanı hər iki sınaq şüşələri sol əldə şəhadət və baş barmaqlar arasında maili olaraq elə tutulur ki, sınaq şüşələrinin çəp səthi yuxarı baxsın. Bakterial ilgək avtomat qələm kimi sağ əldə tutulur və alov üzərində şaquli saxlamaqla qızarana qədər yandırılır. Sınaq şüşələrinin tıxacları sağ əllə, çeçələ barmaqla ovucun içi arasında çıxardılır. Tıxaclar çıxarıldıqdan sonra sınaq şüşələrinin ağızları alova yaxınlaşdırılır.

Közərdilmiş ilgək mikrob kulturası olan sınaq şüşəsinə salınır, onun qidalı mühit olmayan yerində soyudulur və bakteriya kulturasının səthinə toxundurmaqla mikrob götürülür, sonra götürülmüş bu kultura yanmaqdan qorunmaqla aqar olan sınaq şüşəsinə keçirilir, aqarın çəpliyi başlanan yerdən ilanvari hərəkətlə ziqzaq xətlə çəp aqarın səthində gəzdirilərək mikrob kulturası yayılır. Sonra bakterial ilgək sınaq şüşəsindən çıxarılır, alovdan keçirməklə hər iki sınaq şüşəsinin tıxacı bağlanılır, ilgək isə alova perpendikulyar tutulmaqla közərdilir və öz yerinə, kultura olan sınaq şüşəsi də ştativə qoyulur, mikrob əkilmiş çəp aqar olan sınaq şüşəsinin üstündə ayın tarixi, mikrob kulturasının adı qeyd olunur və 37⁰ C temperaturu termostata qoyulur. 18-20 saat sonra termostatdan çıxarılır və iş davam etdirilir.

Termostat mikroorqanizmləri insan və heyvan orqanizmindən xaricdə, yəni süni qidalı mühitlərdə becərmək üçün sabit və optimal temperatur şəraiti yaradan xüsusi ikiqat divarlı şkafdır. Bu divarların arasında su və ya hava olur ki, bu da elektrik enerjisi və ya digər qızdırıcı mənbə ilə qızdırılır. Termostatda temperaturu daim sabit saxlamaq üçün istilik tənzimləyicisi olur. Termostatın yuxarı divarında ventilyasiya dəliyi və termometr olur, ön tərəfdən isə cihaz əvvəlcə şüşə qapaqla, sonra isə ikiqat divarlı qapaqla kəpəklə bağlanılır. Termostat xaricdən istiliyi pis keçirən materialla örtülür. Əksər patogen mikroblar termostatda 37⁰C temperaturda bir neçə sutkaya, bəzi mikroorqanizmlər isə aşağı temperaturda bir neçə sutkaya çoxalır, məsələn leptospiirlər, göbələklər 28⁰C-də 3-10 günə çoxalır.

Düz aqara əkmə. Düz aqara əkmə və ya iynələmə yolu ilə əkmədən əsasən, anaerob bakteriyaların əkilməsi və müxtəlif bakteriyaların jelatini nə formada əritdiyini müşahidə etmək məqsədi ilə istifadə edilir. Bəzən mikrobu uzun müddət saxlamaq üçün də iynələmə yolu ilə əkmə aparılır.

Bunun üçün içərisində düz aqar və ya jelatin olan sınaq şüşəsi dibi yuxarı olmaq şərti ilə sol əldə tutulur, tıxac açılmaqla sınaq şüşəsinin ağızı alovdan keçirilir, ucu iynə şəkilli Kolle qələmi alovda közərdilir, içərisində müəyinə olunacaq material olan qaba salınır, orada soyudulur, sonra materiala batırılır və heç bir yerə toxundurulmadan düz aqarın dibinə qədər qidalı mühitə salınır, həmin xətlə də cəld çıxarılır. Kolle qələmi alovda közərdilir, bir kənara qoyulur, sınaq şüşəsinin tıxacı isə alovdan keçirməklə bağlanır və termostata qoyulur.

Maye mühitə əkmə. İçərisində duru qidalı mühit (bulyon) olan sınaq şüşəsi sol əldə qələm kimi elə tutulur ki, tıxac islanmasın. Sağ əldə tutulmuş bakterial ilgək alovda közərdilir, soyudulur. Həmin

əlin çəçələ barmağı və ovucu içərisində tıxac açılır, ilgəklə mikroblu material götürüb bulyon olan sınaq şüşəsinə keçirilir və sınaq şüşəsinin divarında məhlul toxunan yerdə ilgək hərəkət etdirilməklə material həll edilir, sonra bakterial ilgək sınaq şüşəsindən çıxarılır, alovda közərdilir, sınaq şüşələrinin tıxacı isə alovdan keçirilməklə bağlanılır. Material əkilmiş sınaq şüşəsinin dibi sol və sağ əlin ovucu içərisində, ehməllə çalxalanır, ya da sağ əllə sınaq şüşəsinin yuxarisından tutub onun dibini sol əlin ovucu içərisinə ehtiyatla vurmaqla çalxalanır.

Əgər mikroblu material duru olarsa, onda steril pipetka ilə bir damla material götürüb duru qidalı mühitə əlavə olunur və yuxarıda göstəriləni kimi ehtiyatla çalxalanır ki, qarışsın. Sonra pipetka içərisində dezinfeksiyaedici məhlul olan qaba salınır, sınaq şüşəsinin isə üstü yazılaraq vertikal vəziyyətdə (ştativin içərisində və ya hər hansı bir qabın içərisində) termostata yerləşdirilir.

İşin aparılma qaydası isə bütün hallarda yuxarıda göstərilən kimidir (tıxacın açılması, bağlanması və s.).

Anaerob bakteriyaların kultivasiya xüsusiyyətləri. Tibbi mikrobiologiya üçün böyük əhəmiyyətə malik olan anaeroblar (klostridiumlar, bakteroidlər, fuzibakteriyalar və b.) mötədil (mülayim) anaeroblar kateqoriyasına daxildirlər. onlar qısa zaman müddətində (10-20-30 dəq) oksigenə tolerantdırlar və mühitdə oksigenin konsentrasiyası 3%-dən yuxarı olduqda inkişaf etmirlər.

Anaerobların kultivasiya edilməsi və identifikasiya edilməsi mərhələlərində əsas şərt onların molekulyar oksigenin toksiki təsirindən müdafiə edilməsidir. Materialın götürülməsi və onun qidalı mühitlərə əkilməsinə sərf olunan vaxt maksimum qısa olmalıdır. Patoloji materialın tərkibində olan obliqat anaerobları atmosfer oksigenindən qorumaq üçün xüsusi daşınma (nəql etmə) mühitlərindən istifadə edilir.

