

5-mavzu: MIKROORGANIZMLARNI O‘STIRISH

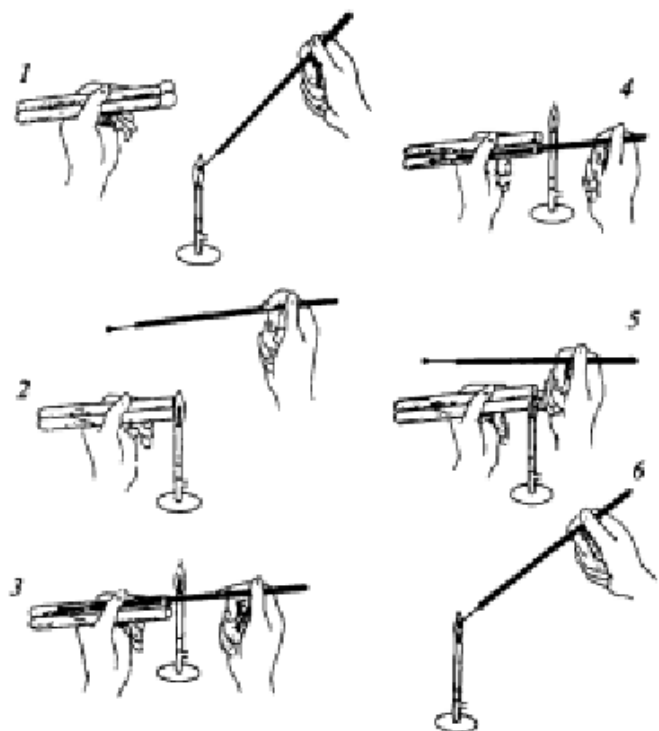
Mashg'ulot o'tkazishdan maqsad. Mikroorganizmlarni suyuq va qattiq ozuqa muhitiga ekish va qayta ekish usullarini o'rganish, har xil mikroorganizmlarning yig'ma (elektiv) to'plamini, shuningdek, ularni qattiq ozuqa muhitli Petri likobchasiga ekish yo'li bilan toza to'plam olishni o'rganish.

Mikroorganizmlarni ekish va qayta ekish usullari

Har xil substratlardan mikroorganizmlarni ajratib olish, ularning toza to'plamlarini ko'paytirish va aktiv holatda saqlash uchun ular laboratoriya sharoitida ekiladi va qayta ekiladi. Tekshiriladigan materialdan ozgina olib, ozuqa muhitiga ekish inokulyatsiya (ekish) deb, boshqa yangi ozuqa muhitiga ekish qayta ekish deb ataladi. Ekishda va qayta ekishda quyidagi usullarga amal qilish zarur :

Probikadan Petri likopchasiga ekishda quyidagi ishlar amalga oshiriladi:

1. Petri likopchasining ustiga mum qalam yordamida talabanning ismi, guruhining raqami, sana yoziladi.
2. Yuqorida aytilganday, probirkadan ilmoq bilan kultura olinadi.
3. Bo'sh qo'l bilan Petri likopchasining qopqog'i ochiladi, lekin stolga qo'yilmaydi va likopcha ustida ushlab turiladi.
4. Petri likopchasidagi oziqli muhitga ilmoqdagi kultura "shtrix" usulida ekiladi. Bunda agarni o'ymasdan ehtiyot qilib ekish lozim (6-rasm).
5. Petri likopchasi yopiladi.
6. Ilmoq flambirlanadi va joyiga qo'yiladi. Ekmalar 28°C da keyingi darsgacha o'stiriladi. Aseptika qoidasiga rioya qilingan bo'lsa Petri likopchasida faqat sof kultura o'sadi, aksincha qoidaga rioya qilinmasa likopchada har xil rangli va har xil kattalikdagi bakteriya koloniyalari o'sib chiqadi. Preparat tayyorlab mikroskop ostida ko'rilganda ko'rish maydonida biz ishlayotgan kulturadan tashqari shakli va o'lchamlari turlicha bo'lgan mikroorganizmlarni kuzatish mumkin. Bunday mikroorganizmlar bilan ishlash usuli mikrobiologik aseptika qoidalariga xilof bo'ladi va ishni qaytadan bajarish talab qilinadi.



