

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

**ABU RAYHON BERUNIY NOMIDAGI
TOSHKENT DAVLAT TEXNIKA UNIVERSITETI**

BIOTEXNOLOGIYA ASOSLARI

fanidan laboratoriya ishlarini bajarish uchun uslubiy qo‘llanma

Toshkent 2015

“Biotexnologiya asoslari” fanidan laboratoriya ishlarini bajarish uchun uslubiy qo‘llanma / Safarov J.E., Sattarov M.E., Sh.A. Sultanova. – Toshkent.: ToshDTU, 2013. – 36 b.

“Biotexnologiya asoslari” fanidan amaliyot ishlarini bajarish uchun tayyorlangan ushbu uslubiy qo‘llanma 532500-biotexnologiya (biofaol moddalar biotexnologiyasi) yo‘nalishida tahsil olayotgan bakalavriat talabalari uchun mo‘ljallangan.

Taqrizchilar: A.S. Mengliyev – Toshkent Davlat texnika universiteti ilmiy tadqiqotlar marketingi bo‘limi boshlig‘i, kimyo fanlari nomzodi.
Z.R. Axmedova – O‘zR FA Mikrobiologiya instituti “Mikroorganizmlar fermentlari” laboratoriyasi mudiri, biologiya fanlari doktori, professor.

1 – laboratoriya ishi

Mavzu: Biotexnologiya laboratoriyasiga qo'yiladigan asosiy talablar va asbob-uskunalar bilan ishlash tartibini o'rganish

Ishdan maqsad: talabalar maxsus laboratoriya yoki o'quv laboratoriyasida ishlash tartibi va asosiy uskunalar bilan tanishadilar hamda foydalanishni o'zlashtirishadi.

Tushintirish:

Biotexnologiya – yoki biologik jarayonlar texnologiyasi – biologik agentlar yoki ularning majmualaridan (mikroorganizmlar, o'simliklar va hayvon hujayralari, ularning komponentlaridan) kerakli mahsulotlar ishlab chiqarish maqsadida sanoatda foydalanish degan ma'noni beradi.

Adabiyotlarda “Biotexnologiya” atamasiga mutaxassis olimlar tomonidan turli xil ta'riflar berib kelinmoqdaki, fanning hozirgi rivojlangan davrida ham birorta aniq to'xtamga kelinmagan. Quyida biotexnologiya sohasining yituk olimlari tomonidan ushbu terminga berilgan ta'riflarga to'xtalib o'tamiz.

a) Anbash, A. Xemferi, N. Millislarning (1975) fikriga ko'ra “Biotexnologiya” – yangi biokimyoviy ishlab chiqarishlar mahsulidir (vitaminlar, antibiotiklar).

b) “Biotexnologiya” moddalarni biosintez usuli orqali ozuqa olish fanining bo'limi bo'lib, u “bioinjeneriya” sohasi bilan bog'liqdir.

v) Xasting A. (1983) fikri bo'yicha “Biotexnologiya” – pivo, vino, pishloq, vitaminlarni sanoat asosida olish jarayonidir.

g) 1980 yil Yevropa Federatsiyasi Kengashi muhokomasida “Biotexnologiya” – biologik tizimlarni sanoat asosidagi jarayon deb qaralgan.

d) 1983 yil Bratislavada bo'lib o'tgan kengashda “Biotexnologiya” – moddalarni katta miqdordagi sanoat asosida (biokatalizatorlar orqali) olish va atrof muhitni himoya qiladigan fan deb ta'riflangan.

e) Bayev A.A. (1986), Ovchinnikov Yu.A. (1982) “Biotexnologiya” biologik jarayonlarni ishlab chiqarishga joriy etish to'g'risidagi fan deb ta'riflashgan.

Biotexnologiya jarayonlaridan mikroorganizmlar, o'simlik va hayvon hujayralari, ulardan ajratilgan fermentlar, hujayra organnellalari, ularni o'rab turgan membranalar sof yoki immobillashgan holatda oqsil, organik kislotalar, aminokislotalar, spirtlar, dorivor moddalar, fermentlar, gormonlar va boshqa moddalar ishlab chiqarishda yoki ba'zi bir organik moddalarni (masalan, biogaz) ishlab chiqarish, sof holda

metall ajratish, oqova suvlarni va qishloq xo'jalik yoki sanoat chiqindilarini qayta ishlashda keng foydalaniladi.

Gen muhandisligi – biotexnologiya fanining ushbu bo'limi imkoniyatlaridan foydalanib, hozirgi vaqtda qaysi produsent organizmdan foydalangan holda foydali mahsulotlar olish mumkinligini aniq ko'rsatib berish mumkin. Agarda bunday produsent bo'lmasa, qay tariqada va qanday sharoitda yuqori darajada istalgan turdagi mahsulotni olish xususiyatni namoyon qiluvchi produsentni yaratish mumkinligini oldindan aytib berish imkoniyatlari mavjuddir. Biotexnologik ishlab chiqarishda bugungi kunda mikroorganizmlarni minglab shtammlaridan foydalanilmoqda.

O'zbekiston respublikasi mustaqillikka erishgandan so'ng qishloq xo'jaligi, xalq xo'jaligi va oziq-ovqat ishlab chiqarish sohasiga bo'lgan munosabat tubdan o'zgardi. Shu boisdan oziq-ovqat mahsulotlari ishlab chiqarish sohasi mutaxassislari jahon xalq xo'jaligida keng ko'lamda qo'llanilayotgan biotexnologiya fanini zamonaviy ko'rinishlaridan biri bo'lgan gen muhandisligi usullarini mukammal egallashilari va amaliyotga tadbqiq eta olishlari lozim.

Biotexnologiyada gen muhandisligi sohasini o'rganishdan maqsad, tirik organizmlar irsiy belgilari haqidagi axborot joylashgan DNK molekulasi tuzilishi va roli, gen molekulyar biologiyasi; genetik muhandislikning moddiy asoslari: transformasiya, transduksiya, ko'chib yuruvchi genetik elementlar-transpozonlar, plazmidlar, viruslar, bakteriofaglar, restriktazalar, rekombinant DNK olish, genlarni klonlash, hujayra muhandisligi, hujayra va to'qimalarni sun'iy sharoitda o'stirish texnologiyasi; genetik muhandislikning o'simliklar seleksiyasida qo'llanilishi; gen muhandisligiga asoslangan biotexnologiyaning agrar sanoatdagi ilmiy-texnik taraqqiyotni tezlashtirishdagi roli; gibridomalar olish texnologiyasi va uning qishloq xo'jaligida va chorvachilikda qo'llanilishi hamda genetik muhandislikning istiqbollari haqidagi aniq bilimlarni o'rganishdan iborat.

Tirik organizmlar irsiy axborotini sun'iy yo'l bilan ma'lum maqsadga muvofiq o'zgartirish jarayoni genetik muhandislik fanining asosiy ustqurmasi hisoblanadi.

Genetik muhandislik hujayra, xromosoma va gen darajasida amalga oshiriladi:

1. Hujayra darajasidagi genetik muhandislik ikki hujayrani o'zaro qo'shish yo'li bilan amalga oshiriladi.

2. Xromosoma darajasidagi genetik muhandislik hujayra yadrosiga qo'shimcha xromosomalar kiritish orqali amalga oshiriladi.

3. Gen darajasidagi genetik muhandislik yoki gen muhandisligi eng murakkab bo'lib, quyidagi bosqichlar asosida amalga oshiriladi:

4. Qimmatli xo'jalik ahamiyati kasb etadigan gen funksiyasi orqali qidirib topiladi, ajratib olinadi, klonlanadi va tuzilishi o'rganiladi.

5. Ajratib olingan gen xromosoma DNK si bilan rekombinasiyalanuvchi biror fag genomi, traspozon yoki plazmid DNK si bilan biriktirilib vektor konstruksiya yaratiladi.

6. Vektor konstruksiya transformasiya usuli bilan hujayraga kiritiladi va transgen hujayra olinadi.

Hujayra biotexnologiyasi – hujayra, to'qima va protoplastlarni ishlatishga asoslanadi. Hujayralarni manipulyasiya (faoliyatiga qandaydir o'zgarishlar kiritish) qilish uchun, ularni o'simlikdan ajratib olish o'simlik organizmidan tashqarida yashashi va ko'payishi uchun sharoit tug'dirib berish lozim. Ajratib olingan hujayra va to'qimalarni sun'iy ozuqa muhitida, steril sharoitda (*in vitro*) o'stirish, usuli ajratilgan to'qimalar kulturasi deb nom oldi va ularni biotexnologiyada ishlatish mumkinligi sababli, katta ahamiyat kasb etdi.

Biotexnologiya qadimdan ma'lum bo'lsada, alohida amaliy fan sifatida o'tgan asrni ikkinchi yarmidan boshlab, insoniyat eng avvalo o'zi uchun o'ta zarur bo'lgan ya'ni oziq-ovqat, energetika, zahira (resurs), atrof – muhitni muhofazasi va x.k. muammolarni tubdan yangi asosda yichishi zarurligini sezganidan keyin mujassamlana boshlandi. Biotexnologik jarayonlar sun'iy ozuqa muhitida o'stirilgan mikroorganizmlar, o'simlik va hayvon to'qimalari, hujayralari va orgalaridan foydalanishga asoslanadi.

Hozirgi vaqtda dunyoning ko'plab mamlakatlarida biotexnologiyani rivojlanishiga alohida e'tibor berilmoqda. Bunga asosiy sabab, biotexnologiyani boshqa texnologiyalarga nisbatan bir qator ustunlikka egaligidir. Masalan, biotexnologik jarayonlar juda kam energiya talab qiladilar, deyarli chiqindisiz, ekologik toza va x.k. Shuning bilan bir qatorda, biotexnologiya standart jihozlardan va preparatlardan foydalanadi va iqlim sharoitiga qaramasdan hamda ko'p maydon egallamagan holda jarayonlarni yil bo'yi o'tkazishga asoslanadi. Aytib o'tilgan ustunliklar, o'simliklarni va hayvonlarni hujayralari, to'qimalari va organlariga ham tegishlidir.

Ajratib olingan hujayralar va to'qimalarni biotexnologiyadagi rolini uch yo'nalishda ko'rish mumkin:

Birinchi yo‘nalish – ajratib olingan o‘simlik hujayrasini tibbiyot, veterinariya, kosmetika va boshqa sohalar uchun zarur bo‘lgan ikkilamchi metabolitlar: alkaloidlar, steroidlar, glyukozidlar, gormonlar, efir moylari va boshqa biologik faol moddalar sintez qilish imkoniyati bilan bog‘liq. Ma‘lumki, ikkilamchi metabolitlar qattiq (agarli) yoki suyuq ozuqa muhitida o‘stirilgan kallus to‘qimalardan olinadi. Hujayra texnologiyasi asosida diosgenin – dioskore hujayrasidan; aymolin – ilon rasvolfi hujayrasidan; umumiy kuch beruvchi moddalar – jenshen hujayrasidan; va x.k. ajratib olinadi va tibbiyot hamda parfyumeriyada ishlatiladi. Shuni e‘tiborga olish kerakki, o‘stiriladigan hujayralarni hosildorligi, butun o‘simlikni hosildorligidan ancha baland. Bunday usul bilan ikkilamchi metabolitlar ajratib olishni yana bir ustunlik tomoni shundaki, muayyan sharoitda o‘simlikni o‘zini o‘stirish imkoniyati bo‘lmagan sharoitda (sovuq yoki issiq iqlimli mintaqalarda), ularni hujayralarini butun yil maboyinida o‘strish mumkin.