Obliqat-anaerobların bioloji xüsusiyyətləri aerob və fakultativ-anaerob bakteriyalarla işlənən zaman istifadə edilən üsullardan fərqli xüsusi üsulların tətbiq edilməsini tələb edir.

Anaerob bakteriyaları yalnız aşağı oksidləşdirici-reduksiyaedici potensiala (10-40mV) malik olan xüsusi oksigensiz qidalı mühitlərdə becərmək olar. Bu mühitlərin oksigenlə doyma dərəcəsinə nəzarət etmək üçün xüsusi redoks-indikatorlardan (metilen abısı, rezazurin) istifadə edilir. Reduksiya olunmuş halda onlar rəngsizdirlər. Oksidləşdirici-bərpaedici potensial artdıqda metilen abısı mühiti göy rəngə, rezazurin qırmızı rəngə boyayır. Rəngin belə dəyişməsi mühitin obliqat-anaerobların kultivasiyası üçün yararsız olduğunu göstərir.

Oksidləşdirici-reduksiyaedici potensialı aşağı səviyyədə saxlamaq üçün mühitlərə aqar əlavə edilməlidir. Hətəda 0,05% aqar əlavə edildikdə onların özüllüyü artır və aerasiya olunmaları azalır. Obliqat anaerob bakteriyaların yaxşı inkişaf etmələri üçün bərk qidalı mühitlər təzə hazırlanmış olmalıdırlar (hazırlandıqdan sonra 2 saat müddətində əkmə aparılmalıdır), yaxud reduksiya edilib anaerostatda bir sutka saxlamaq olar. Anaerobları müvəffəqiyyətlə inkişaf etdirmək üçün çoxlu miqdarda materialın əkilməsi tələb olunur. Bu onunla izah olunur ki, obliqat anaerobların yüksək konsentrasiyaları mühitin oksidləşdirici-reduksiyaedici potensialını tez bir zamanda azaldır və inkişafı üçün əlverişli şərait yaradırlar.

Anaeroblar üçün hazırlanan qidalı mühitlərin tərkibində daha çox qidalı substratlar (maddələr) və vitaminlər olmalıdır. Qida əsası kimi onların tərkibində müxtəlif ekstratlar və zülal hidrolizatları (ürək-beyin, qaraciyər, maya və soya ekstratları, pepton, tripton, kazein hidrolizəti və s.), boy amilləri(hemin, menadion, twin-80, natrium suksinat və b.), xalis və ya hemoliz olunmuş qan olmalıdır. Qarışıq kulturadan müxtəlif anaerobları ayırmaq üçün qida əsaslarına öd, natrium azid, antibiotiklər, nalidiksovat turşusu, malaxit yaşıllı və digər inqredientlər əlavə edilir. Təcrübi laboratoriyalarda patoloji materiallardan anaerobları almaq üçün ən çox sterilliyə kontrol (SK) mühitdən, Kit-Tarosi mühitindən, anaerob qanlı aqardan (eritrit-aqar əsasında, yaxud D aqardan), Vilson-Bler mühitindən və tərkibində müvafiq əlavələr olan bəzi digər mühitlərdən istifadə edilir.

Anaerob şərait yaratmaq üsulları. Anaerob bakteriyaları becərmək üçün gərəkli şərt anaerob şəraitin yaradılmasıdır. Anaerob şərait fiziki, kimyəvi, bioloji və qarışıq üsullarla yaradılır.

Fiziki üsullar:

1. Qidalı mühitdə həll olmuş oksigeni yox etmək üçün, onları su hamamında 15-20 dəq qaynatmaqla regenerasiya aparılır, sonra tez bir zamanda 45-50°-yə qədər soyudulur.
2. Maye qidalı mühitə əkin aparıldıqdan sonra, oraya oksigen daxil olmasın deyər mühitin səthinə steril vazelin yağı və ya parafin əlavə edilir (1-2 sm qalınlıqda).
3. Patoloji materialı, sınaq şüşəsinə tökülmüş 10-12 mm bərk və ya yarım maye qidalı mühitin hündür sütununa da əkmək olar. Havanın oksigeni adətən qidalı mühitin səthindən 1,5-2 sm

dərinliyə diffuz edə bilir və nəticədə qidalı mühitin dərinliyində isə obliqat anaerobların inkişafı üçün əlverişli anaerob şərait yaranır.

4. Təxliyə-əvəzətmə üsulu–hermetik bağlı qablardan vakum nasos vasitəsilə havanın sorulub çıxarılması (anaerostatlar, anaerob boksar), sonra onun təsirsiz qazla (azot, arqon, helium), yaxud tərkibi 80% azotdan, 10% karbon iki oksiddən və 10% hidrogendən ibarət oksigensiz qaz qarışığı ilə əvəz edilməsidir. Bəzi hallarda təbii qazdan da (magistral qaz) istifadə edilir. Qaz qarışığından qalıq oksigenin udulması üçün palladium katalizatorundan istifadə edilir. Su buxarını udmaq üçün anaerostatın dibinə 5-6 qr. kalsium xlorid, 10-12 qr sliqagel, yaxud 20-30 qr natrium xlorid tökülür.

Kimyəvi üsullar:

1. Qapalı hava mühitində oksigeni udmaq üçün qələvi piroqallol məhlulunun hazırlanması. 220ml havadan oksigeni udmaq üçün 1ml 20%-li piroqallol məhlulu və 1ml doymuş natrium karbonat (Na_2CO_3) məhlulunun qarışığından istifadə edilir.
2. Qapalı mühitdə oksigenin udulması üçün natrium hidrosulfitdən istifadə etmək olar. oksigeni birləşdirmək üçün 1 həcmə 100ml təzə hazırlanmış 20%-li Na_2SO_4 məhlulu və 16ml 50%-li KOH götürülür. Bu reagentlər oksigeni piroqallola nisbətən daha tez birləşdirirlər.
3. Oksigen qalığını birləşdirmək məqsədilə anaerobların inkişafı üçün nəzərdə tutulan qidalı mühitlərə redusent maddələr əlavə edilir. Bu maddələrə tioqlikolin turşusu, yaxud natrium tioqlikolyat (0,01-0,02%), askorbin turşusu (0,1%), müxtəlif şəkərlər (0,1-3%), sistin və sistein (0,03-0,05%), qarışqa turşulu natrium (0,25-0,75%) və başqaları aiddir.
4. Qapalı hava mühitində anaerob şərait yaratmaq üçün qaz-generasiya sistemlərindən də (mikroanaerostatlar, eksikatorlar, qaz buraxmayan şəffaf lövhəli paketlər) istifadə edilir.

