ზაურ ლომთათიძე | ნანა კოტია

მიკრობიოლოგიის კვლევის თანამედროვე მეთოდები

ELIBRARY.SOU.EDU.GE
SOKHUMI STATE UNIVERSITY

ს ა რ ჩ ე ვ ი

თავები	**თემების დასახელება**	**გვ**
	შესავალი	**5**
თავი 1	**მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიის მოწყობილობა**	**15**
	მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიის მოწყობა; მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიის მუშაობისა და უსაფრთხოების წესები; მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიის მომზადება სამუშაოდ; ასეპტიკა, ანტისეპტიკა, დეზინფექცია; ბოქსის მომზადება სამუშაოდ; ლაბორატორიული ჭურჭელი - დამუშავება და რეცხვა.	
თავი 2	**მიკროსკოპია**	**21**
	სინათლის მიკროსკოპი; მიკროსკოპის მექანიკური ნაწილი; მიკროსკოპის ოპტიკური ნაწილი; პლანოქრომატი.	
თავი 3	**მიკროსკოპის ძირითადი მახასიათლები**	**24**
	ობიექტივის გადიდება; მიკროსკოპის გადიდება; ოკულარი; მიკროსკოპის მუშაობის წესები; იმერსიული ობიექტივი; განათების დაყენება;პ რეპარატის განათება კელერის მიხედვით; მიკროსკოპია ბნელ ველში; ფაზ-კონტრასტული მიკროსკოპია; ლუმინესცენტრული მიკროსკოპია; ელექტრონული მიკროსკოპია.	
თავი 4	**მიკროორგანიზმების ცოცხალი უჯრედების პრეპარატები**	**31**
	პრეპარატი "გაჭყლეტილი წვეთი"; პრეპარატი „ჩაკიდული წვეთი"; პრეპარატი „ანაბეჭდი"; პრეპარატი მიკროკულტურა ანუ აგარის ფირფიტა; მიკროორგანიზმთა და ფიქსირებული შეღებილი პრეპარატები; მიკროორგანიზმთა და უჯრედების ზომის განსაზღვრა.	
თავი 5	**მიკროორგანიზმთა კვლევის ციტოქიმიური მეთოდები**	**36**
	მიკროორგანიზმთა უჯრედების შეღებვა გრამის მეთოდით; გრამის მიხედვით შეღებვის ტექნიკა; გრამის მეთოდი სინევის მოდიფიკაციით; გრამის მეთოდი კალინის მოდიფიკაციით; საღებავები და რეაქტივები გრამის წესით შეღებვისათვის.	
თავი 6	**ბაქტერიების მუავემედეგობის განსაზღვრა ცილ-ნილსენის მეთოდით**	**38**
	სპორების შეღებვა; ცილ-ნილსენის მეთოდი მიულერის მოდიფიკაციით; პეშკოვის მეთოდი; კაფსულების შეღებვა; კაფსულების შეღებვა გინსის მეთოდით; შოლტების შეღებვა; ლეფლერის მეთოდი; მოროზოვის მეთოდი; ბაქტერიების ბირთვული ნივთიერების შეღებვა; რომანოვსკი-გიმზის მეთოდი; ფელგენის მეთოდი; ომელიანსკის მეთოდით ვოლუტინის (მეტაქრომატინული გრანულების) შეღებვა; გლიკოგენის შეღებვა; გრანულოზის შეღებვა; ცხიმების შეღებვა.	

თავი 7	**მიკროორგანიზმები და კვება**	**45**
	საკვები არეების შერჩევის ძირითადი პრინციპები; საკვები არეები; დიფერენციალურ-დიაგნოსტიკური საკვები არეები; საკვები არეების მომზადება. ხორცპეპტონიანი ბულიონი (ხპბ); ხორცპეპტონიანი აგარი (ხპა); ხორცპეპტონიანი ჟელატინი (ხპჟ); კარტოფილის აგარი; ლუდის სუსლო და სუსლო აგარი; გაუცხიმოვნებული რძე; საფუვრიანი საკვები არეები; საფუვრის წყალი; საფუვრის ავტოლიზატი; საფუვრის ექსტრაქტი.	
თავი 8	**მიკროორგანიზმთა კულტივირების პირობები**	**52**
	აერობული მიკროორგანიზმების კულტივირება; ტემპერატურა; სინათლე; წყალი; პერიოდული და უწყვეტი კულტივირება.	
თავი 9	**მიკროორგანიზმთა კულტურების შენახვა**	**57**
	მინერალურ ზეთში შენახვა; ლიოფილიზაცია; მიკროორგანიზმთა შენახვა დაბალ ტემპერატურაზე; შენახვა გლოცეროლში; შენახვა დისტილირებულ წყალში; უჯრედების მშრალად შენახვა ადსორბენტებზე; მიკროორგანიზმთა სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა ხანგრძლივი შენახვის შემდეგ.	
თავი 10	**მიკროორგანიზმთა კულტურებთან მუშაობის წესები**	**58**
	თესვის ტექნიკა; მიკროორგანიზმთა სუფთა კულტურები; დაგროვებითი კულტურა; სუფთა კულტურის მიღება ცალკეული კოლონიიდან; სუფთა კულტურის გამოყოფა ერთი უჯრედიდან ლინდნერის წვეთოვანი მეთოდი; სუფთა კულტურების გამოყოფა მიკრომანიპულატორის გამოყენებით; კულტურის სისუფთავის განსაზღვრა.	
თავი 11	**სტერილიზაციის მეთოდები**	**64**
	ფლამბირება ანუ გამოწვა; მშრალი ჰაერო სტერილიზაცია; სტერილიზაცია გამდინარე ორთქლით. ტინდალიზაცია; კოხის მადუღარა; წნევის ქვეშ ნაჯერი ორთქლით სტერილიზაცია; პასტერიზაცია; ცივი სტერილიზაცია-გაფილტვრა წვრილფოროვანი ფილტრებით.	
თავი 12	**მიკროორგანიზმთა რაოდენობრივი აღიცხვა**	**67**
	უჯრედების რაოდენობის განსაზღვრა; მიკროორგანიზმთა უჯრედების გადათვლა მიკროსკოპის ქვეშ; უჯრედების დათვლა სათვლელ კამერებში; უჯრედების დათვლა პერფილევის კაპილარებში; Uუჯრედების დათვლა ფიქსირებულ-შეღებილ ნაცხზე (ვინოგრადსკი-ბრიდის მეთოდი); უჯრედების დათვლა მემბრანულ ფილტრებზე; მიკროორგანიზმთა რაოდენობის განსაზღვრა საკვებ არეებზე განთესვით; კოხის მეთოდი (მყარ საკვებ არეებზე მიკროორგანიზმთა რაოდენობის განსაზრვრა); განზავებების მომზადება; დათესვა; მიკროორგანიზმთა უჯრედების რადოენობრივი აღრიცხვა თხევად საკვებ არეებში; განზავების მომზადება; დათესვა და შედეგების რეგისტრაცია; ბიომასის განსაზღვრა წონითი მეთოდით; უჯრედების რაოდენობის განსაზღვრა	

