

AJRATILGAN O'SIMLIK HUJAYRALARI VA TO'QIMALARI BILAN ISHLASH JARAYONIDA STERILLASH USULLARINI O'RGANISH

Ajratilgan o'simlik hujayralari va to'qimalari to'plamlari bilan ishlash jarayonida sterillash usullari.

Asbob-uskunalar va materiallar: 500-700 ml li kimyoviy stakanlar (2 ta), distillangan suv uchun bir litrli kolba. Petri likobchalari, buyum oynalar, skalpel, pinsept, igna, doka xaltachalar (2 ta), sterilizator, natriy bikarbonatning 1% li eritmasi, Murasige-Skuga oziqa muhitli probirkalar, avtoklav, quritish shkafi, sovuq sterillash uchun 0,15-0,45 mkm teshikli filtrlar.

Tushuntirish. Ajratilgan organlar, to'qimalar, hujayra va protoplastlarni o'stirishning muhim shartlaridan asosiysi sterillikka katta ahamiyat berishdir. Sterillikni ahamiyati shundan iboratki, ajratilgan organlar, to'qimalar, hujayralar va protoplastlarni o'stirish uchun tayyorlangan sun'iy oziqa muhitlarda 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 oziqa muhitlarning tarkibi sezilarli darajada o'zgarib, belgilangan turg'un sharoitda hujayraning o'sishi to'xtaydi. Ikkinchidan, o'simlikdan ajratilgan to'qima, hujayra va ayniqsa protoplastlarni mikroorganizmlar osongina zararlaydi. 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, oziqa muhitlari, paxta tiqinlar va boshqa ishga kerakli narsalar hammasi sterillanadi.

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 bakteriotsid 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 artib, sterillangan xalat kiyib va 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 xromli (kaliy bixromatning sulfat kislota eritmasi) ishlatiladi. YUvilgan idishlarni distirlangan suvda chayib, quritish shkafida quritiladi. Sterillashdan avval havodan infeksiya tushishining oldini olish uchun probirkalar, kolbalar og'zi paxta tiqinlar bilan yopiladi va qog'ozga o'raladi. So'ngra idishlarni quritish shkaflariga joylab 2 soat 160° S da qizdiriladi. Bunday qizdirishda bakteriyalargina emas, balki ularning sporalar ham o'ladi. Quritish shkafidagi haroratni 175° S 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 likobchalari, pipetkalar, distillangan suvli kolbalar avtoklav qilinadi. Idishlar folga yoki o‘rash qog‘ozlariga o‘ralgan holda 25-30 daqiqa 2 atmosferada avtolav qilinadi. Pipetkalarni avtoklav qilishda ularning yuqori qismiga paxta tiqib, alohida-alohida qilib o‘raladi.

Asbob uskunalarni sterillash. Asbob uskunalari, skalpel pinset, ignalar va hakoza quritish shkaftida 12 soat davomida 140⁰S quruq issiqlikda yoki suvda qaynatib sterillanadi. Temirdan yasalgan asboblari avtoklav qilinmaydi, chunki nam bug‘ ta’sirida ular zanglaydi va o‘tmas bo‘lib qoladi. 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 faqat bir marta ishlatiladi, qayta ishlatilganda ular yana spirtida sterillanadi va alangada qizdiriladi. Igna va pakkilar spirtga solib sterillanadi.

Materillarni sterillash. Tajribada ishlatiladigan paxta, doka, paxta tiqinlar filtr qog‘ozlar, xalatlar va ro‘mollar vatoklavda 2 atmosferada 25-30 daqiqa sterillanadi.

O‘simlik materillarini sterillash. Urug‘lar, yuqori meristemalar, o‘simlikning 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, diotsid, 10% li natriy gipoxloridning suvdagi eritmalaridan foydalaniladi. Ildiz mevalar, tuganaklar, 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 ob’ektlari sterillangandan so‘ng, sterillovchi moddalardan tozalash uchun distillangan suvda ko‘p marta chayilishi kerak. Ayniqsa bromidli suv bilan ishlov berilgan o‘simlik materillarini diqqat bilan yuvish kerak chunki bromidning eng kam miqdori ham urug‘larning o‘shini to‘xtatib qo‘yadi. Brom bug‘i zaharli bo‘lganligi uchun, brom bilan sterillashda albatta tyaga shkaflaridan foydalanish kerak. Brom eritmasida faqat makka urug‘larini sterillashda foydalanish tavsiya etiladi, loviya, qovoq va boshqalar uchun – sulema ishlatiladi. Brom va sulema bilan sterillash vaqti 10-15 daqiqani, pergidrol bilan 30 daqiqani tashkil qiladi. Meristemalar va o‘simliklarning har xil qismlaridan olingan bo‘laklari ikki marta tezroq sterillanadi. Tukli urug‘lar (chigit) yuqori konsentratsiyali sulfat kislotasiga 5 daqiqa solinsa yaxshi sterillanadi. Pergidroldan urug‘lar osonroq yuviladi (steril suv 5-7 marta o‘zgartiriladi). Sulemadan so‘ng suv 5-6 marta o‘zgartiriladi. Bromdan so‘ng suv 12 soat davomida, yuvishning boshida har 30 daqiqada, so‘ngra esa har 3 soat davomida almashtirilib turiladi. Antiseptiklar bilan ishlov bermasdan, pomidor, olma, qovoq, tamaki va dukkaklilardan steril urug‘lar olish mumkin. Etilish davrida bu o‘simlik urug‘lari go‘shli, yog‘ochli yoki danakli qatlamlar orasida joylashgan bo‘ladi. Sog‘ va zararlanmagan bu mevalar sovunli suvda va spirtida 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.

Oziqa muhitlarini sterillash. Oziqa muhitlari bosim ostida (avtoklavda) bug‘ bilan sterillanadi. Oziqa muhitlari solingan probirkalar og‘zi paxta tiqinlar bilan

yopilib stakanlarga solinib, o‘rash qog‘oziga o‘raladi va 1 atmosfera bosimda 120⁰ S da 20 daqiqa davomida avtoklav qilinadi.

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

Ishning borishi. Kartoshka va qulupnay apikal meristemalarini ajratish va o‘stirish uchun kerakli bo‘lgan asboblari, idishlar, oziqa muhitlari sterillanib olingan bo‘lishi shart.

1. Petri likobchalari (2 ta), 500-700 ml li kimyoviy stakanlar (2 ta) va buyum oynachalar pishiq qog‘ozga o‘ralgan holda 160⁰ S da 2 soat davomida quritish shkaflarida sterillanadi.

2. Skalpel, ajratish ninalari, pinsetlar quritish shkafida 140⁰ S da 1 soat davomida sterillanadi va tayyorlangan asboblari laminardagi qog‘oz varaqlari orasiga joylanadi.

3. Og‘zi paxta tiqinlar bilan yopilgan probirkalardagi oziqa muhitlari 1 atmosfera bosimda 20 daqiqa davomida sterillanadi. Oziqa muhitli probirkalar 10-20 tadan stakanga solingan bo‘lishi kerak. Bir vaqtning o‘zida o‘simlik materiallari uchun doka xaltachalarni qog‘ozga o‘rab avtoklav qilinadi.