Bioloji üsullar:

1. Aerob və anaerobların birlikdə becərilməsi (Fortner üsulu). Bu üsulda Petri kasasına tökülmüş bərk qidalı mühitin səthinin bir hissəsinə müayinə edilən material, digər hissəsinə isə aerob və ya fakultativ-anaerob mikroorqanizm kulturası əkilir. Əkin aparıldıqdan sonra kasa qapağı ilə bağlanılır. Hermetizasiya məqsədilə xaricdən kasaya hava daxil olmasın deyə qapağın kənarlarına parafin tökülür, yaxud plastilinlə bağlanılır. Qapalı sahədə oksigeni fəal udmaq məqsədilə ən çox *Serratia marcescens* kulturasından istifadə olunur. Əvvəlcə aerob bakteriya çoxalır, mühitdə O_2 qurtardıqdan sonra anaerob bakteriya çoxalır. Bu mikrob anaerobiaz şəraitli mühit üçün özünəməxsus indikator rolunu oynayır. Belə ki, kasada kifayət qədər hermetizasiya olmadıqda bu mikroblar tünd-qırmızı pigment əmələ gətirirlər, ciddi anaerob şərait saxlanıldıqda onlar rəngsiz, yaxud solğun-çəhrayı rəngdə koloniyalar əmələ gətirirlər.
2. Qidalı mühitə qaraciyər, baş beyin, böyrək və ya digər daxili orqanlardan tikələr salınır. Bu zaman toxuma hüceyrələri oksigeni fəal surətdə udurlar və özlərinə adsorbsiya edirlər, nəticədə mühitdə anaerob şərait yaranır. Bu prinsiplə hazırlanmış qidalı mühitlərə tərkibində qaraciyər tikələri olan Kitt-Tarossi mühitini misal göstərmək olar. bundan başqa qaraciyər toxumasında çoxlu miqdarda SH qrupu (sistein, qlutation və b.) vardır. Bu maddələr güclü reduksiyaedici xassələrə malikdirlər.

Aerob bakteriyaların təmiz kulturasının alınma üsulları. Təmiz mikrob kulturası dedikdə, hər hansı bir növə mənsub olan mikroorqanizmin bərk qidalı mühitdə populyasiyası nəzərdə tutulur. Məsələn, izolə edilmiş hər hansı mikrob koloniyası təmiz kultura sayıla bilər.

Məlumdur ki, yoluxucu xəstəliklərin törədiciləri insan və heyvan orqanizmində, xarici mühitdə saprofit və şərti patogen mikroblarla qarşılıqlı əlaqədə rast gəlinir. Ona görə də mikrobun morfoloji, kultural, biokimyəvi xüsusiyyətlərini öyrənməklə onun növünü dəqiqləşdirmək, daha doğrusu identifikasiya etmək üçün təmiz kulturasının əldə edilməsi mərhələsi kultural (bakterioloji) müayinənin əsasını təşkil edir.

Tərkibində müxtəlif növ mikroblar olan qarışıqdan təmiz mikrob kulturası əldə etmək üçün bir sıra üsullar təklif edilmişdir.

Müayinə materialında olan mikrobların mexaniki surətdə bir-birindən ayrılması üsulu təklif olunan üsullar içərisində daha əhəmiyyətlidir ki, bu məqsədlə də izolə olunmuş öyrəniləcək koloniyalar qidalı mühitin səthində əldə edilir.

Geniş tətbiq edilən üsullardan biri də elektiv qidalı mühitlərdə materialın əkilməsidir. Bu zaman şübhə doğuran mikrob növü bu mühitdə daha yaxşı inkişaf edir. Məsələn, patoloji materialı 1%-li qələvi peptonlu suya əkməklə oradan vəba vibrionlarını ayırmaq asan olur, yaxud da laxtalanmış at zərdabında əkməklə difteriya çöplərinin təmiz kulturasını almaq asanlaşır.

Bəzi hallarda qidalı mühitə müxtəlif kimyəvi maddələr və ya antibiotiklər qarışdırmaqla da lazımsız mikrobun inkişafı dayandırılır, əksinə digər mikrobun inkişafı üçün şərait yaranır. Məsələn, göy öskürək xəstəliyinə şübhə varsa, uşaqlardan götürülmüş patoloji material penisillin qatılmış qidalı mühitdə əkilir, bu zaman Qram müsbət bakteriyaların inkişafı dayanır, yaxud da taun xəstəliyinə şübhə varsa, qidalı mühitə az dozada (1:200000) gentsian-violet qatılır və müayinə olunacaq material orada əkilir, bu zaman materialda ola biləcək saprofit bakteriyaların inkişafı dayanır. Eləcə də termostatin temperaturunu aşağı salmaqla (5^0 - 10^0 C) saprofit bakteriyaların inkişafını dayandırmaq olar və bu zaman yalnız taun çöpləri inkişaf edir. Deməli, hər hansı bir mikroorqanizmin müxtəlif faktorlara qarşı rezistentlik xüsusiyyəti də təmiz kulturanın alınması prosesində müəyyən dərəcədə rol oynayır. Vərəm çöpləri turşuların təsirinə qarşı davamlı olduğundan, bəlgəm turşu qatılmış mühitdə çalxalanıb, sonra əkilərsə vərəm çöpləri bitər, digər mikroblar inkişaf etməz.

Bunlardan əlavə, mikrobun bitmə xüsusiyyətindən də təmiz kulturanın əldə olunması prosesində istifadə edilir. Məsələn, Şukevic üsulu ilə, yəni çəp aqarın dibində olan kondensasiya suyuna əkməklə patoloji materialda olan vurqar protey çöplərini digər mikroblardan ayırmaq mümkündür.

Əgər təmiz kulturası alınacaq material kənar mikroflora ilə çirklənmişsə, onda bioloji müayinə üsulundan, yəni həssas laboratoriya heyvanlarının yoluxdurulmasından istifadə edilir. Əsasən, pnevmoniya, vərəm, taun və s. xəstəliklər zamanı bəlgəmdən təmiz kultura almaq məqsədilə laboratoriya heyvanları yoluxdurulur.

Təmiz mikrob kulturasının əldə edilməsinin ən sadə və çox geniş yayılan üsulu Driqalski üsuludur.