Ikkinchi yo‘nalish – ajratib olingan hujayralarni, o‘simliklar seleksiyasida ishlatish va shu orqali tez rivojlanuvchi, har xil tashqi muhit ta‘siriga chidamli (issiqqa, sovuqqa, sho‘rlanishga, og‘ir metallarga, qurg‘oqchilikka, kasallikka va x.k.) o‘simliklar yaratish. Shuning bilan birga bu yo‘nalish, ajratilgan protoplastlarni qo‘shilishi orqali yangi o‘simliklar yaratish hamda nojinsiy (somotik) gibridlar olishni ham o‘z ichiga oladi. Ajratib olingan protoplastlarga gen muhandisligi metodlari yordamida begona genlarni kiritishi, keyinchalik yangi, meros qoladigan xossalarga ega bo‘lgan o‘simlik yaratishga ham olib keladi. Ajratib olingan changdon va urug‘kurtakni sun‘iy ozuqa muhitida o‘stirish, gaploidlar olish imkonini bersa, murtaklarni o‘stirish – o‘sa olmaydigan (endospermasi yomon rivojlangan) o‘simliklardan gibrid urug‘lar yetishtirish imkonini beradi.

Uchinchi yo‘nalish – ajratib olingan to‘qimalarni ko‘paytirish va ekuv materiallarini viruslar va boshqa patogenlardan sog‘lomlashtirish maqsadida ishlatish. Bu usul, o‘simliklarni klonal mikroko‘paytirish deyiladi va bitta meristemadan yiliga yuz minglab o‘simlik olish imkonini beradi.

Laboratoriyaga qo‘yiladigan asosiy talablar:

Hujayra organoidlari bilan ishlashda asosan qo‘yidagilar talab etiladi:

1. Oziqa muhiti tayyorlash uchun maxsus joy;
2. Steril holatda ekishni amalga oshirish uchun steril bo‘lgan

laminar-boks yoki maxsus germetik xona;

3. Kallus kulturalarni o'stirish uchun doimo harorati bir xil ushlab turiladigan maxsus xona yoki termostat.

4. Suspenzion hujayra kulturasini uchun mikrobiologik chayqalatgich (chayqatgich).

Ko'pchilik tadqiqotchilar oziqa muhiti tayyorlash uchun alohida xonalar bo'lishi zarurligini ta'kidlashadi. Mobodo buning imkoni bo'lmagan hollarda, chinni va shisha idishlarning sterilligini taminlash zarur. Ya'ni xonadagi ba'zi bir asbob-uskunalarda changlar va turli xil moddalar bo'lmashligi, masalan: Petri likopchasi ustki qismida, tarozilar yoki pH-metr elektrodlarida kimyoviy moddalar qoldiqlari oziqa muhitga tushmasligiga imkon yaratish zarur.

Ekish amalga oshiriladigan xonalar va asbob-uskunalarining tozaligi, sterilligi tajriba ishlarini amalga oshirishda eng zarur manba hisoblanadi. Ya'ni yaxshi steril, toza ishchi joyida tajriba ishlarini olib borish, maxsus asbob uskunalar izlashdan ko'ra qulayroqdir.

Laminar-boks hozirgi vaqtda to'qima kulturalari bilan ishlashda, yani steril ekishlarni amalga oshirishda eng qulay va keng qo'llanilayotgan uskuna hisoblanadi.

Bazi bir laminar-bokslarda maxsus ultrabinafsha chiroqlari mavjudki, uni ichki yuzasini steril saqlash uchun kechasi bilan yoqib qo'yish mumkin. Ammo, shunday sterilizasiyadan keyin ham ishchi yuzasini imkoni boricha etanol yoki 20% li fenolning suvli eritmasida artib olish maqsadga muvofiqdir (bunda albatta qo'lqoplardan foydalaniladi).

Laminar-boks bo'lmagan hollarda unchalik katta bo'lmagan izolyasiyalangan xonalarda ishni amalga oshirish mumkin. Bunday hollarda ishchi yuza qism tez va oson sterillanadigan bo'lishi zarur va u yer ham (masalan: kimyoviy tajribalar stoli) spirt yoki 20% li fenol bilan sterillanadi. Bundan tashqari, ish boshlanguncha, ish davomida va ish tugagandan so'ng ham ishchi yuzaning (stolning) ikki chekasida bunzen gorenkasida olov yonib turishi lozim.

Yuqorida keltirilgan talablarga javob beradigan steril xona tashkil etilsagina laminar-bokslardagidek steril ekishni muvoffaqiyatli amalga oshirish mumkin.

O'simliklar hujayra kulturasini o'stirish va saqlab turish uchun talab etiladigan asosiy fizik omillardan biri doimiy harorat hisoblanadi. Ko'psonli bo'lmagan kallusli kulturalar uchun ishchi rejimi $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ bo'lgan standart mikrobiologik termostat maqsadga muvofiq bo'ladi.

Ko'pchilik tadqiqotchilar kulturalarni qorong'u joylarda ham o'stirishadi, ammo bunday hollarda oddiy elektr chiroqlaridan ham yorug'lik sifatida foydalanish mumkin. Ko'p sonli kallusli kulturalar to'plami uchun esa termostat holiga keltirilgan harorati 25⁰C ni tashkil etadigan xonalar talab etiladi.

O'stirish uchun eng qulay bo'lgani bu egiluvchan va trubkasimon lyuminescent chiroqlardir. Uni kulturalar qo'yilgan qatorning qulay joyiga joylashtirish mumkin. Ya'ni uni ilib qo'yish yoki pastki tomondan yopishtirib qo'ysa ham bo'ladi. Bunday tizim kulturalarni o'stirishda har qanday yorug'lik rejimidan foydalanishda qulaydir. Kulturalarni qorong'ulikda o'stirish talab etilganda ushbu xonada o'stirish mumkin, ammo qorong'u shkaflar ichida o'stirish mumkin emas.

Suspension kulturalarni almashtirish va aerasiya uchun eng arzon va qulay tizim aylanma harakatlanadigan chayqatgich hisoblanadi. Bunday chayqatgichlar yuzasidan turli xil diametrli kolbalarini joylashtirish, ularni harorati bir xil bo'lgan va yorug'lik bilan yetarli darajada ta'minlangan xonalarga o'rnatish mumkin.

O'stirish sharoitini qat'iy nazorat qilish uchun esa yopiq termostatlarda aylanma harakatlanadigan chayqatgichlar qulaydir. Bunday chayqatgichlarda kunduzgi yorug'likni beruvchi chiroqlar, maxsus buramali qopqoq va boshqarish dastaklari bo'lib yorug'lik davomiyligini turli xil boshqarish imkonini beradi.

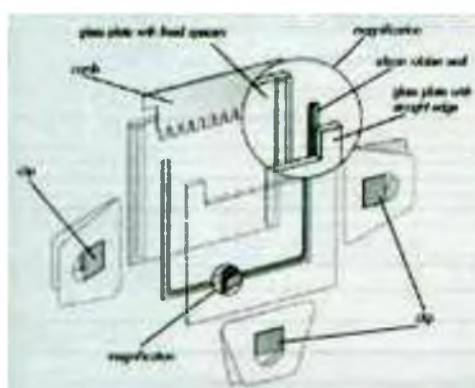
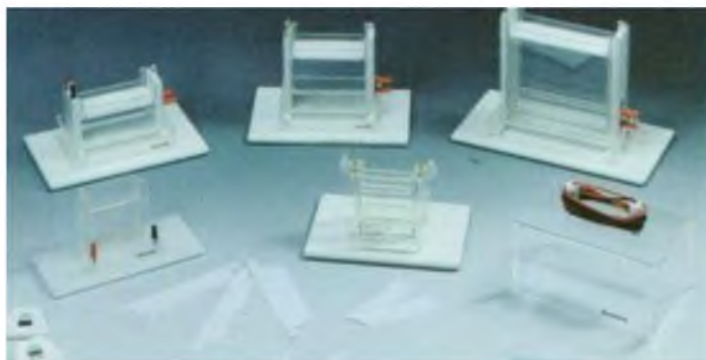
O'simlik hujayra kulturalari bilan ishlaganda chayqatgichda maqsadli sovutish tizimining mo'tadil ishlashi asosiy rol o'ynaydi. Chunki, chayqatgich matorining qizishi natijasida kamida ichida harorat keskin oshib ketishi mumkin.

Kallusli kulturalar plastinkasimon Petri likopchasida, shisha probirka zich yopiladigan qopqoqli plastmassali idishlardan to'qima kulturasi uchun esa bankalardan foydalaniladi. Suspension kulturalar odatda aylanmasimon tubli shisha kolbalarida o'stiriladi.

Kichik darajadagi biotexnologik jarayonlarni amalga oshirish uchun foydalaniladigan asbob-uskunalar va qurilmalarning asosiylari quyidagilar hisoblanadi: termostat, quritish shkafi, laminar-boks, fermentyor, mikrobiologik chayqatgich, pH-metr, analitik tarozilar, fotokolorimetr, sentrifuga, elektroforez uskunasi va x.k.

Ularning ba'zilarining rasmlari quyida keltirilgan bo'lib, ular haqida qisqacha to'xtalib o'tamiz, batafsil ma'lumotlar esa murabbiy tomonidan izohlab beriladi.

Elektroforez uskunasi - 1-rasmda turli xil o'lchamdagi elektroforez uskunasi aks ettirilgan bo'lib, u asosan agarozali gelda ishlashga ixtisoslashtirilgan.



a



b

1-rasm. Turli xil hajmli elektroforez uskunolari va uning tuzilish chizmasi
a–gorizontal; b–vertikal

Ushbu uskunadan foydalanib, oqsillar molekulyar massasini aniqlash, ularni turli xil fraksiyalarga ajratish va alohida fraksiyalarni toza holda ajratib olish ishlarini amalga oshirish mumkin. Hozirgi vaqtda elektroforezning gorizontal va vertikal tuzilishli shakllari kengroq ishlatiladi. Zamonaviy jihozlangan laboratoriyalarda kapilyar elektroforezlar qo'llaniladi. Buning qulaylik tomoni o'rganilayotgan

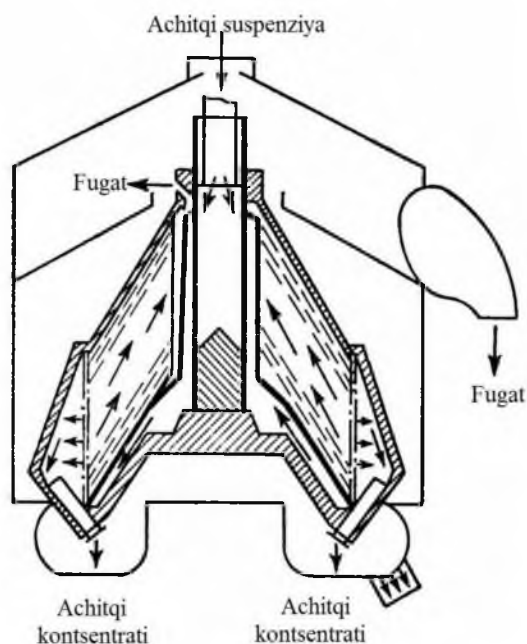
moddalarning miqdori juda kam bo'lgan hollarda ham etarli darajadagi ishlarni amalga oshirish mumkin.