Mikroorganizmlar to'plamini qayta ekish.

1. O'ng qo'lida esa bosh va ko'rsatkich barmoq bilan bakterial ilmoqni ushlab turib, gorelka alangasida sterillanadi.
2. Ikkala probirkaning paxta tiqinini olib, o'ng qo'lning jimjilog'i va nomsiz barmog'i bilan qo'l kaftiga bosib turiladida, probirkaning chetlari kuydiriladi. Paxta tiqinlar boshqa biror narsaga tegib ketmasligiga e'tibor berish kerak.
3. Ilmoq qayta ekiladigan mikrob to'plami bo'lgan probirkaga tushiriladi. Probirka devorlariga tegib ketmasdan ehtiyotlik bilan bir tomchi suyuq to'plam olinadi. Agar qiya agar yuzasidan olib qayta ekiladigan bo'lsa, ilmoqni sovitish uchun oldin u to'plami yo'q agarga botirib olinadi, shundan keyin qattiq qiya muhitdan ozgina mikrob massasi olinadi.
4. Keyin mikrob materiali bo'lgan ilmoq sterillangan suyuq muhitli probirkaga tushiriladi. Bunda probirka devorlariga tegib ketmaslik kerak. Qiya ozuqa muhitiga ekishda mikroorganizmlar hujayrasi bo'lgan ilmoq probirkaning ozginagina kondensatsion suv to'plagan tubigacha tushiriladi. Keyin ehtiyotlik bilan, ozuqa muhitini titib yubormay, probirka tubidan ozuqa muhit yuzasigacha shtrix chiziq chizib chiqiladi.
5. Ilmoqni probirkadan olib, uning chetlari va tiqinining ichki tomoni kuydiriladi, shundan keyin probirkalarning og'zi berkitiladi.
6. Ilmoq gorelka alangasida qayta qizdiriladi.
- 7 Probirkaga: to'plamning nomi va ekish muddati yozib qo'yiladi. Yozuv shishaga yozadigan siyohda yoki qalamda yoziladi yoki etiketka yopishtiriladi. To'plam o'sishi uchun ekilgan probirkalar termostatda doimiy temperaturada saqlanadi.

Yuqorida bayon etilgan ishlar gorelka alangasi yonida (lekin alanga ustida emas), iloji boricha tez bajariladi, aks holda to'plam begona mikroorganizmlar bilan ifloslanadi.

Toza to'plam bilan ishlovchi shaxs oldida keskin harakatlanish, yurish, yo'talish, gapirish mumkin emas, chunki havoning harakati to'plam va muhitning tasodifiy ifloslanish xavfini ko'paytiradi. Shuning uchun mikroorganizmlarni yaxshisi bokslarda ekish va qayta ekish kerak.

Suyuq muhitga to'plamlar ilmoqda yoki pipetkada ekiladi.

Bunda paxta tiqini ho'l bo'lmasligi uchun har ikkala probirka qiya holatda ushlanadi. Mikroorganizmlar bo'lgan ilmoq bevosita sterillangan muhitga tushiriladi va chayiladi. Hujayralarni (qattiq muhitdan ilmoqda olingan) probirkaga o'tkazishda material uning devoriga yaxshilab ishqalanadi (suyuq muhit yuzasi sathida) va har doim muhit bilan yuvib turiladi.

Qattiq muhitga to'plamlar ignada, ilmoqda va Drigalskiy shpatelida ekiladi. Qiya agarga mikroorganizmlar turli usullarda ekiladi: zigzagsimon shtrix qilib ekishda ilmoq muhit yuzasida probirkaning bir devori chekkasidan ikkinchisiga tomon erkin surkab sirpantirib boriladi; to'g'ri chiziq bo'ylab ekishda ozuqa muhiti yuzasining o'rtasidan pastdan yuqoriga tomon ilmoqda to'g'ri chiziq chiziladi; materialni muhitning butun yuzasi bo'ylab ehtiyotlik bilan aylantirib ishqalash yo'li bilan ham ekiladi.