Bu üsulla işləmək üçün əvvəlcə Petri kasalarına aqar tökülməlidir. Yəni üç steril Petri kasası götürülür, yan-yanı düzülür, sağ əldə içərisində əridilmiş aqar olan flakon tutulur, sol əlin ovuc içi və çəçələ barmağı arasında flakonun tıxacı açılır, alovdan keçirilir və sol əllə kasanın qapağı yarı açılır, alovdan keçirilir və sol əllə kasanın qapağı yarı açılır, ora 15-20 ml olmaqla əridilmiş aqar tökülür, cəld qapaq bağlanır. Kasa azca çalxalanmalıdır ki, aqar hər tərəfə bərabər yayılsın. Bir müddət sonra kasalar soyuyur, aqar bərkirir və dibi yuxarı baxmaq şərti ilə ağzı açıq vəziyyətdə termostatda 15-20 dəq saxlanılır ki, qurusun.

Driqalski üsulu ilə təmiz mikrob kulturası alındıqda müayinə materialı ya şüşə şpatel, ya da bakterial ilgək vasitəsilə əkilir, eləcə də ilgəklə əkmə zamanı bəzən Petri kasasındakı qidalı mühit sektorlara bölünür. Əvvəlcə bakterial ilgəyin ucundakı material I sektora, sonra II və III sektorlara da ardıcılıqla əkilir, beləliklə mikrob getdikcə azalmış olur. Bu üsuldən qənaət məqsədilə istifadə edilir. Ilgəklə əkən zaman kasanın bir tərəfindən qalın ştrixlər edilir ki, mikroblu materialın qalın hissəsi orada qalsın. Ilgəkdə qalan az hissəni isə qidalı mühitin səthində paralel ştrixlərlə əkirlər. Bəzən şpatellə əkmədən geniş istifadə edilir, belə ki, mikrobun miqdarını get-gedə azaltmaqla bir neçə kasaya mikroblu material əkilir, iş isə bir neçə sutka davam etdirilir.

I gün. İçərisində qidalı mühit olan üç Petri kasası nömrələnir, yan-yanı düzülür, 1-ci kasanın qapağı sol əllə yarı açılır və aqarın səthinə steril pipetka və ya Kolle qələminin ilgəyi ilə fizioloji məhlulla durulaşdırılmış müayinə materialından bir damla əlavə edilir. Ilgək közərdilərək kənara qoyulur (pipetka isə dezinfeksiyaedici məhlul içərisinə salınır). Həmin damla steril şpatellə kasanın əvvəlcə kiçik bir hissəsində, sonra isə dairəvi hərəkətlə bütün səthində bərabər yayılır, kasanın qapağı örtülür, şpatel isə heç bir yerə toxundurulmadan həmin üzü ilə 2-ci və 3-cü kasalardakı qidalı mühitin səthlərində də gəzdirilməklə mikroblu material əkilir. Şpatel içərisində dezinfeksiyaedici maye olan qaba salınır, kasalar isə tərsinə çevrilərək, yəni dibi yuxarı baxmaq şərti ilə 18-24 saat müddətində 37^0 C –də termostatda saxlanılır (kasaları tərsinə qoymaqda məqsəd əmələ gələcək kondensasiya suyunun bitəcək koloniyalar üzərinə damcılamaasının qarşısını almaqdır, həm də kasanın qapağı onun özündən böyük olduğundan azacıq ehtiyatsızlıq nəticəsində əkilmiş kasa düşüb sına bilər).

Bəzən təbii populyasiyalardan bakteriyaları almaq üçün qidalı mühitlərə bu və ya digər mikroorqanizmlərin inkişafına seçici təsir göstərən və onların inkişafını dayandıran maddələr əlavə edilir. Məsələn, polien antibiotiklərin (nistatin) mühitə əlavə edilməsilə göbələklərlə çox çirklənmiş bakteriya kulturasını təmizləmək olar.

Mikrob inokulyasiya edilmiş Petri kasaları termostatda 18-24 saat inkubasiya edirlər. Bu müddət ərzində ayrı-ayrı mikrob hüceyrələrindən təcrid olunmuş koloniyalar formalaşır. *Koloniya*– bir növlü mikrob hüceyrəsinin bərk qidalı mühit səthində populyasiyasıdır. O, optimal temperaturda, bərk qidalı mühitdə becərilmə şəraitində bir hüceyrənin bölünməsi nəticəsində formalaşmış populyasiyadır.

ənin bölünməsi nəticəsində formalaşmış populyasiyadır.

II gün. Təcrid olunmuş koloniyaların öyrənilməsi tədqiqatın ikinci mərhələsini təşkil edir, yəni kultural əlamətlərin öyrənilməsi.

Əkilmiş Petri kasaları termostatdan çıxarılır, bakteriyaların kultural xüsusiyyətləri nəzərdən keçirilir, belə ki, onlara əvvəlcə makroskopik baxılır, yəni kasalar işığa doğru dibi özümüzə tərəf baxmaq şərti ilə 10-15 sm aralı tutulur. Bu zaman kasalarda müxtəlif rəngdə, müxtəlif forma və böyüklükdə mikrob koloniyaları görünür. 1-ci kasada mikrob koloniyaları sıx olur, bir-birindən təcrid olunmur, 2-ci kasada nisbətən seyrək, 3-cüdə isə daha seyrək olur. Ona görə də təmiz mikrob kulturası əldə etmək üçün əsasən, 3-cü kasadakı koloniyalar öyrənilir.

Mikroorqanizmlərin növünü təyin etmək üçün koloniyaların forması çox vacib kultural xassədir. Belə ki, hər növ bakteriya müvafiq bərk qidalı mühitdə bitdiyi zaman özünəməxsus tipik koloniya əmələ gətirmə xassəsinə malikdir. Koloniyalar adi gözlə və lupanın, yaxud mikroskopun kiçik böyüdücüsü altında öyrənilir.

Koloniyaların ölçüləri (diametrləri 4-5 mm və ondan da böyük olan koloniyalar böyük koloniyalar; 2-4 mm orta koloniyalar; 1-2 mm isə kiçik koloniyalar hesab olunur), formaları (düzgün formalı, dairəvi, qeyri-düz formalı, yastı, sferik) və şəffaf olmaları təyin edilir.

Əks olunmuş şüalarda koloniyalar kasanın qapağı tərəfindən müayinə olunur və koloniyaların rəngi (rəngsiz, rəngli); səthinin xarakteri (hamar, qırıqlı, parıltılı, tutqun); qidalı mühitin səthində yerləşməsi (qabarıq, yastı) müəyyən edilir.