Ushbu elektroforezlardan foydalanib DNK ning turli xil formalarining molekulyar og'irliklarini aniqlash va ularni ajratib olishni tashkillashtirish mumkin. Elektroforezda agarozali gelda (ko'pincha, SDS, tris, NaCl ishtirokida) masalan, oqsillarni molekulyar og'irlikka nisbatan bo'lish va ajratish parchalangan oqsillarning izoelektrik nuqtasi va molekulyar og'irligiga asoslaniladi. Elektroforez uskunasi foydalanib asosan o'simlik, hayvon yoki mikroorganizmlarning metabolitik moddalarini toza holda ajratib olish mumkin, ammo miqdor jihatidan ko'proq bo'lgan massani olish imkoniyatlari cheklanganligi uchun undan asosan ilmiy tadqiqot ishlariga mo'ljallangan moddalar ajratish uchun qo'llaniladi.

Sentrifuga. Sentrifugal asosan suyuqlikdan maqsaddagi moddalarni yoki komponentlarni cho'ktirib olish uchun qo'llaniladi. Ishlash prinsipi markazdan qochuvchi kuch hisobiga asoslanadi. Sentrifugalarning turli xil tiplari aylanish tezligiga, hajmiga, ish maxsuldorligi kabi ko'rsatkichlariga bog'liq holda farqlanadi. Hozirgi vaqtda analitik ya'ni ultrasentrifugal ham qo'llanilmoqdaki, ularning aylanish tezligi 20, 30, 60 va hattoki 200 ming martoba tezlikni tashkil etadi.



2-rasm. Turli xil tipdagi stol sentrifugalari



3-rasm. B. Ashitqi separatori

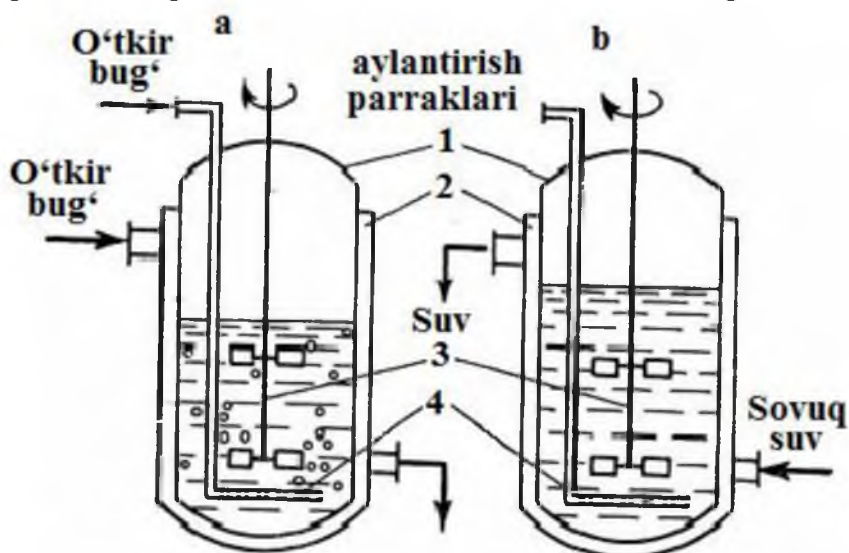
Masalan, 2-rasmdagidek, kichik epindorflar shaklidagi idishlarni bir necha o'n ming marotaba tezlikda aylantirish imkoniyatiga ega bo'lgan sentrifugalar asosan laboratoriya tekshirishlari uchun oqsillar, antitellalar, plazmidalar, DNK va RNK kabi manbalarni ajratish uchun qo'llaniladi. Shuningdek, 100, 200, 300 yoki undan katta miqdordagi suyuqliklar joy bo'ladigan maxsus stakanlarni aylantiradigan sentrifugalar (bularni ishlash prinsipiga ko'ra ishlab chiqarish sanoati separatorlar ham deb ataladi) ham borki, ularning aylanish tezligi bir necha minggacha bo'lishi mumkin (3-rasm, B). Bunday sentrifugalardan ishlab chiqarish korxonalarida jumladan ashitqilar, insektisid moddalar kabi ishlab chiqarish jarayonlarida biomassa to'plash uchun qo'llaniladi.

Avtomat-samplerlar (pipetkalar) (4-rasm, a) – biotexnologik tajribalarda asosiy ish qurollaridan biri bo'lib, foydalanilayotgan moddalar yoki komponentlarning juda kam o'lchamlarini ham avtomat tarzda aniq o'lchamlarini olish va quyish vazifasini o'tashga ixtisoslashtirilgan bo'lib, ilmiy tadqiqot ishlarida qo'llaniladi. Ular o'lchamlari va shakllariga ko'ra farqlanadi. Ushbu rasmda avtosampler yordamida epindorf idishida fraksiyalarga ajratilgan komponentni olishda foydalanish aks ettirilgan (3-rasm, b).



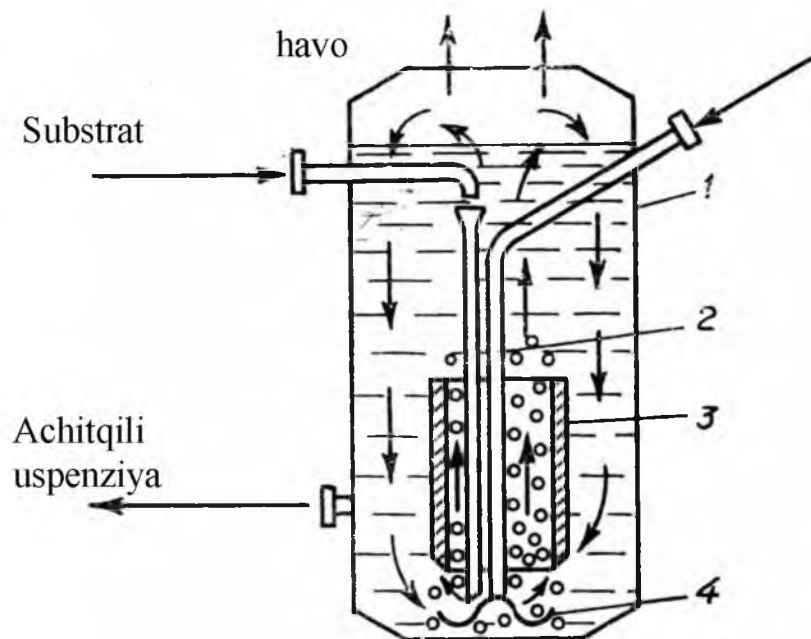
4–rasm. Avtopipetkalar (samplerlar) va undan foydalanish

Fermentyor – asosan biologik obyektlarni suyuqlikda o‘stirishga mo‘ljallangan, barcha zarur ko‘rsatkichlarni avtomat ta‘minlab beruvchi o‘lchovchi asbob-uskunalar bilan ta‘minlangan bo‘ladi. Ushbu holatning ba‘zi birlarining texnologik chizmasi 5-rasmda aks ettirilgan.



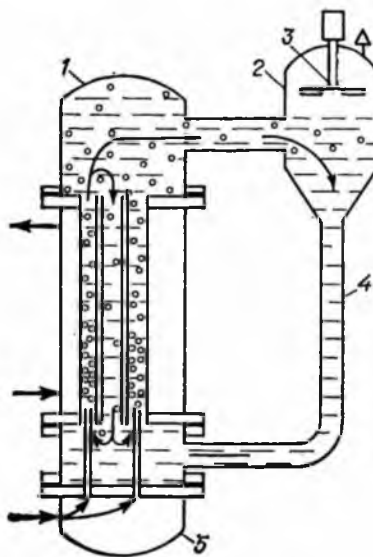
5-rasm. A. Oziqa muhitini sterilizatsiyalashda fermentyorning qizdirilish (a) va sovutilish (b) chizmasi

1-fermentyorning korpusi; 2-qoplami; 3-aralashtirgich; 4-barboter.



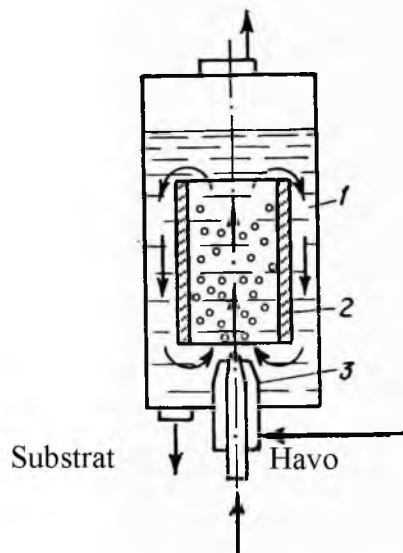
B. Lefransua tizimli fermentator

1-uskuna korpusi; 2- havo uzatuvchi; 3- diffuzor; 4- kyuveta.



C. Gazliftli fermentator

1 – qoplamali quvur reaktor; 2 – separator; 3 – mexanik ko‘pik bosuvchi; 4 – sirkulyasion truba; 5 – havo kamerasi.

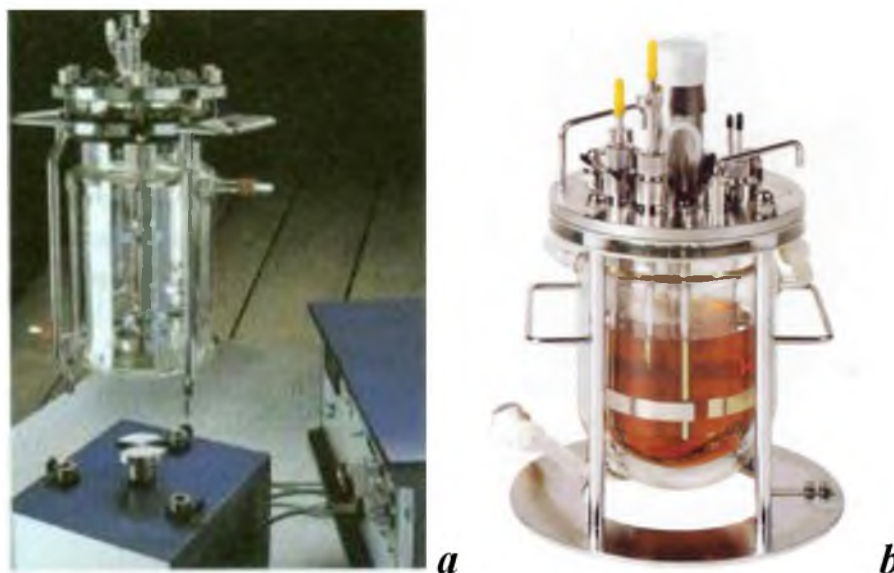


D. Forsunkali havo taqsimlagichli fermentator

1—uskuna korpusi; 2—diffuzor; 3—forsunka.