Petri likopchasiga quyidagicha ekiladi: qattiq ozuqa muhiti probirkada yoki kolbada eritib (qaynayotgan suv hammomida), 48-50°C gacha sovutiladi va sterillik qoidalariga amal qilgan holda probirka yoki kolba ichidagi material gorelka alangasi ustida sterillangan likopchaga 3-5 mm qalinlikda quyiladi va sekin aylantirib harakatlantirib bir tekis yoyiladi. Sovigan muhitni termostatda o'zina quritish mumkin. Keyin ilmoqda parallel yoki zigzagsimon shtrixlar shaklida siyrak ekish usulida yoki Drigalskiy shpatelida ekiladi. Shpatel, odatda, bir uchi uchburchak shakldagi shisha tayoqcha bo'ladi. Petri likopchasidagi qattiq ozuqa muhiti yuzasiga ekiladigan materialdan kichik tomchi tomizib, shpatelda sekin-asta oziqa muhiti yuzasi bo'ylab yoyiladi. Ekish vaqtida likopchaning qopqog'i gorelka alangasi tomonga qarab ochiladi. Ekib bo'lingandan keyin shpatelni olovda qizdirib, shpatelga qo'yiladi. Keyin likopcha qopqog'ining ustiga to'plamning nomi, ekilgan vaqti va talabaning familiyasi yozib qo'yiladi. Likopchalar to'ntarib qo'yiladi. Bunda koloniyalar bir-biriga qo'shilib ketmaydi.

Probirkalardagi GPA yoki go'sht-peptonli jelatina ustuniga mikroorganizmlar igna yordamida ekib o'stiriladi.

Ekilgan va tegishli yozuvlar yozilgan probirka, kolba va Petri likopchalari to'plam o'sishi uchun termostatga qo'yiladi.

Mikroorganizmlarning yig'ma (elektiv) to'plamini olish usullari

Tarkibida mikroorganizmlar yaqin turlarining yoki hatto bir turining vakillari ko'pchilikni tashkil etgan to'plamlar yig'ma yoki elektiv deb ataladi (lotincha e lestus- tanlangan degani). Oziq-ovqat mahsuloti (yoki boshqa obyekt) ning mikroflorasi tarkibini o'rganishda yig'ma to'plamdan toza to'plam ajratib olinadi. Yig'ma to'plam olish uchun tekshiruvchini qiziqtiradigan

mikroorganizmlarning ko'plab rivojlanishini ta'minlovchi sharoit yaratiladi. Buning uchun eng avvalo o'ziga xos tanlama muhitdan foydalaniladi; ular mikroorganizmlar muayyan guruhlarining ozuqa muhitiga bo'lgan fiziologik talabini eng to'liq ta'minlaydi. Bu muhitlar birga uchraydigan boshqa mikroorganizmlar uchun kam foydali yoki ular uchun umuman yaroqsiz bo'lishi kerak.

Muhit reaksiyasi (pH), temperatura, kislorod bor-yo'qligi, antibiotiklarga va boshqa birikmalarga chidamliligi yig'ma to'plam olishga ta'sir etadigan muhim omillardir. Masalan, muhitning kislotaliligi oshirilib, bakteriyalarning rivojlanish imkoniyati yo'qotiladi va achitqi hamda mitseliyli zamburug'larning o'sishi uchun qulay sharoit yaratiladi. Termofil organizmlarning yig'ma to'plami 45-65°C, ba'zan hatto 70-75°C temperaturada olinadi. Muhitga ma'lum konsentratsiyada penitsillin qo'shilsa, grammanfiy bakteriyalarning yoki achitqilarning rivojlanishiga ta'sir etadi. Neomitsin yoki penitsillin streptomitsin bilan birgalikda bakterial mikroflorani nobud qiladi va achitqilarning rivojlanishi uchun sharoit yaratadi. Nistatin esa aksincha, bakteriyalarga ta'sir etmay, achitqilarning hayot faoliyatiga to'sqinlik qiladi.