Mikroskop altında koloniyalar öyrənilən zaman, kasa, dibi yuxarı olmaq şərti ilə (10-15 sm aralı) mikroskopun əşya masası üzərinə yerləşdirilir. Bu zaman koloniyaların kənarlarına (hamar, girintili-çıxıntılı), quruluşuna (homogen, dənəvari, bircinsli və ya mərkəzlə periferiya arasında müxtəliflik) diqqət yetirilir. Koloniyaların tipinin təyin edilməsi vacibdir. Bakteriya koloniyasının iki əsas tipləri ayırd edilir:

- ❖ Hamar koloniyalar – S tip (ing. Smooth-hamar) kənarı dairəvi, səthi hamar və nəm konsistensiyalı olurlar;
- ❖ Kələ-kötür (girintili-çıxıntılı) koloniyalar – R tip (ing. Rough-kələ-kötür), səthinin kələ-kötür, kənarlarının qeyri-hamar, quru konsistensiyalı olmalarıyla xarakterizə olunurlar. Mikrob dissosiasiyası zamanı “S” forma “R” formaya koloniyalara keçə bilər.

Bu iki əsas tiplərlə bərabər selikli M-tip (lat. Mucus-selikli) koloniyalar da mövcuddur. Onlar dartılan selikli konsistensiyaya malikdirlər. bakteriya kulturalarının dissosiasiya prosesində yaranırlar.

Adi gözlə seçilməyən hallarda isə koloniyaların öyrənilməsində mikroskopdan istifadə edilir, belə ki, qapaqsız halda dibi yuxarı olmaq şərti ilə əşya masası üzərinə qoyulur və 8 N-li obyektivlə koloniyaların kənarı tapılır və öyrənilir.

Hər bir növ mikrob koloniyasının özünəməxsus xüsusiyyətləri vardır və çox zaman yoluxucu xəstəliyin diaqnozunun qoyulmasında bunlardan istifadə olunur. Məsələn, taun, qarayara və s.

Yuxarıda göstərilən bütün xüsusiyyətlər araşdırıldıqdan sonra şübhəli koloniya arxa tərəfdən karandaşla qeyd olunur, bakterial ilgəklə ondan azacıq götürüb sınaq şüşəsində olan çəp aqarın səthinə köçürülür, ilgəkdə qalan hissədən isə yaxma hazırlanıb Qram üsulu ilə rənglənir və mikrobun morfolojiyası öyrənilir. Əkilmiş sınaq şüşələri isə termostatda yerləşdirilir.

Əgər lazım gələrsə, mikrob koloniyaları sayılır, mümkün olan hallarda, yəni az olduqda gözlə, koloniyalar çox olduqda isə Volf-Hügel kamerası vasitəsilə sayılır. Bu kamera, dayaq üzərində yerləşən, kvadratlara bölünmüş lövhədir. Petri kasası lövhənin altına (dayağın üstünə) qoyulur və sahəsi 1 sm² olan 10 böyük kvadrata düşən koloniyalar sayılır, bir kvadrata düşən koloniyaların ümumi miqdarı aşağıdakı düsturla hesablanır:

$$X = \pi r^2 \times 1 \text{ sm}^2 \text{ sahədə olan koloniyaların sayıdır, } x = \pi r^2.$$

Məlumdur ki, π -nin qiyməti 3,14 -ə bərabərdir, r-kasanın radiusudur, 5 sm-ə bərabərdir.

Bir kvadratda olan koloniyalar təxminən 10-a bərabərdirsə, onda

$$X = 3,14 \times 5^2 \times 10 = 785$$

Bütün bunlar mikrobların kultural xassəsinin öyrənilməsi hesab olunur.

Alınmış mikroorqanizmlərin biokimyəvi xassələrinin öyrənilməsi (III mərhələ), yəni fermentativ aktivliyin təyini. Təmiz kulturası alınmış mikroorqanizmlərin biokimyəvi xassələri, yəni fermentativ aktivliklərinin öyrənilməsi tədqiqatın üçüncü mərhələsini təşkil edir. Çəp aqarda bitmiş mikroorqanizm kulturalarını Qram üsuluyla boyadılmış yaxmaların mikroskopiyası vasitəsilə təmizliyə görə yoxlanılır. Mikroskopiya zamanı mikrobun formasına, böyüklüyünə, hüceyrələrin yerləşmələrinə diqqət yetirilir. Sporlar, kapsula, flagellalar xüsusi boyama üsulları ilə aşkar edilir.

Kulturanın identifikasiyası üçün, yəni bakteriyaların növünü və tipini təyin etmək üçün morfoloji, kultural və biokimyəvi xassələrindən başqa onların antigen və digər xassələri də öyrənilir.

Əgər yaxmada yalnız bir cinsə mənsub olan mikrob görünərsə, bu təmiz mikrob kulturası hesab olunur.

Son illər identifikasiya və antibiotiklərə qarşı həssaslığı təyin etmək üçün avtomatlaşdırılmış sistemlərdən istifadə edilir.

Təmiz kulturası alınmış mikroorqanizmləri bir-birindən identifikasiya etmək üçün onların morfoloji, kultural, tinktorial xassələrdən başqa, ifrazat məhsullarının fermentativ aktivliyinin də öyrənilməsi vacibdir. Mikroorqanizmlər öz həyat fəaliyyətləri zamanı bir sıra məhsullar ifraz edir ki, bunlar da zərərli və zərərsiz olmaqla iki qrupa ayrılır: zərərli məhsullara toksin, zərərsizlərə piqment, ferment, ətirsaçan, işıqsaçan və s. məhsullar aiddir.

Piqment. Bakteriyaların və göbələklərin bir qismi piqment əmələgətirmə xüsusiyyətinə malikdir. Piqment 20-25°C temperaturda oksigenli şəraitdə ifraz olunur. Piqment əmələ gətirmə halı günəş şüası altında daha yaxşı baş verir. Piqmentli bakteriyalar mikroskop altında rəngsiz, piqmentlər isə hüceyrələr arasında dənəciklər şəklində görünür. Piqment əmələgətmənin mühüm fizioloji əhəmiyyəti vardır. Piqment mikrobların tənəffüs prosesində iştirak edir, mikrob üçün müdafiə faktoru hesab olunur, və beləliklə də, mikrobu ultrabənövşəyi şüaların təsirindən, digər mikrobun təsirindən də qoruyur. Deməli, piqmentin antoqonist təsiri də vardır.

Əridicilərə münasibətinə görə piqmentlər aşağıdakılara bölünür:

- 1) Suda həll olan piqmentlər – bunlar mikrobun əkildiyi mühitin rəngini dəyişir. məsələn, göy-yaşıl irin çöpləri, qırmızı penisillin göbələyi;
- 2) Suda həll olmayan piqmentlər – bunlar yalnız mikrobun koloniyasını rəngləyir. Məsələn, stafilokokklar, serrasiyalar, sarsinlər;
- 3) Suda və spirtə həll olmayanlar – bunlar üzvi həll edicilər vasitəsilə (efir, xloroform və s.) mikrobdan ayrılır: bunlara azotobakteriyalar, qara aspergil göbələyi və s. aiddir.