Fermentyorlar ishlash tipiga koʻra uzluksiz va davriy oʻstirishga moʻljallangan turlari mavjud boʻlib, oʻstirilayotgan obyektning xususiyatlariga koʻra tanlanadi.

Turbidostat va xemostat tipidagi fermentyorlar sanoat asosida, kichik ishlab chiqarishlarda yoki tajriba laboratoriya yoki oʻquv laboratoriyalarda qoʻllanilishiga koʻra hajmi turli xilda boʻladi. Asosan, 3-10 l hajmli fermentyorlar oʻquv-laboratoriyalari uchun ishlatilsa, 10-60 l hajmli fermentyorlar tajriba laboratoriya yoki kichik ishlab chiqarish uchun qoʻllaniladi. 100 l yoki undan ortiq (baʼzan bir necha tonna hajmli, masalan Bersk shahridagi mikrobiologik zavodda, insektisid biopreparatlar ishlab chiqarish uchun 30 tonna hajmli fermentyorlar ishlatiladi) hajmli fermentyorlar sanoat asosida ishlab chiqarish uchun qoʻllaniladi.



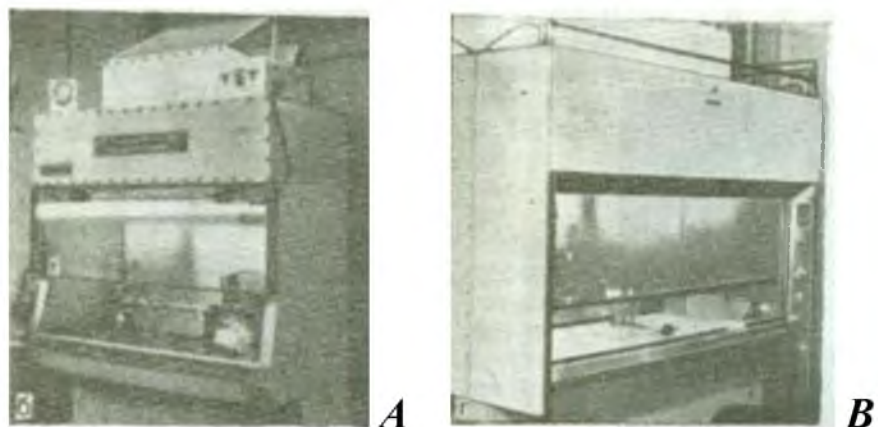
6-rasm. O‘quv – laboratoriya (a) va tajriba laboratoriya fermentyorlari (b)

Laminar-boks – odatda mikrobiologik tajribalar uchun qo‘llaniladi. Bundan tashqari biotexnologik jarayonlarda ham keng ishlatilishi mumkin. Masalan, hujayra organoidlarini ajratish, ular ustidan turli xil manipulyasiyalarni amalga oshirish hamda ularni ekish jarayonlarida keng qo‘llaniladi. Mikrobiologik laminar boks o‘rniga ba‘zan maxsus izolyasiyalangan xonalar tashkil etish mumkin, ularni boks-xonalari deb ataladi. Ammo, unda kelayotgan havodan va odamning nafas olishidan chiqayotgan mikrofloradan himoyalash cheklanganligi uchun to‘liq talabga javob bermasligi bilan xarakterlanadi.

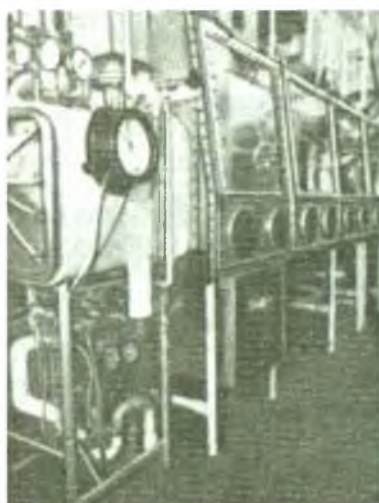
Mikrobiologik laminar boksning uchta sinfi tafavut qilinadi. Bular birinchi, ikkinchi va uchunchi darajali laminar bokslar deb nomlanib, ko‘pincha ikkinchi va uchunchi darajali laminar bokslar hujayra organoidlari bilan ishlashda keng qo‘llaniladi.



7-rasm. 1-darajali laminar boksning tashqi ko‘rinishi



8-rasm. 2-darajali laminar boksning tashqi ko‘rinishi



9-rasm. 3-darajali laminar boksning tashqi ko‘rinishi

Maxsus boks xonalarda mikroorganizmlar va hujayra organoidlari bilan ishlash davomida albatta gaz gorelkasi baland bosimda ishlab turishi lozim (10-rasm).



10-rasm. Maxsus boks-xonada gaz gorelkasi yordamida ishlash

Talabaning kollokvium topshirishi uchun topshiriqlar:

1. Talaba uslubiy ko'rsatmada berilgan ma'lumotlar va chizmalarni daftariga qad etgan bo'lishi;
2. Biotexnologiya laboratoriyasida rioya etilishi lozim bo'lgan qonun-qoidalarni aytib berishi;
3. Laminar –boksning darajalari va farqlarini chizib izohlab berishi;
4. Sentrifuga, avtosampler, fermentyorda ishlash tartibi va ularning ahamiyatlari bo'yicha ma'lumot berishi;
5. Sentrifuga uskunasiidan foydalanib suyuqlikdan biomassa ajratishni amaliy bajarib berishi lozim.

Yuqorida berilgan topshiriqlarni bajargan talabalarga belgilangan tartibda reyting bahosi qo'yiladi.

2 – laboratoriya ishi

Mavzu: Hujayra va to'qima to'plamlari bilan ishlash jarayonida sterillash usullari

Ishdan maqsad: Biotexnologik jarayonlarning moddiy asoslaridan bo'lgan hujayra organoidlaridan foydalanib tajribalar o'tkazish uchun zarur bo'lgan asbob-uskunalar, zarur materiallar va idishlarni sterillash usullari haqida ma'lumotga ega bo'lish.

Ishning tashkil etilishi: murabbiy guruh talabalarini ikki guruhga (ko'proq guruhchalarga ham bo'lish mumkin, faqatgina bunda har bir guruhchalarning vaqt me'yorini to'g'ri taqimlash zarur) ajratadi.

Birinchi guruh talabalari: laminar boks, asbob – uskunalar va ozuqa muhitini sterillashni o'rganishadi;

Ikkinchi guruh talabalari: idishlarni va zarur materiallarni sterillashni o'rganishadi.

Oradan ma'lum vaqt o'tgach (50 minut) har ikkala guruh talabalari ishchi o'rinlarini almashtirishadi.

Jarayonlar davomida murabbiy talabalarning bergan savollariga javob berib borishi va tug'ilgan muammrolarni hal etishda amaliy yordam berishi lozim.

Dars (ikkinchi juftlik) oxirida talabalar laboratoriya daftarlariga qayd etilgan ma'lumotlar asosida kollokvium topshiradi va mashg'ulotga ajratilgan reyting balini oladi. Reyting balini to'play olmagan talaba

keyingi mashg'ulotgacha ushbu laboratoriya ishini qayta topshirishi mumkin.

Tushintirish:

Ajratilgan organlar, to'qimalar, hujayra va protoplastlarni o'stirishda sterillikka katta ahamiyat berish zarur. Sterillikni ahamiyati shundan iboratki, ajratilgan organlar, to'qimalar, hujayralar va protoplastlarni o'stirish uchun tayyorlangan sun'iy ozuqa muhitlarida mikroorganizmlar ham juda yaxshi o'sadi. Mikroorganizmlarning rivojlanishi o'stirilayotgan hujayra va to'qimalar uchun ikki yoqlama havf tug'diradi.

Birinchidan, mikroorganizmlarning yashash faoliyati davrida ozuqa muhitlarining tarkibi sezilarli darajada o'zgarib, belgilangan turg'un sharoitda hujayraning o'sishini to'xtatadi.

Ikkinchidan, o'simlikdan ajratilgan to'qima, hujayra va ayniqsa protoplastlarni mikroorganizmlar osongina zararlaydi.

Ayniqsa, hujayra kulturalarini fermentyorda o'stirish jarayonini amalga oshirish uchun o'ta darajadagi sterillik talab etiladi.

Shuning uchun ajratilgan organ, to'qima, hujayra va protoplastlar bilan olib boriladigan tajribalar steril xonalar, bokslar yoki laminar bokslarda olib boriladi.

Bokslar, asboblari, idishlar, o'simliklar, ozuqa muhitlari, paxta tiqinlar va boshqa ishga kerakli narsalarning hammasi sterillanadi. Umuman olganda sterillash jarayoni talabalar uchun yangilik emas, chunki biokimyo, kimyo, mikrobiologiya kabi fanlarda sterillashning ba'zi bir jabhalari bilan tanish bo'lganliklari uchun ushbu laboratoriya ishini bajarish hech qanday qiyinchilik tug'dirmaydi.

Shuni ham ta'kidlab o'tish joizki, biotexnologik jarayonlarda ozuqa muhitini sterillash jarayoni mikrobiologik tajribalar uchun ozuqa muhiti tayyorlashdan kam farq qilsada, foydalaniladigan tarkibiy komponentlarning juda ham kam miqdorda ishlatilishi va ko'pincha garmonlar, o'stiruvchi omillar va vitaminlar kabi juda tez buziluvchi tarkibga ega bo'lganligi uchun diqqat bilan sterillash sharoitini tanlashni talab etadi.

Shuningdek, ushbu jarayonlarda talabalar to'liq texnika xavfsizligi va laboratoriyada ishlash qonun va qoidalariga rioya etishlari talab etiladi.