Aeroblarning yig'ma to'plamini olish uchun ozuqa muhitni kolbalarga yupqa qilib (1,5-2 sm) quyib, tebratma uskunada (kachalkada) o'stiriladi. Anaerob mikroorganizmlar bilan boyitish uchun muhit uzun probirkalarga yoki flakonchalarga to'ldirib quyiladi.

Bitta elektiv muhitning o'ziga yana ikkinchi marta qayta ekilishi va ma'lum turlar uchun qulay bo'lgan sharoit yaratilishi natijasida to'plam asta-sekin kerakli xossaga ega bo'lgan mikroorganizmlar bilan boyib boradi, birga uchraydigan formalar kamayadi.

Quyida oziq-ovqat sanoatida ishlatiladigan, amalda muhim ahamiyatga ega bo'lgan ayrim mikroorganizmlarning, shuningdek, oziq-ovqat mahsulotlarini buzadigan, ko'p tarqalgan qo'zg'atuvchilarning elektiv to'plamini olish usullari bayon etiladi.

Har bir talaba biror elektiv to'plamni oladi, ya'ni mavzuning bitta topshirig'ini bajaradi. Har qaysi topshiriq ikkita laboratoriya mashg'ulotida bajariladi: birinchi mashg'ulotda ma'lum bakteriyalarni to'plash-yig'ish uchun tajriba o'tkaziladi; ikkinchi mashg'ulotda tajriba natijasi tahlil qilinadi. Sut achituvchi bakteriyalarning yig'ma to'plamini olish. Bunda qatiq, tuzlangan sabzavot va mevalar, o'simliklar guli yoki bargi va boshqa obyektlar sut achituvchi bakteriyalarni ajratib olish uchun boshlang'ich material bo'lib xizmat qiladi.

Sut achituvchi bakteriyalar o'stiriladigan elektiv muhit 3-ilovada berilgan. Ye. I. Kvasnikov sut achituvchi bakteriyalarning spirtga chidamliligini hisobga olib, sut achituvchi mezofil bakteriyalarning yig'ma to'plamini olishning quyidagi usulini taklif etdi: tekshiriladigan material optimal muhitga ekiladi va 18-24 soatdan keyin unga etil spirti qo'shiladi. Sut achituvchi kokklarni ajratib olish uchun muhitdagi spirt konsentratsiyasini 8-10 hajm %, sut achituvchi tayyoqchalar uchun 12-14 hajm % darajada saqlash mumkin. Spirtli manbalar (vino, brajka, pivo) dan ajratib olingan ba'zi turlar (*Lactobacillus buchneri*, *L. brevis*, *L. fermenti*) uchun spirt konsentratsiyasi 16-18 hajm % gacha oshiriladi.

Sut achituvchi termofil bakteriyalarning yig'ma to'plamini olish uchun solod sharbati bo'lgan kolbaga ozgina yanchilgan arpa yoki arpa solodi qo'shib, termostatda 48- 50°C da saqlash mumkin. 1-2 kundan keyin muhit qavatida tovlanadigan kuchsiz to'lqinsimon loyqa paydo bo'ladi; mikroskopda tekshirilganda ingichka, uzun, harakatlanmaydigan sporasiz tayoqchalar ko'rinadi. Achitqilarning yig'ma to'plamini olish. Boshlang'ich material sifatida presslangan yoki ekiladigan ishlab chiqarish achitqilaridan, pishgan uzum, rezavor mevalardan, pivo yoki vino cho'kmasidan, non achitqilari va hokazolardan foydalanish mumkin. Materialdan ozgina olib, solod sharbatiga (pH 4-4,5), uzum sharbatiga yoki sintetik elektiv muhitga qo'shilsa va termostatda 28-30°C da saqlansa, achitqilar avj olib rivojlanadi. Solod sharbatida avj olib, rivojlanadigan mitseliyli zamburug'lari o'sishining oldini olish uchun 4-6 hajm % etil spirti yoki 0,2 % natriy propionat qo'shish mumkin. Birga uchraydigan bakteriyalar muhitga levomitsetin (50 mg/1), neomitsin (20 birlik/mg) yoki penitsillin bilan streptomitsinning aralashmasini (50- 100 birlik/ ml) qo'shib yo'qotiladi. Takomillashmagan achitqilarni yo'qotish uchun ozuqa muhitiga 0,1-0,2 % miqdorda yod-sirka kislota yoki lizinli sintetik muhitga boshlang'ich materialdan qo'shiladi. Saxaromitsetlarni boshqa achitqilardan ajratib olish uchun muhitga 2,5 % etilatsetat qo'shib, sirka kislota bilan muhit pH 4,0 gacha yetkaziladi.