Ferment. Ferment mikrob hüceyrəsinin həyat fəaliyyəti nəticəsində ifraz olunaraq mürəkkəb biokimyəvi proseslərin törənməsində iştirak edir. O, canlı toxumanın hasil etdiyi bioloji katalizatorudur. Ferment zülal təbiətli olub, spesifik təsirə malikdir. Onların köməyi ilə mikroorqanizm maddələr mübadiləsi aparır (qidalanma, çoxalma, tənəffüs). Fermentsiz mikrob hüceyrəsində həyat yoxdur. Fermentlər iki qrupa ayrılır:

- 1) Konstitutiv fermentlər – bunlar şəraitdən asılı olmayaraq, həmişə mikrob hüceyrəsində olur və toxuma mübadiləsində iştirak edir (lipaza, proteinaza və s.)
- 2) İnduktiv(adaptiv) fermentlər – bunlar lazım gəldikdə ifraz olunur, bu fermentlər uyğun substratın iştirakı ilə əmələ gəlir (penisillinaza fermenti).

Mikrobların bəzi fermentlərinin təyin edilməsi. Mikroorqanizmlərin biokimyəvi fəallığı onların ferment əmələ gətirmələri ilə əlaqədardır. Mikroorqanizmlərin fermentləri mikrob hüceyrəsində metabolitik prosesləri həyata keçirən bioloji katalizatorlardır. Müxtəlif mikroorqanizmlər çox vaxt bir-birindən sintez edə bildikləri fermentlərlə fərqlənilir.

Plazmokoagulyaza – sınaq şüşəsində tədqiq edilən mikrobun insan və ya dovşan qan zərdabının laxtalandırma sürətilə təyin edilir.

Hemotoksin – eritrositlərin lizisinə səbəb olur. Tədqiq edilən mikrobun qanlı aqara əkilməsi yoluyla təyin edilir. Koloniyaların ətrafında rəngsizləşən sahə əmələ gəlir.

Lesitinaza – yumurta sarısının lesitovitellini parçalayır. Tədqiq edilən mikrobun yumurta-sarılı-duzlu aqara əkilməsilə təyin edilir. Koloniyaların ətrafında mərkəzi əlvan (rəngbərəng) bulanıq sahə əmələ gəlir.

Hialuronidaza–birləşdirici toxumanın tərkibinə daxil olan hialuron turşusunu parçalayır. İçərisində tədqiq olunan kultura olan sınaq şüşəsinə hialuron turşusu əlavə edilir, 30dəq sonra 37°C-də onun üzərinə 2 damla tünd sirkə turşusu əlavə edilir. Mühitdə ferment olduqda hialuron turşusu laxtalar əmələ gətirmək xassəsini itirir.

Fibrinolizin – qidalı mühitə əlavə edilmiş qan plazmasının fibrinini əridir.

Patogen mikrobların fermentlərini təyin etmək üçün aparılan təcrübələrin metodikaları xüsusi mikrobiologiyanın müvafiq bölmələrində qeyd edilmişdir.

Fermentlər, təsir etdikləri obyektə görə iki cür olur:

Saxarolitik (amilolitik) fermentlər–fermentin saxarolitik xassələrini öyrənmək üçün mikrobun növü və cinsindən asılı olaraq mono və disaxaridlər (qlükoza, laktoza, maltoza, saxaroza və s.), yaxud da polisaxaridlər (nişasta, inulin, qlikogen) seçilir. Süddən də çox zaman istifadə olunur, belə ki, laktazanın təsirindən süd pıxtalaşır. Məsələn, bağırsaq çöpləri südü pıxtalaşdırır, qarın yatalağı çöpləri isə dəyişmir.

Fermentin saxarolitik təsirini öyrənmək üçün mikroorqanizm, əsasən Hissin əlvan sırasına əkilir. 1 sutka 37°C termostatda saxlandıqdan sonra nəticəyə baxılır. Əgər mikrobun ifraz etdiyi ferment saxarolitik xassəyə malikdirsə, şəkər parçalanar və nəticədə turşu əmələ gəlir. Hissin əlvan sırasının tərkibində olan Andreda reaktivinin təsirindən mühitin rəngi qızarar. Əgər, qaz da əmələ gələrsə, onda sınaq şüşəsindəki şüşə çubuğun içərisində hava qabarcıqları görünər. Fermentasiya olmadıqda isə qidalı mühitlərin rəngi dəyişməz və nəticədə rəngbərənglik əmələ gəlməz, elə ona görə də bu qidalı mühit Hissin əlvan sırası adlanır.

Əgər əlvan sıra yarımmaye halındadırsa, qazın əmələ gəldiyini qidalı mühitin səthində görünən çatlarla izah etmək olar. Məsələn, qarın yatalağı çöpləri şəkərləri parçaladıqda qaz əmələ gətirmir, paratif A və B isə qaz da əmələ gətirir.

Saxarolitik xassələr, Endo, Levin, Ploskiyev və s. mühitlərində də öyrənilir. Bu mühitlərin tərkibinə süd şəkəri–laktoza daxil edilir. Əgər mikroorqanizm onu turşuya qədər parçalayırsa, onda koloniyaların rəngi dəyişir. Alınan rəng mühitə əlavə olunmuş indikatorun rəngindən asılıdır.

Mikrobların proteolitik xassələrinin təyin edilməsi. Proteolitik fermentlərin təsiri, yəni miroorqanizmlərin zülalları parçalamaq xassələri jelatin, süd, qan zərdabı, pepton qarışdırılmış mühitlər vasitəsilə öyrənilir. Jelatinli mühit sütununa iynə ilə əkildikdə jelatini parçalayan (əridən) bakteriyalar mühiti müxtəlif formada əridirlər.

Peptonların fermentləşməsi prosesində mikroorqanizmlər indol (C₈H₇N), hidrogen sulfid (H₂S), ammoniak (NH₃) və digər birləşmələr əmələ gətirirlər.

Hidrogen sulfidi aşkar etmək üçün ƏPB (ət-pepton-bulyon) tökülmüş sınaq şüşəsinə, tədqiq edilən kultura əkildikdən sonra, sınaq şüşəsindəki materiala toxunmamaq şərtlə tıxacın altına qurğuşun-sirkə turşusu məhlulu hopdurulmuş nazik filtr kağızı zolağı daxil edilir: qurğuşun-sirkə turşusu (yaxud sirkə turşulu qurğuşun) Pb (CH₃COO)₂ – 30qr; natrium hidro karbonat NaHCO₃ – 1qr; distillə suyu – 100ml. İndikator kağız qurğuşun sulfidin əmələ gəlməsi nəticəsində qaralır.