Asbob-usunalar va materiallar:

- 1.500-700 ml li kimyoviy stakanlar (2 ta);
2. Distillangan suv uchun bir litrli kolba;

3. Spirt, spirtovka yoki tabiiy gaz;
4. Petri likobchalari (2ta);
5. Avtoklav;
6. Sterilizator;
7. Natriy bikarbonatning 1% li eritmasi;
8. Ozuqa muhitli probirkalar;
9. Quritish shkafi;

Ishning borishi:

Laminar boks sterilizatsiyasi. Laminarning ish olib boriladigan ichki yuzasi 70% li spirt bilan artiladi;

So'ng laminarga spirtovka, gugurt, 96% spirtli stakan, sterillangan idishlar, asboblari va sterillangan suvli kolba joylanadi;

Meristemalar ajratishda laminarga binokulyar lupa ham qo'yiladi;

Ishlashdan oldin 2 soat davomida laminar boks bakteriosid ultrabinafsha lampasi bilan nurlantiriladi;

Ishlashdan ikki soat oldin laminarning ichki yuzasi 70% li spirt bilan yana artiladi;

Ish boshlashdan avval qo'llarni yaxshilab sovun bilan yuvib, spirt bilan artiladi va steril oq xalat kiyiladi, og'ziga steril niqob tutiladi.

Idishlarni sterillash. Idishlar quritish shkaflarida quruq issiqda yoki nam bug'da avtoklavda sterillanadi;

Sterillashdan oldin idishlarni yaxshilab yuvib, quritish kerak;

Idish yuvish uchun turli idish yuvish vositalari va xrompik (kaliy bixromatning sulfat kislotasidagi eritmasi) ishlatiladi;

Yuvilgan idishlarni distillangan suvda chayib, quritish shkafiga quritiladi;

Sterillashdan avval havodan infeksiya tushishining oldini olish uchun probirkalar, kolbalar og'zi paxta tiqinlar bilan yopiladi va qog'ozga (iloji boricha falga qog'ozga) o'raladi;

So'ngra idishlarni quritish shkaflariga joylab 2 soat 160°C da (falga qog'ozga o'ralgan bo'lsa 250°C gacha) qizdiriladi. Bunday qizdirishda bakteriyalargina emas, balki ularning sporalari ham o'ladi;

Quritish shkafiga haroratni 175°C dan oshirish mumkin emas, chunki paxta tiqinlar sarg'ayib ketadi idishlar o'ralgan qog'oz esa sinuvchan holga kelib qoladi;

Avtoklavda bosim ostida bundan ham yaxshiroq sterillashga erishish mumkin, chunki namli issiqlikda qizdirilganda mikroorganizmlar va ularning sporalari yana ham yaxshi o'ladi;

Turli xil stakanlar, Petri likobchalar, pipetkalar, distillangan suvli kolbalar avtoklav qilinadi;

Idishlar falga yoki o'rash qog'ozlarga o'ralgan holda 25-30 daqiqa 2 atmosferada avtoklavlanadi;

Pipetkalarini avtoklavlashda ularning yuqori qismiga paxta tiqib, alohida-alohida qilib o'raladi.

Asbob-uskunalarini sterillash. Asbob uskunalar, skalpel, pinset, ignalar va hakazolar quritish shkafida 12 soat davomida 140⁰C quruq issiqlikda yoki suvda qaynatib sterillanadi;

Temirdan yasalgan asboblari avtoklavlanmaydi, chunki nam bug' tasirida ular zanglaydi va o'tmaslashadi;

Ish boshlashdan avval va ish davomida asboblari chinni stakanlarga solinib, 96% li etil spirtida sterillanadi va spirtovka alangasida qizdirib olinadi;

Spirtovka alangasida lansetlar, pinsetlar va mikrobiologik ilmoqlar qizdiriladi va steril qog'ozlar orasida saqlanadi;

Sterillangan asboblari faqatgina bir martalik muolaja uchun ishlatiladi, qayta ishlatilganida ular yana spirtida sterillanadi va alangada qizdiriladi;

Ignalar va pakkilar spirtga solib sterillanadi.

Materiallarini sterillash. Tajribada ishlatiladigan paxta, doka, paxta tiqinlar, filtr qog'ozlari, xalatlar va ro'mollar avtoklavda 2 atmosferada 25-30 daqiqa sterillanadi.

O'simlik materiallarini sterillash. Urug'lar, yuqori meristemalar, o'simliklarning turli qismlaridan olingan to'qima bo'laklarini sterillash uchun turli sterillovchi eritmalaridan:

sulemaning 0,1% li eritmasi;

1% li brom eritmasi;

13 % li pergidrol;

3-6 % li xloramin, dioksid;

10% li natriy giroxloridning suvdagi eritmalaridan foydalaniladi.

Ildiz mevalar, tugunaklar, o'simliklarning yo'g'on poyalari sovun va ishqalagich bilan oqar suvda yaxshilab yuviladi, po'stlog'i shilinadi, (ildizlar va ildiz mevalar), distillangan suvda chayiladi va absolyut spirtga bir necha sekundga solib olinadi;

O'simlik obyektlari sterillangandan so'ng, sterillovchi moddalardan tozalash uchun distillangan suvda ko'p marta chayilishi kerak;

Ayniqsa bromidli suv bilan ishlov berilgan o'simlik materiallarini diqqat bilan yuvish kerak chunki bromidning eng kam miqdori ham urug'larning o'sishini to'xtatib qo'yadi. Brom bug'i zaharli bo'lganligi uchun, brom bilan sterillashda albattda mo'rili shkaflaridan foydalanish kerak;

Brom eritmasida faqatgina makkajo'xori urug'larini sterillashda foydalanish tavsiya etiladi; Loviya, beda, kungaboqar (po'chog'idan tozalangan) uchun –sulema ishlatiladi;

Brom va sulema bilan sterillash vaqti 10-15 daqiqani, pergidrol bilan sterillash esa 30 daqiqani tashkil qiladi. Meristemalar va o'simliklarning har xil qismlaridan olingan bo'laklari ikki marotaba tezroq sterillanadi; Tukli urug'lar (chigit) yuqori konsentratsiyali sulfat kislotasiga 5 daqiqaga solinsa yaxshi sterillanadi; Pergidroldan urug'lar osonroq yuviladi (steril suv 5-7 marta o'zgartirilganda). Sulemadan so'ng suv 5-6 marta o'zgartiriladi;

Bromdan so'ng suv 12 soat davomida, yuvishning boshida har 30 daqiqa, so'ng esa har 3 soat davomida almashtirib turiladi;

Antiseptiklar bilan ishlov bermasdan, pomidor, olma, qovoq, tamaki va dukkaklilardan steril urug' olish mumkin. Yitilish davrida bu o'simlik urug'lari go'shtli, yog'ochli yoki danakli qatlamlar orasiga joylashgan bo'ladi. Sog' zararlanmagan bu mevalar sovunli suvda va spirta bir necha marta yuviladi. So'ng aseptik sharoitda bo'laklarga bo'linadi, steril skalpel bilan uning ichidan urug'lar olinadi va steril filtr qog'ozi solingan Petri likobchalariga solinadi.

Ozuqa muhitlarini sterillash. Ozuqa muhitlari bosim ostida (avtoklavda) bug' bilan sterillanadi. Ozuqa muhitlari solingan probirkalar og'zi paxta tiqinlar bilan yopilib, o'rash qog'oziga o'raladi, va 120°C, 1 atmosfera bosimida 20 daqiqa davomida avtoklaflanadi.

Sovuq sterillash. Issiqlikka chidamsiz organik suyuqliklar bakteriyalardan mayda teshikli (diametri 0,15-0,45 mkl teshikli) bakterial filtrlardan o'tkazish orqali tozalanadi.

1. Petri likobchalari (2 ta), 500-700 ml li kimyoviy stakanlar (2 ta) va buyum oynachalar pishiq qog'ozga o'ralgan holda 160°C da 2 soat davomida quritish shkaflarida sterillanadi.

2. Skalpel, ajratish ninalari, pinsetlar quritish shkafida 140°C da 1 soat davomida sterillanadi va tayyorlangan asboblarni laminardagi qog'oz varaqalari orasiga joylanadi.

3. Og'zi paxta tiqinlar bilan yopilgan probirkalardagi ozuqa muhitlari 1 atmosfera bosimda 20 daqiqa davomida sterillanadi. Ozuqa

muhitli probirkalar 10-20 tadan qog'ozga o'ralgan bo'lishi kerak. Bir vaqtning o'zida o'simlik materiallari uchun doka xaltachalarni qog'ozga o'rab avtoklavlanadi.

Talabani kollokvium topshirishi uchun topshiriqlar:

1. Talaba uslubiy ko'rsatmada berilgan ma'lumotlarni daftoriga qad etgan bo'lishi;

2. Hujayra organoidlari o'stiriladigan shisha idishlarni kimyoviy sterillash usulini va sterilizatsiyalash davomida rioya etilishi lozim bo'lgan qonun-qoidalarni aytib berishi;

3. Laminar boksni ishlashga tayyorlash va sterillashni bilishi va idishlarning turli xil turlarini sterillashni bajara olishi;

4. Ozuqa muhitini tarkibiga ko'ra sterillash sharoitini tanlay olish qobiliyatini yozma holatda (uch variantda) tayyorlashi;

5. Avtoklavda idishlar va ozuqa muhitini sterillash jarayonini amaliy bajarib berishi lozim.

Yuqorida berilgan topshiriqlarni bajargan talabalarga belgilangan tartibda reyting bahosi qo'yiladi.

3 – laboratoriya ishi

Mavzu: Mikroorganizmlarni ekish uchun ozuqa muhiti tayyorlash va sterilizatsiya qilish hamda produsentni suyuq va qattiq ozuqa muhitida o'stirish

Ishdan maqsad: O'rganilayotgan bakteriyalarning biomassasini ko'paytirish uchun ozuqa muhiti tayyorlash, sterillash, unga produsentlarni ekish va biomassa olishni o'rganish.

Ishning tashkil etilishi: murabbiy guruh talabalarini ikki guruhga ajratadi.

Birinchi guruh talabalari: suyuq ozuqa muhiti tarkibini tuzadi, sterilizatsiya qilishadi va produsentni ekib, zarur ko'rsatkichlarni ta'minlagan holda mikrobiologik chayqatgichga idishlarni joylashtirishadi. Guruhchadagi talabalarining har ikkitasi turli xil hajmdagi suyuqlikka ozuqa tarkibi tuzishlari lozim;

Ikkinchi guruh talabalari: qattiq ozuqa muhiti tayyorlashadi, sterilizatsiya qilib, produsentlarni ekishadi (Petri likopchalariga) va termostatga joylashtirishadi. Guruhchadagi talabalarining har ikkitasi turli xil hajmdagi suyuqlikka ozuqa tarkibi tuzishlari lozim;

Jarayonlar davomida murabbiy talabalarning bergan savollariga javob berib borishi va tug'ilgan muammolarni hal etishda amaliy yordam berishi lozim.

Dars (ikkinchi juftlik) oxirida talabalar laboratoriya daftarlariga qayd etilgan ma'lumotlar asosida kollokvium topshiradi va mashg'ulotga ajratilgan reyting balini oladi. Reyting balini to'play olmagan talaba keyingi mashg'ulotgacha ushbu laboratoriya ishini qayta topshirishi mumkin.