Spora hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma to'plamini olish. Bu to'plamlar dastlab pasterlangan substratlardan olinadi. *Bacillus subtilis* ning yig'ma to'plami uchun maydalab qirg'ilgan pichan ustiga 40°C gacha isitilgan suv quyib, keyin 10-15 minut qaynatiladi. 2-3 kundan keyin substrat yuzasida akatsiya hidi anqib turadigan kulrang-oq plyonka hosil bo'ladi. U *B. subtilis* tayyoqchalaridan tashkil topgan bo'ladi.

Moy kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma to'plamini olish. Buning uchun bo'r (mel) qo'shilgan sterillangan kartoshkali muhitdan foydalaniladi. Muhitni probirkalarga 10 ml dan yoki 100 ml li kolbachalarga 80 ml dan quyib oquvchan bug'da yoki avtoklavda 0,05 MPa da sterillanadi. Ekishdan oldin muhitni albatta 20-30 minut qaynatib, keyin tezda suv bilan sovutiladi. Boshlang'ich materialni sterillangan suvda ishqalab, probirkalarga 1-2 ml dan yoki kolbachalarga 8-10 ml dan ekiladi. Shuningdek, boshlang'ich materialni shakarining 10 % li eritmasi to'latilgan va tubida bo'r cho'kmasi bo'lgan ingichka uzun bo'yinli kolbaga ham ekish mumkin. Muhitga kichik bo'lak aynigan pishloq qo'shiladi.

Moy kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma to'plamini olishning oddiy (sodda) usuli quyidagicha: uzun bo'yinli kolbaga po'chog'i archilmagan kartoshkadan bir necha bo'lak solib, ustiga suv quyiladi va 80°C da 10 minut pasterlanadi, shundan keyin termostatga 37°C issiqqa qo'yiladi. 1-2 kundan keyin mikroskopda qaralganda suyuqlikda spora hosil qiluvchi juda ko'p tayoqchalar borligini ko'rish mumkin.

Sirka kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma to'plamini olish. Buning uchun 50 ml hajmli konussimon kolbaga ozuqa muhiti - pasterlangan pivodan

yupqa qatlam qilib (1-1,5 sm) quyib, unga 1 ml 5% li sirka kislotasi qo'shiladi. Muhitga kislota qo'shish sirka kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning rivojlanishiga to'sqinlik qilmaydi, lekin begona mikrofloraning o'sishini cheklab qo'yadi. Kolba termostatga 25-30°C issiqqa qo'yiladi. 2-3 kundan keyin pivo yuzasida sirka kislota hosil qiluvchi bakteriyalar plyonkasi paydo bo'ladi. Spora hosil qilmaydigan bu bakteriyalar mayda tayoqchalardir, ular harakatchan yoki harakatlanmaydigan bo'ladi.

Sirka kislota hosil qiluvchi bakteriyalarning yig'ma to'plami solodli yoki karamli muhitda ularga 4 hajm % etil spirti va 20 birlik/ml monomitsin antibiotigi qo'shib, bu muhitlarga achigan vino, pivo yoki boshqa materiallarni ekish yo'li bilan olinadi.

Chirituvchi bakteriyalarning elektiv to'plamini olish.