Indolu aşkar etmək üçün doymuş isti oksalat turşusu (C₂H₂O₄) məhlulu hopdurulmuş indikator kağızdan istifadə edilir. Həmin qayda ilə bu zolaq da tıxacdan asılır. Indol əmələ gəldikdə kağız qızarır. Belə ki, indolun əmələ gəlməsini iki üsulla öyrənirlər. Morelə görə öyrəndikdə əvvəlcədən 12%-li oksalat turşusunda isladılmış və termostatda qurudulmuş zolaqşəkilli filtr kağızı tıxacdan asılmaqla sınaq şüşəsinə daxil edilir, 2-3 sutka termostatda saxlanılır, sonra nəticə qeyd olunur. Əgər indol alınıbsa, oksalat turşusunda isladılmış kağızın ucu qızarır. Indolun əmələ gəlməsini Erlix reaktivinin köməyi ilə də aşkar etmək olar. Bu reaktiv 5qr paradimetilamid-benzaldehiddən, 10ml təmizlənmiş və konsentrasiyalaşdırılmış fosfat turşusundan (H₃PO₄), 50ml 96 %-li etil spirtindən ibarətdir. 48 saatlıq bulyon kulturasına 1-2ml kükürlü efir əlavə edilir və möhkəm çalxalanır, sonra sınaq şüşəsinin divarı ilə 4-5 damla Erlix məhlulu əlavə edilir. 2-3 dəqiqədən sonra efir qatının altında tünd-qırmızı halqa əmələ gəlir. Bu indolun olduğunu sübut edir.

Ammonyakın əmələ gəlməsini bilmək üçün mikrob ƏPB-na əkilir, 2-3 gün termostatda saxlanılır, sonra mayeyə toxunmamaq şərtlə tıxaca lakmus kağızı bərkidilir, qırmızı lakmus kağızının göyərməsi ammoniyak əmələ gəlməsini göstərir.

Proteolitik xassəni öyrənərkən mikroorqanizmlər həm də laxtalanmış zərdabda əkilir, əgər mikrobun ifraz etdiyi fermentin proteolitik xassəsi varsa, koloniyaların ətrafında ərimə görünür.

Bir sıra aerob bakteriyalar tənəffüs prosesində hidrogen-peroksid (H_2O_2) əmələ gətirir ki, bu da hüceyrə üçün zəhər hesab olunur. Onun miqdarı heç vaxt kulturada çoxalmır, çünki, katalaza fermentinin təsirindən su və molekulyar oksigenə parçalanır. Ona görə də katalaza aktivliyini təyin etmək lazım gəlir. Bunun üçün əşya şüşəsi üzərinə 1-2 damla 1%-li H_2O_2 tökülür və çəp aqarın səthində bitmiş sutkalıq kulturadan bakteriyalar götürüb ilgəklə ona qarışdırılır. Bu zaman katalaza fermenti təsirindən hava qabarcıqlarının əmələ gəlməsi görünür, yəni su ilə molekulyar oksigenin çıxması baş verir. Məlum olduğu kimi, bir sıra mikroblarda reduksiyaedici (bərpa edici) qabiliyyət mövcuddur. Bu xüsusiyyətin olmasını təyin etmək üçün bulyona və ya aqara metilen abısı, lakmus, neytralrot və s. rənglərdən biri qatılır, sonra mikrob həmin qidalı mühitə qatılır. Əgər bu mikrobda reduksiyaedici qabiliyyət varsa, onda həmin qidalı mühit rəngsizləşir. Anaerob bakteriyaların fermentativ aktivliyini öyrənmək üçün sütun şəklində tökülmüş düz aqar əlvan sıradan istifadə edilir.

Anaerob bakteriyaların təmiz kulturasının alınma üsulları.

Obliqat anaerob bakteriyaların təmiz kulturalarının alınma üsulları. Müayinə materialı, birinci gün ölçülü, yaxud Paster pipetkası vasitəsilə Kitt-Tarotsi mühitinə əkilir və termostata qoyulur. İkinci gün mühitdə bakteriyaların yığılması, mühitin dəyişməsi, yəni bulanıqlığı, yaxud bulanıqlıqla bərabər qaz əmələ gəlməsi nəzərdən keçirilir. Bulyon kulturası, vazelin yağı təbəqəsini keçərək sınaq borusunun dibinə qədər çatan Paster pipetkasına sorulur. Pipetkanın xarici səthində olan yağ təbəqəsi dezinfeksiyaedici məhlulda isladılmış steril pambıq tamponla təmizlənir. Sonra götürülmüş kulturadan əşya şüşəsi üzərində adi qaydada yaxma hazırlanır, alov üzərində fiksasiya edilir və Qram üsulu ilə boyanır.

Mikroskopiya zamanı Qram müsbət çöpvari bakteriyaların (sporlu, yaxud sporsuz) olması nəzərə alınır və həmin bulyon kulturasından bərk mühit səthinə köçürülür. Təcrid olunmuş tək-tək koloniyalar iki üsulla əldə edilir.

Seyssler üsulu. Əvvəlcə içərisində qanlı-şəkərli aqar olan üç Petri kasası hazırlanır. 1-ci kasaya bir damla bulyon kulturasından damızdırılır və şüşə şpatel vasitəsilə həmin damla mühit səthində yayılır. Həmin şpatel ətrafa toxundurulmadan ardıcıl olaraq 2-ci və 3-cü kasalarda olan qidalı mühitin səthinə sürülür, sonra kasaların qapağı bağlanaraq anaerostata, yaxud dugər aparatın içərisinə qoyulur, aparat isə $37^{\circ}C$ -də 24-48 saat termostata saxlanılır. 3-cü gün kasada əmələ gəlmiş tək-tək koloniyalardan yaxma hazırlanaraq mikroskopiya edilir. Koloniyanın qalığı isə Kitt-Tarotsi mühitinə əkilərək təmiz kultura alınır, sonra identifikasiya edilir.