Laboratoriya ishigacha texnik xodim yoki laborant talabalar uchun 2 sutka davomida kolbalarda va kosyaklarda o'stirilgan (Petri likopchasida o'stirish ham mumkin) produsent mikroorganizm kulturasi va steril idishlar bilan ta'minlashi lozim. Shuningdek, avtoklavni zarur vaqtda qo'shib, streillash jarayoniga tayyorlab beradi. Bundan tashqari mikrobiologik chayqatgichda qoldiriladigan kultural suyuqlikni nazorat qilish va keyingi mashg'ulotgacha saqlashni ta'minlashi zarur.

Murabbiy tomonidan har ikkala guruhning bir vaqtda sterillash jarayonini amalga oshirilishi nazorat qilinadi. Sterilizasiya vaqtida esa zarur bo'lgan ma'lumotlarni talabalar daftarlariga qayd etib qo'yadilar.

Tushintirish:

Ayni vaqtda jahon agrar sanoati amaliyotida mikrob insektisid biopreparatlardan qishloq xo'jaligi ekinlarini zararkunanda xasharotlardan himoya qilishda unumli foydalanib kelinmoqda.

Bu borada *Bac. thuringiensis* turiga mansub entomopatogen bakteriyalar asosida tayyorlanayotgan insektitsidlar asosiy o'rin tutadi. Shu boisdan *Bac. thuringiensis* bakteriyasi asosida biopreparat tayyorlash uchun mo'tadil va arzon oziqa muhiti tanlash katta amaliy ahamiyat kasb etadi.

Adabiyotlardan ma'lumki *Bac. thuringiensis* bakteriyasi shtammlarini o'stirish uchun asosan glyukoza qo'shilgan makkajo'xori, achitqi va quruq achitqi ekstraktlari asosida tayyorlangan oziqa muhitlaridan foydalaniladi.

Ma'lumki, *Bac. thuringiensis* bakteriyalarini biotexnologiya sanoati miqyosida o'stirish uchun taklif etilgan makkajo'xori ekstrakti va glyukoza saqlovchi oziqa muhiti ehtiyojga yetarlicha javob bermaydi, shuningdek, makkajo'xori ekstraktining beqarorligi va glyukozaning tanqisligi bu oziqa muhiti o'rnini bosadigan arzon va mo'tadil oziqa muhiti manbalarini topishni taqazo etadi.

Shu boisdan mazkur ishda biz *Bac. thuringiensis* entomopatogen bakteriyasi shtammlari uchun quyidagi oziqa muhitida o'stirishni

tavsiya etamiz: standart oziqa muhiti: Pepton 1,0 g; NaCl 0,05 g; K_2HPO_4 0,05 g; $MgSO_4$ 0,02 g; (pH 7,0) (1 litr suyuqlik uchun). Bunda kulturalar yuqori darajada mahsuldorlik ko'rsatadi. Ushbu ozuqa muhiti asosida asosan laboratoriya ishlari bajariladi.

Uning asosida ishlab chiqarishni tashkillashtirish esa iqtisodiy samaradorlikka olib kelishi mumkinligi isbotlab berilgan. Shuning uchun laboratoriya sharoitida biz maqsadimiz faqatgina ushbu bakteriyalar sintez qiladigan kristall oqsillarni o'rganish bo'lganligi uchun hohlagan ozuqa muhitidan foydalanishimiz mumkin.

Quyidagi rasmda o'rganilayotgan bakteriyaning spora va kristall hosil qilishi aks ettirilgan bo'lib, talabalar mikroskop ostida shu shaklni aniq ko'rishlari talab etiladi.



11 – rasm. Bakteriyalarning spora va kristall hosil qilishi

Asbob-usunalar va materiallar:

- ✓ 500-700 ml kimyoviy stakanlar (2 ta);
- ✓ distillangan suv uchun kolbalar;
- ✓ Petri likobchalari (zarur miqdorda);
- ✓ Kartoshka donalari (zarur miqdorda murabbiy tomonidan ta'minlanadi);
- ✓ *Bacillus thuringiensis* bakteriyasining tayyor kulturasi (zarur miqdorda murabbiy tomonidan ta'minlanadi);
- ✓ Avtoklav;
- ✓ Quritish shkafi;
- ✓ Suyuq ozuqa muhitida o'stirish uchun (1yoki 2 litrli kolbalar);
- ✓ Termostat;
- ✓ Mikrobiologik chayqatgich;
- ✓ Sentrifuga;
- ✓ Mikroskop va zarur bo'yoqlar;
- ✓ pH-metr.
- ✓ Tarozi.

Ishning borishi:

Mikroorganizmlar uchun ozuqa muhiti tayyorlash, uni sterilizatsiyalash va unga produsentlarni ekish usullari bilan mikrobiologiya fanining laboratoriya mashg'ulotlarida etarli darajada tanishganligi sababli talabalar ushbu laboratoriya ishini quyidagi tavsiyalar asosida bajarishadi:

Foydalaniladigan produsent: *Bacillus thuringiensis* bakteriyasi shtammi laboratoriya muzeyidan texnik laborant tomonidan maxsus kosyaklar ekilgan holda beriladi.

Produsentni o'stirish va saqlash. Kultura agar-agar qo'shilgan kartoshkali suyuq va qattiq ozuqa muhitlarida 28-30°C haroratda 5 kun davomida o'stirib (suyuq ozuqa muhiti uchun mikrobiologik chayqatgichda; qattiq ozuqa muhiti uchun termostatda) olinadi.

Oziqa muhitlari. Bakteriyalarni o'stirish va saqlashda quyidagi oziqa muhitlaridan foydalanish mumkin: go'sht peptonli agar (GPA), go'sht peptonli sho'rva (GPSH), Xottinger oziqasi, kartoshkali agar va suslo-agar (ma'qul ozuqa muhiti murabbiy tomonidan tavsiya etiladi).

Dastlabki ekuv materialini tayyorlash. Ekish materialini o'stirish uchun agarli kartoshka oziqa muhiti kosyakida 2 kun davomida 28-30°C haroratda o'stirilgan kulturadan foydalaniladi (texnik laborant tomonidan ta'minlanadi); Shundan keyin, kultura sig'imi 750 ml bo'lgan kolbalarda 100 ml oziqa muhitiga ekilib, chayqatgichda (200 tez/min) 48 soat davomida 28-30°C haroratda o'stiriladi (100 ml oziqa muhitiga 100 mln/hujayra). Ushbu kultura biomassasi oziqa muhitidan sentrifugalash usulida (5000 tez/min) yoki Zaysev filtrida ajratib olinadi (ma'qul usul murabbiy tomonidan tavsiya etiladi).

Sterilizatsiyalash sharoiti. Oziqa muhiti 105-110°C haroratda 1 atmosfera bosimda 20 min. davomida sterillanadi. Oziqa muhitining pH ko'rsatkichi: sterilizatsiyagacha 7,0-7,2 va sterilizatsiyadan keyin 6,8-7,0 ga teng bo'lishi lozim (zarur bo'lganda pH ko'rsatkichi mo'tadillashtirilishi kerak, kulturaning mo'tadil o'sib rivojlanishi uchun oziqa muhiti pH ko'rsatkichini 7,4 da ushlab turish maqsadga muvofiqdir).

pH ko'rsatkichi (suyuq ozuqa muhiti uchun). pH ko'rsatkichi fermentatsiya jarayonigacha 6,8-7,0 bo'lishi kerak; fermentatsiya jarayoni oxirida pH ko'rsatkichi ko'tarilib ketadi (8,0). Tabiiyki oziqa muhitining ishqoriy holatga o'tishi kristallarni kichik bo'laklarga bo'linib ketishiga olib keladi va bu keyingi kristall oqsillarni ajratib olishda qiyinchilik tug'diradi. Shu boisdan fermentatsiya jarayoni tugagandan so'ng,

biomassani ajratib olishda kul'tural suyuqlikning pH ko'rsatkichini 6,2-6,4 darajasigacha keltirib olamiz. Bunda maqsadga muvofiq bo'lgan barcha kristall oqsillarni sentrifugalash (5000 tez/min. 20 min) orqali ajratib olishga erishiladi. Buning uchun HCl ning kuchsiz eritmalaridan foydalanish mumkin.

Talabaning kollokvium topshirishi uchun topshiriqlar:

1. Talaba uslubiy ko'rsatmada berilgan ma'lumotlar va rasmlarni daftoriga qad etgan bo'lishi;
2. Ozuqa muhiti tayyorlashning uch xil variantini (har xil hajmda) tuzib ko'rsatishi;
3. Sterilizasiyalash va o'stirish sharoitlarini bilishi;

4 – laboratoriya ishi

Mavzu: Bakteriyalardan spora va kristallarni ajratib olish va mikroskopda tekshirish

Ishdan maqsad: o'rganilayotgan bakteriyalarning biomassasini ajratib olish, biomassadagi sporalar va kristallarni alohida ajratish va ularning miqdorini mikroskopik tahlil qilishni o'rganishdan iborat.

Ishning tashkil etilishi: murabbiy guruh talabalrini ikki guruhga ajratadi.

Birinchi guruh talabalari: kultural suyuqlikdan mikrob biomassasini sentrifugalash usulida ajratib olishadi va undan belgilangan tartibda kristall oqsillarni ajratishadi;

Ikkinchi guruh talabalari: qattiq ozuqa muhitida o'stirilgan biomassani yig'ib, undan sporalar va kristall oqsillarni belgilangan tartibda ajratishadi.

Har ikkala guruh talabalar oqsillarni quyidagi chizma asosida bajarishlari va mikroskopi tahlil qilishlari lozim. Mikroskop ostida ko'rgan spora va kristall oqsillar rasmlari daftarlarga chizib olinadi.

Dars (ikkinchi juftlik) oxirida talabalar laboratoriya daftarlari qayd etilgan ma'lumotlar asosida kollokvium topshiradi va mashg'ulotga ajratilgan reyting balini oladi. Reyting balini to'play olmagan talaba keyingi mashg'ulotgacha ushbu laboratoriya ishini qayta topshirishi mumkin.