Protey (*Proteus vulgaris*) va kartoshka tayoqchasi (*Bac. m esen tericu s*) chirituvchi bakteriyalarning tipik vakillari hisoblanadi. Bularning yig'ma to'plamini olish uchun ichida sterillangan GPB bo'lgan probirkaga ozgina tuproq solinadi. Probirkaning og'zi paxta tiqin bilan berkitiladi. Bunda keyinchalik oqsilning ayrim parchalanish mahsulotlari (NH_3 va H_2S) hosil bo'lishini aniqlash maqsadida tiqin tagiga nam lakmus qog'oz va qo'rg'oshin atsetat shimdirilgan filtr qog'oz lentasi bir uchi bilan qistirib qo'yiladi. Qog'ozlar probirka devoriga tegmasdan erkin osilib turishi kerak. Tarkibidagi ammiak va vodorod sulfid uchib ketmasligi uchun probirkaning paxta tiqini ustiga sellofan o'rab yoki rezina qalpoqcha kiydirib qo'yiladi. Keyin probirka termostatda 30°C issiqda 2-3 kun saqlanadi. Vaqt o'tishi bilan lakmus qog'ozning ko'karishi ammiak ajralayotganidan dalolat beradi. Agar vodorod sulfid ajralsa, qo'rg'oshin atsetat bilan namlangan qog'oz qorayadi (yoki qo'ng'ir rangga kiradi), chunki bunda qo'rg'oshin atsetat qora rangli qo'rg'oshin sulfatga aylanadi. Mikroskopda ko'rish uchun "ezilgan tomchi" preparati tayyorlanadi va tayoqchalarning harakatlanishi o'rganiladi, shuningdek, fiksirlangan preparat tayyorlanadi, "oddiy" usulda bo'yaladi va hujayralarning shakli hamda sporalar bor-yo'qligi o'rganiladi.

Proteylarning yig'ma to'plamini olish.

Protey nihoyatda harakatchanligi bilan xarakterlanadi. U mayda tayoqcha shaklida bo'lib, spora hosil qilmaydi, Gram usulida bo'yalmaydi. Ayrim xillari toksin ishlab chiqaradi. Bu bakteriyalar ko'paygan mahsulot iste'mol qilinsa, zaharlanish mumkin.

Yig'ma to'plam olish uchun qiya go'sht-pepton agarli probirkaga bug'doy donidek aynigan go'sht tashlab, og'zi paxta tiqin bilan berkitiladi va termostatda 30°C issiqda 1-2 kun saqlanadi. Protey aktiv harakatlanadigan bo'lgani uchun boshqalardan oldin qiya agar yuzasida chirmashib o'sib, uning yuqori qismida o'ziga xos och havorang-kulrang mayin g'ubor hosil qiladi. Ana shu g'ubor (nalyot) ning eng yuqori qismidan olib "ezilgan tomchi" preparati tayyorlanadi. Uni mikroskopda ko'rilsa hujayralarning shakli va harakatchanligini qayd etish mumkin.

Kartoshka tayoqchasining yig'ma to'plamini olish.

Bacillus mesentericus spora hosil qiluvchi harakatchan tayoqcha. Uning yig'ma to'plamini olish sporalarning issiqqa chidamliligiga va ishlatiladigan ozuqa muhitining o'ziga xosligiga (spetsifikligiga) bog'liq. 1 sm qalinlikdagi 1-2 bo'lak kartoshkani olib, hujayra shirasining kislotalarini neytrallash uchun har tomoni bo'r bilan ishqalanadi. Keyin shu kartoshka bo'lakchalarini Petri likopchasiga qo'yiladi. So'ngra likopchani Kox apparatiga qo'yib, oquvchan bug'da 100°C da 10 minut qizdiriladi. Sovitilgandan keyin termostatga quyib, 100°C da 2—3 kun saqlanadi. Kartoshka bo'lakchalari ustida *B. mesentericus* jigar rang mayda yoki yirik burmali g'ubor shaklida o'sadi. G'uborni mikroskopda ko'riladi, “ezilgan tomchi” va oddiy usulda bo'yalgan preparat tayyorlanadi.