Veynberg üsulu. Bu üsulla təmiz kultura almaq üçün müayinə olunan material əvvəlcə Kitt-Tarotsi mühitinə əkilir. Kitt-Tarotsi mühitində bulanığın və qaz qabarcıqlarının əmələ gəlməsi anaerobların inkişaf etdiyini göstərir. Aqar dərinliyində təcrid olunmuş koloniyalar əldə etmək üçün ucu lehimlənmiş Paster pipetkası Kitt-Tarotsi mühitinə daxil edilir. Sonra həmin pipetka içərisinə əridilmiş və $50^{\circ}C$ -yə qədər soyudulmuş aqar tökülmüş bir cərgə sınaq şüşələrinin birincisinə daxil edilir. Sonra pipetka birinci sınaq şüşəsindən çıxarılır, ikinci sınaq şüşəsinə daxil edilir və bu qayda üzrə ardıcıl olaraq bütün sınaq şüşələrində material durulaşdırılaraq əkilir. Sonra hər sınaq şüşəsindəki aqar ayrı-ayrı Veyon borularına sorulur. Veyon borularının ucları lehimləndikdən sonra aqar bərkiyə qədər sürətlə soyudulur (soyuq sudan və ya soyuducudan istifadə etmək olar), şaquli vəziyyətdə ştativə yerləşdirilir və termostata $37^{\circ}C$ -də inkubasiya edilir. Bir-iki günlük inkubasiyadan sonra aqar dərinliyində koloniyalar əmələ gəlir. Daha yüksək durulaşma aparılmış borularda təcrid olunmuş seyrək koloniyalar inkişaf edir. Koloniyaların bitmə xassələrinə görə onlar seçilir və seçilmiş koloniyayı götürmək üçün boru həmin yerdən mişarlanır. Mişarlanmış borunun içərisindəki aqar steril Petri kasasına boşaldılır. Kasaya tökülmüş aqardan koloniyayı steril bakterioloji ilgəklə götürüb yenidən Kitt-Tarotsi mühitinə əkməklə təmiz kultura alınır.

Anaerobların identifikasiyası üçün istifadə edilən qidalı mühitlər. Anaerob qanlı aqar. Bu eritrit-aqar əsasında hazırlanır. Əlavə kimi 199№-li mühitdən (10%), hemindən (10 mkq/ml), tvin – 80-dən (0,1 %), menadion (10mkq/ml), sitratlı qandan (5%) və b. istifadə edilir. Hazırlandıqdan və sterilizasiya edildikdən sonra Petri kasalarına tökülür. Əkin aparmaq üçün kasalara təzə tökülmüş (hazırlandıqdan 1,5-2 saatdan gec olmayaraq), yaxud reduksiya edilmiş (bir gecə-gündüzdən çox olmayaraq anaerob şəraitdə saxlanılan) mühitlərdən istifadə edilir.

Selektiv əlavələr qarışdırılmış anaerob qanlı aqar. Fakultativ-anaerob bakteriyaların inkişafının qarşısını almaq məqsədilə qidalı mühitə aşağıda göstərilən antibakterial preparatlardan biri əlavə edilir: neomisin yaxud kanamisin (75-80 mkq/ml), nalidiksın turşusu (40 mkq/ml). Bu

əlavələrlə bərabər, əkilmiş qidalı mühitin səthinə kanamisinli 2-4 ədəd disk də yapışdırılır (hər diskdə 1000 mkq).

Yumurta sarılı aqar. Eritrit-aqar əsasında hazırlanmış qidalı mühitə hemin (10mkq/ml), qlükoza (0,2%), yumurta sarısı suspenziyası (20%) və bəzi digər inqredientlər (maddələr) əlavə edilir. Petri kasalarına tökülür. Anaerob bakteriyaların lesitin-vitellaz və lipaza fəallığını təyin etmək üçün istifadə edilir. Zesitinaza fermenti olduqda (*Cl.perfringens*in alfa-toksin əmələ gətirməsini) kasada inkişaf etmiş mikroorqanizm koloniyalarının ətrafında bulanıq sahə (presipitat) əmələ gəlir. lipaza olduqda isə çəp işıqlanmada görünən parıltılı şəfəqli sahə əmələ gəlir.

Sterilliyə nəzarət(kontrol) mühitlər (SKM). Bunlar kommersiya qidalı mühitləridir. Həm daşınma (nəqliyyat) mühitləri kimi və həm də zənginləşdirmə mühitləri kimi istifadə edirlər. Selektiv əlavələrlə istifadə edilə bilirlər. Sınaq şüşələrinə “hündür sütunlar” şəklində tökülür. Qidalı mühiti zənginləşdirmək məqsədilə əlavə boy amilləri kimi 199№-li mühiti (10%), hemin (10mkq/ml), tvn-80 (0,1%), menadion (10mkq/ml) və digər maddələrdən istifadə edilir.

Bakteremiyaya görə qanın yoxlanılması üçün mühitlər. Zənginləşdirilmiş SKM əsasında hazırlanılır. Flakonlara, 100-200ml miqdarında tökülür. Qan 5-10ml miqdarda əkilir (xəstənin yatağı yanında).

Kitt-Tarotsi mühiti. Hottinger bulyonu əsasında hazırlanır və ona qaraciyər və ya ət tikələri əlavə edilir, sonra sınaq şüşələrinə tökülür. Zənginləşdirici mühit məqsədilə istifadə edilir. Patoloji material əkildikdən sonra havanın oksigeninin keçməməsi diffuz etməməsi üçün mühitin səthinə az miqdarda vazelin yağı, yaxud əridilmiş parafin tökülür.

Vilson-Bler mühiti. Natrium sulfat (1%) və dəmir xlorid (0,08%) əlavə edilməklə şəkərli aqar əsasında hazırlanır və sınaq şüşələrinə “hündür sütunlar” şəklində tökülür. Qazlı qanqrenanın təcili diaqnostikası üçün istifadə edilir. Müayinə edilən materialda *Gl.perfringens* olduqda, 42°C temperaturda inkubasiya edildikdə 2-4 saatdan sonra mühit kərpici-qırmızı rəng alır, mühitə diffuz edən qaz qabarcıqları və kəsmik şəkilli kazein çöküntüləri və şəffaf zərdab əmələ gəlir.

Şəkərli aqar. 1% qlükoza əlavə edilməklə eritrit-aqar əsasında hazırlanılır. 10-15ml miqdarında sınaq şüşələrinə tökülür. Anaerobların Veynberq, Veyon-Vinyal, Perets üsulları ilə alınması üçün işlədilir.

Anaerobların saxarolitik xassələrini təyin etmək üçün işlədilən mühitlər. Bu mühitlərin tərkibində 0,5% ət-peptonlu aqar, 1% tədqiq edilən şəkər və pH indikatoru olur. Sınaq şüşələrinə “hündür sütun” şəklində tökülür. Vazelin yağının əlavə edilməsi tələb olunmur.