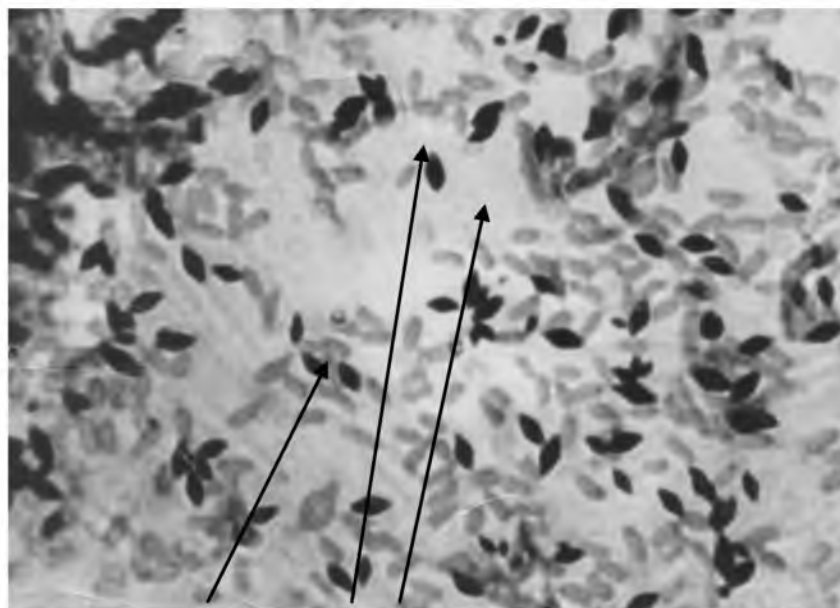
Tushintirish:

Ma'lumki, oqsillar tirik organizmdagi morfologik va boshqa o'zgarishlarning asosini belgilaydi va o'zgargan genotip haqida axborot beruvchi biopolimer modda hisoblanadi. Kristall ko'rinishdagi oqsillarning funksional va aminokislotalari tarkibini o'rganish ularni toza holda ajratib olish muammosini tug'diradi. Ushbu bakteriyalarda, kristallarni spora, vegetativ hujayra va ularning fragmentlaridan ajratish uchun asosan quyidagi usullardan foydalaniladi: xloroform–suv, tetrabrom etan–suv, to'rtxlorli uglevodorod 1% li natriy sulfat, polietilenglikol 6000–dekstransulfat natriy 500, flotasiya, CsCl zichligi gradientida qavatida sentrifugalash va x.k. Ammo ushbu usullar yordamida *Bac. thuringiensis* kulturalaridan toza kristallar ajratib olish katta qiyinchilik tug'diradi. Shu boisdan shtammlardan kristallarni ajratib olishda biz Pendlton usulidan ma'lum bir o'zgartirish kiritgan holda quyidagi tartibda ish olib borish tavsiya etamiz. Pendlton usulida ikki fazali (1% li natriy sulfat–n-ksilol) tozalash usulidan foydalanilgan bo'lsa, biz birinchi bosqichdagi gomogenizatorida aralashtirish va tindirishdagi 1% li natriy sulfat o'rniga kulturani o'stirishda foydalanilgan suyuq oziqa muhitidan, oxirgi bosqichda esa suvdan foydalanamiz.

Pendlton usulini bunday modifikasiya qilish bizga *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* bakteriyasi shtammlaridan 99% dan ko'proq toza kristall ajratib olish imkonini beradi.

Shu nuqtai nazardan tabiiy va mutant shtammalarning umumiy oqsil spektrlarini qiyosiy o'rganish ular genomidagi molekulyar o'zgarishlarni farqlashga va keyingi biotexnologik jarayonlarni bajarishga yordam berishi mumkin. Ushbu oqsillarni toza holda ajratib olish qishloh xo'jaligi, tibbiyot va fundamental tadqiqotlarda katta ahamiyatga ega.

Talabalar ish davomida ushbu kulturalarning quyidagi rasmlardagidek manzaralarni ko'rishlari mumkin:

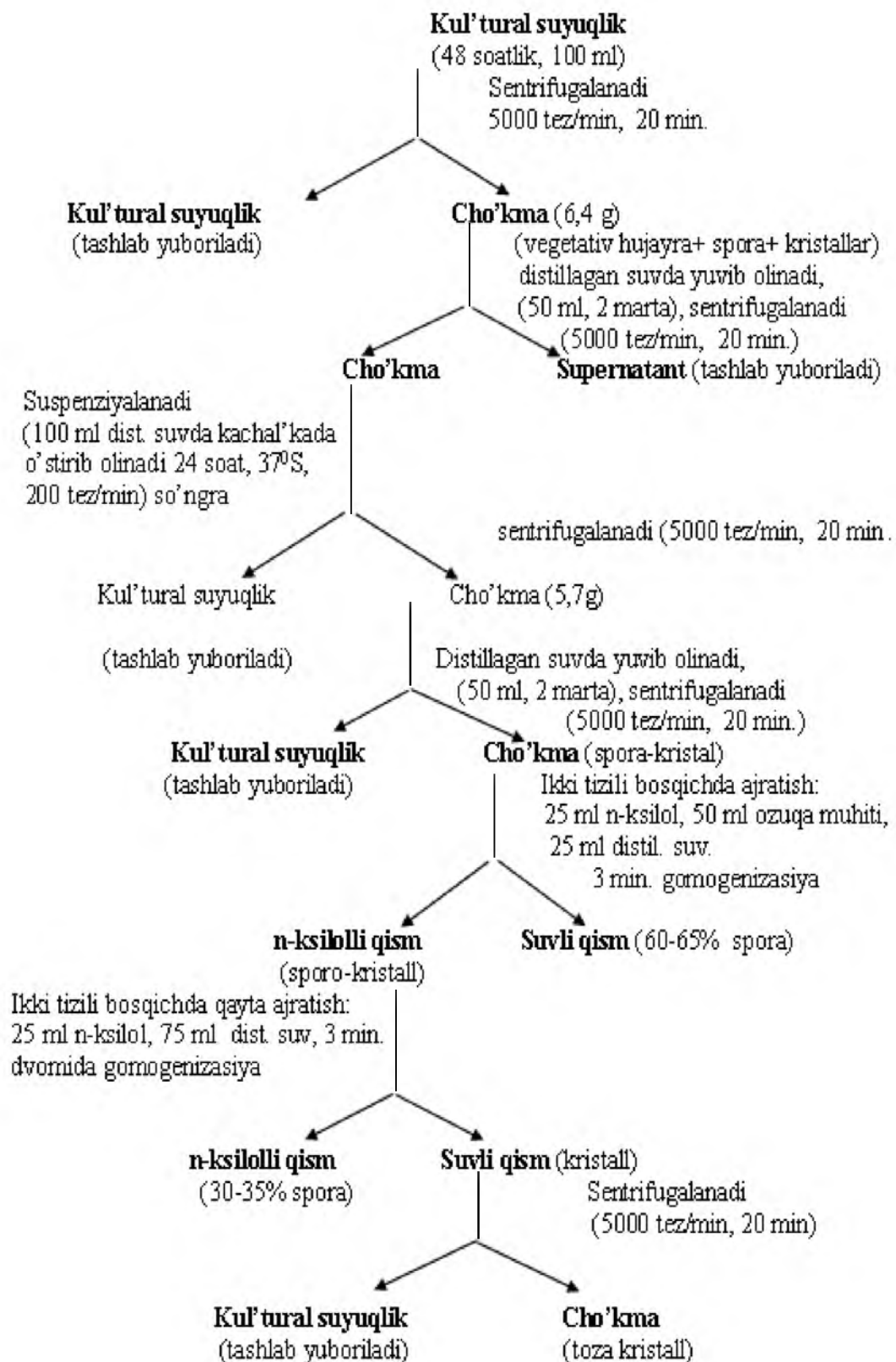


Spora va kristall oqsillar ko‘rinishi

Asbob-uskunalar va materiallar:

- ✓ 500-700 ml-li kimyoviy stakanlar (8 ta);
- ✓ n-ksilol (200 ml);
- ✓ distillangan suv va bir litrli kolbalar;
- ✓ Petri likobchalari (zarur miqdorda);
- ✓ Suyuq ozuqa muhitidan biomassani cho‘ktirish uchun epindorf yoki sentrifuga stakanlari (zarur miqdorda);
- ✓ Sentrifuga;
- ✓ Mikroskop va zarur bo‘yoqlar;
- ✓ pH-metr.

5) Ishning borishi: talabalarga quyidagi chizma asosida ishlash tavsiya etiladi:



Talabani kollokvium topshirishi uchun topshiriqlar:

1. Mikroskop ostida produsentning shaklini, uning zarur metabolitik moddasi shaklini chizib ko'rsatishi;

2. Produsentdan oqsil moddasi ajratishning usulini aytib berishi va amalda bajara olish darajasini ko'rsata olishi;

3. Har bir guruh va kichik guruhchalardagi talabalar ajratgan oqsil va produsentning sporalarini laborantga topshirishi lozim bo'ladi.

Yuqorida berilgan topshiriqlarni bajargan talabalarga belgilangan tartibda reyting bahosi qo'yiladi.

5 – laboratoriya ishi

Mavzu: Mikroorganizmlar tomonidan sintez qilinadigan uglevodlarni aniqlash

1-ish. Ozuqa muhitidagi va kultural suyuqlikdagi glyukoza miqdorini aniqlash

Ishdan maqsad:

O'tkaziladigan o'quv jarayonidan mavzuni o'zlashtirishi natijasida talabalar quyidagilarni biladi:

mikroorganizmlarni o'stirish jarayonida biologik ko'rsatkichlarni aniqlashning asosiy usullarini;

bioreaktorlarning massa almashinish tavsifi, asosiy qonuniyatlarini va hisoblash formulalarini o'zlashtiradi.

Talabalar oldindan belgilangan xususiyatli kultural suyuqlik olish bo'yicha bir qadar xarakterli bo'lgan texnologik jarayonlarni bajarish bo'yicha ko'nimkmalarga ega bo'ladilar.

Ishning tashkil etilishi:

1-jadval

Mashg'ulotda vaqt taqsimoti

	O'quv savollari	Ajratilgan vaqt, minut
	Kirish (mavzu bo'yicha ma'ruza tarzida tushintirish beriladi)	5
	Asosiy nazariya	20
	Amaliy qism: 1. Achitqilarni xemostat usulida o'stirish davomida k-ko'rsatkichini aniqlash; 2. k_S , k_{PS} , G , Y , η - ko'rsatkichlarini aniqlash;	100
	Eksperimental ma'lumotlarni umumlashtirish va tajriba bayonnomasini yozish;	20
	Laboratoriya ishini himoya qilish;	10
	Yakunlovchi qism.	5
	Jami:	160 minut

O'qituvchi o'stirish usullarini o'rgatish uchun talabalarni ikki guruhga ajratadi:

Birinchi guruhdagi talabalar: ozuqa muhiti tayyorlash va kultural suyuqlikdagi glyukozani aniqlashni o'rganishadi.

Ikkinchi guruhdagi talabalar: achitqilarni xemostat usulida o'stirish uskunasi qayilishini kuzatadilar;

O'stirish uskunasi o'stirish jarayonlarini laboratoriya mudiri, ya'ni texnik xodim bajarib berishi lozim.

Har guruhdan 2-3 ta talaba biopreparat olishning asosiy rejimini bajarib ko'rishi kerak. Ishning borish jarayonida o'qituvchi talabalarning savollariga javob berib boradi, talabalar esa ishchi daftarlariga qayd etib borishlari kerak.

Shundan keyin (50 minutdan so'ng) talabalar ishchi o'rinlarini almashtirishadi. Ishchi o'rinni almashtirish rejasi keyingi jadvalda aks ettirilgan:

2-jadval

Ozuqa muhiti va ekuv materialini tayyorlash uchun vaqt me'yorlari

№	Bajariladigan ish	Vaqt, minut	Ishning natijasi
1	Glyukoza asosida 3 l (o'zgarishi mumkin) ozuqa muhiti tayyorlash	10	Ozuqa muhiti tayyorlanadi
2	Achitqidan ekuv materialini tayyorlash	10	Ekuv materialini tayyorlanadi
3	Kultural suyuqlikdagi glyukozani aniqlash	15	Sarf bo'lgan glyukoza miqdori aniqlanadi
4	Mikroskopik usulda hujayralar sonini aniqlash	15	Mikroorganizmlar hujayrasi ko'payishi aniqlanadi

3-jadval

Achitqilarni o'stirish rejasi

№	Bajariladigan ish	Vaqt, minut	Ishning natijasi
1	Achitqilarni xemostat rejimda turli xil F quyilish oraliqlarida o'stirish	50	Har bir F ko'rsatkichidan
2	Ushbu rejimdan namunalar tanlash va laboratoriyaga topshirish		

Tadqiqot natijalarini tahlil qilish va qayta ishlash ushbu vaqt taqsimotiga kiritilmagan. Buni talabalar mustaqil bajarishlari mumkin. Zarur bo'lganda 2 soat audotoriya mashg'uloti tarzida o'tish maqsadga muvofiq bo'ladi.

Tushintirish:

Ma'lumki, har qanday biotexnologik yoki mikrobiologik ishlab chiqarish sanoatida (non va non mahsulotlari ishlab chiqarish, alkogolli yoki turli xil sharbat ichimliklari ishlab chiqari va x.k.) produsentlarni o'stirish va ulardan mahsulotlar olish jarayoni tayyorlanadigan ozuqa muhiti tarkibini to'g'ri tuzish va olingan yoki olinadigan mahsulotlar haqida to'g'ri tahliliy xulosalar chiqarish talab etiladi.

Ishlab chiqarish davomida, sarflanadigan xom-ashyo miqdori, uning mikroorganizmlar tomonidan o'zlashtirilishi va olinadigan mahsulotning miqdori kabi ko'rsatkichlar asosiy e'tibor talab etadigan omillar hisoblanadi.

Ushbu ishda ozuqa tarkibiga kiritilgan glyukoza miqdorining sarf bo'lishi va produsentning miqdori aniqlanadi. Har ikkala ko'rsatkichdan kelib chiqib glyukozaning sarfi va maqsaddagi mahsulotning chiqishi kabi asosiy ko'rsatkichlar haqida ma'lumot olish mumkin.

Zarur asbob-uskunalar va materiallar:

1. Fermentyor (zarur hollarda mikrobiologik chayqatgichdan ham foydalanish mumkin);
2. O₂ aniqlagichi;
3. kompressor (P - 1 atm. kam bo'lmasligi lozim);
4. Aylanma tubli kolbalar (250-350 ml), o'lchov naychalari – byuretkalar (500-300 ml);
5. Menzurkalar (5, 10, 25, 300 ml), pipetkalar (2-5 ml);
6. 0,5-1,0 n. natriy sulfit eritmasi;
7. 0,1 n. natriy tiosulfat eritmasi;
8. 0,1 n. yod eritmasi;
9. Glyukoza – 1 kg (zarur miqdori olinishi mumkin);
10. Etil spirti – 0,5 kg;
11. *S. cerevisiae* kulturasi (75% namlik holatidagi 100 g quruq preparat);
12. Glyukoza miqdorini aniqlash uchun reaktivlar to'plami.

Ishning borishi:

1) Ozuqa muhiti tayyorlash uchun:

- ✓ 5 litr o'lchamli steril idishga 0,5 kg glyukoza solinadi;
- ✓ 0,1 g NaCl, MgSO₄, KCl olinib, ushbu idishga solinadi;
- ✓ Ushbu idishga 36⁰C haroratli distillangan 3 l suv quyiladi va yaxshilab aralashtiriladi;
- ✓ Fotokolometrik usulda glyukoza miqdori aniqlanadi;
- ✓ Tajriba bayonnomasini to'ldiriladi.

2) Ekv materialini tayyorlash uchun:

- ✓ 50 g. *S. cerevisiae* achitqisi o'lchab olinadi;
- ✓ 500 ml hajmli idishga 300 ml distillangan 36⁰C haroratli suv quyib olinadi;
- ✓ O'lchab olingan achitqi namunasi ushbu idishga ya'ni suvga solinib yaxshilab aralashtiriladi;
- ✓ Mikroskopik usulda ekv materiali miqdori nazorat qilinadi;
- ✓ Tajriba bayonnomasi to'ldiriladi.

3) Achitqilarni o'stirishni boshlash uchun:

- ✓ 36⁰C haroratli 5 l steril ozuqa muhiti o'stirish uskunasi quyiladi (zarur bo'lganda termoregulyatorni qo'shish mumkin);
- ✓ 300 tez/min. da aylanadigan aralashtirgich (meshalka) yoqiladi va unga ekv materiali quyiladi;
- ✓ Jarayon 15-20 minut davom ettiriladi, unga zarur bo'lganda ko'piksizlantiruvchi (10 ml) modda qo'shiladi;
- ✓ Shundan keyin xemostat rejimi boshlanadi. Buning uchun o'stirish uskunasi alohida idishdagi ozuqa muhiti qo'shiladi, ya'ni qancha miqdorda F quyilsa, bir vaqtning o'zida shuncha miqdordagi kultural suyuqlik ajratib olinadi;
- ✓ Ushbu rejimda har 5 minut davomida 5 ml miqdorida probirkalarga alohida-alohida namunalar olinadi va glyukoza miqdori va mikroorganizmlar sonini tahlil qilish uchun olib qo'yiladi;
- ✓ Namunalarning miqdorlari aniqlanadi;
- ✓ Achitqilar miqdori mikroskopik tahlil va fotokolometrik usulda aniqlanadi;
- ✓ Quyidagi jadvalga olingan natijalar qayd etiladi:

Tadqiqot natijalari

Namunalar №	Tajriba natijalari		Hisoblash natijalari		
	$F, l/soat$	$S_{chiqish}, g/l$	$DqF_1/V_p, soat^{-1}$	$1/S$	$1/kq1/D, soat$
1					
2					
3					
4					

Talabaning kollokvium topshirishi uchun topshiriqlar:

1. Talaba uslubiy ko'rsatmada berilgan ma'lumotlar va chizmalarni daftariga qad etgan bo'lishi;

2. Ozuqa muhiti tayyorlashni bilishi va amalda ko'rsatib berishi;

3. Ozuqa tarkibidagi glyukoza miqdorini fotokolometrik usulda aniqlay bilish;

4. Ekv materialidagi produsentlar miqdorini mikroskopik nazorat qila olishi;

5. Kultural suyuqlikdagi glyukoza miqdori va mikroorganizmlar sonini hisoblab borishni amalga oshirishi va olingan natijalar asosida yuqorida berilgan jadvalni to'ldirishlari lozim.

Yuqorida berilgan topshiriqlarni bajargan talabalarga belgilangan tartibda reyting bahosi qo'yiladi.

2-ish. Olingan tajriba natijalarini qayta ishlash (hisoblash)

1. D, S^{-1}, k^{-1} ko'rsatkichlarini hisoblang;

2. $1/k$ q $f(1/S)$ grafigini tuzing;

3. Ushbu grafikdan $1/k_m \times soat$ yoki $soat^{-1}$, shuningdek k_s ni quyidagi formula bo'yicha aniqlang: $k_s q k_m \times tg\alpha_1, kg/m^3$.

4. $S-S_0, S[k(k_s+S)]^{-1}$ ko'rsatkichini hisoblang va yuqoridagi jadvalni to'ldiring.

5. $S[k(k_s+S)]^{-1}$ q $f(S_0-S)$ grafigini tuzing.

6. k_{ps} ko'rsatkichini quyidagi formula bo'yicha hisoblang: $k_{ps}(tg\alpha_2 \times k_m)$.

7. k_s va $k_{\max}$ ko'rsatkichini aniqlashtiring. Buning uchun ushbu grafikni tuzing: $k_{ps}[k(k_{ps}+S_0-S)]^{-1}qf(S^{-1})$. Quyidagi formula bo'yicha k_{sq} $k_m \times \text{tg}\alpha_3$ k_s ni hisoblash uchun grafikdan k_m va $\text{tg}\alpha_3$ ni aniqlang.

8. O'stirish uskunasi samaradorligini (G) quyidagi formula bo'yicha hisoblang:

$$G = k_{\max} \frac{S_0 - \alpha_x}{k_{ps} + S_0 - \alpha_x} \times \frac{k_{ps}}{k_{ps} + \alpha_x} \times X$$

9. Iqtisodiy koeffitsienti (Y) quyidagi formula bo'yicha hisoblang:

$$G_{\text{o'rtiyacha}} = \frac{S_0 - S}{\alpha_\tau}, \quad Y = \frac{X_k - X_0}{S_0 - S}$$

bu erda α - kg/kg biomassa birligi hosil bo'lishi uchun sarflanadigan substrat miqdori.

ADABIYOTLAR

1. Волова Т.Г. Биотехнология. Учебное пособие. Издательство Ко Ран, Новосибирск, 1999.
2. Елинова Н.Р. Основы биотехнологии. Санкт-Петербург “Наука”, 1995.
3. Нестерова О.А., Гореликова Г.А., Познайковский В.М. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения. Новосибирск, 2007.
4. Biotexnologiya asoslari. Elektron darslik. TXTI – 2006.
5. Komilov X.M., Raximov M.M., Odilbekova D.Yu. Biotexnologiya asoslari. Elektron darslik. Toshkent. “EXTREMUM PRESS”, 2010.
6. Oziq-ovqat va ozuqa mahsulotlari biotexnologiyasi. Elektron darslik. TXTI – 2006.
7. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. Биотехнология. Москва “Высшая школа”, 1987.
8. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию. Минск. БГУ – 2002.
9. Бекер М.Е. Введение в биотехнологию. Пищевая промышленность, 1978.
10. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Дегтярев С.В. Сельскохозяйственная биотехнология. Высшая школа, 1998.

MUNDARIJA

№	Mavzularning nomi	Bet
1	Biotexnologiya laboratoriyasiga qo'yiladigan asosiy talablar va asbob-uskunalar bilan ishlash tartibini o'rganish.....	3
2	Hujayra va to'qima to'plamlari bilan ishlash jarayonida sterillash usullari.....	14
3	Mikroorganizmlarni ekish uchun ozuqa muhiti tayyorlash va sterilizasiya qilish hamda produsentni suyuq va qattiq ozuqa muhitida o'stirish.....	19
4	Bakteriyalardan spora va kristal oqsillarni ajratib olish va mikroskopda tekshirish.....	22
5	Mikroorganizmlar tomonidan sintez qilinadigan uglevodlarni aniqlash. 1-ish. Ozuqa muhitidagi va kultural suyuqlikdagi glyukoza miqdorini aniqlash. 2-ish. Olingan tajriba natijalarini qayta ishlash (hisoblash).....	25
6	Adabiyotlar.....	29

Muharrir: Saidova K.A.

Musahhih: Adilxodjayeva Sh.M.