	ნეფელომეტრული მეთოდით.	
თავი 13	**მიკროორგანიზმების უჯრედის ფორმა**	**75**
	ბაქტერიები; ჩხირისებრი ბაქტერიები; ძაფისებრი ფორმები; ხვეული ფორმები; სპიროქეტები; რიკეციები, ქლამიდიები, მიკოპლაზმები; მიქსობაქტერიები ანუ მოსრიალე ფორმები; აქტინომიცეტები; ნოკარდიები; მიკობაქტერიები; სოკოები; ზიგომიცეტები; ასკომიცეტები-ჩანთიანი სოკოები; დეიტერომიცეტები - უსრული სოკოები; საფუვრები.	
თავი 14	**მიკროორგანიზმთა უჯრედის ბიოქიმიური შესწავლის მეთოდები**	**81**
	უჯრედების დაშლის მეთოდები; ჰომოგენიზაცია; უჯრედების გასრესა; უჯრედის გასრესა მინის ბურთულებით; ულტრახმოვანი დეზინტეგრატორით დამუშავება; ფრენჩ-პრესი; X-პრესი; უჯრედების ლიზისი ფერმენტების გამოყენებით; უჯრედების ლიზისი დეტერგენტების გამოყენებით; უჯრედების ლიზისი ორგანული გამხსნელებით; ლიზისი ოსმოსური შოკით; ლიზისი გაყინვა-გალღობის მონაცვლეობით; ცილის განსაზღვრა; ცილის განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით; ცილის განსაზღვრა ლოურის მიხედვით; ნუკლეინის მჟავების (ნმ) განსაზღვრა; დნმ-ის გამოყოფა-გასუფთავება და განსაზღვრა; დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების განსაზღვრა; ნმ-ის ჰიბრიდიზაცია; 5 S და 16 S რნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების კატალოგიზაცია; პოლი- ß-ოქსიერბომჟავას განსაზღვრა; პოლისაქარიდების გამოყოფა და ანალიზი; მიკროორგანიზმების უჯრედის კედლის შემადგენლობა; უჯრედის კედლის ფრაქციების კვლევა; პეპტიდოგლიკანის შედგენილობის კვლევა.	
თავი 15	**დუღილი**	**91**
	სპირტული დუღილი; CO_2 განსაზღვრა; დუღილის ინტენსივობის განსაზღვრა; ეთანოლის განსაზღვრა; რძემჟავა დუღილი; რძემჟავა ბაქტიერების მიკროსკოპირება; თვისებრივი და რაოდენობრივი რეაქციები რძემჟავაზე; ერბომჟავა დუღილი; ერბომჟავა ბაქტერიების მიკროსკოპირება; თვისებრივი რეაქცია ერბომჟავაზე; პექტინური ნაერთების დუღილი; მიკროსკოპირება; ცელულოზის დუღილი.	
თავი 16	**აზოტშემცველი ორგანული ნაერთების მინერალიზაცია**	**100**
	ცილოვანი ნაერთების ამონიფიკაცია; მიკროსკოპირება; თვისობრივი რეაქცია ცილების ლპობად დაშლაზე; შარდოვანას ამონიფიკაცია; ნიტრიფიკაცია; ნიტრიფიკატორი ბაქტერიების გამოვლენა მყარ საკვებ არეებზე; ნიტრიფიკაციის პირველი ფაზა; ნიტრიფიკაციის მეორე ფაზა; ნიტრიფიკაციის პროცესი თხევად საკვებ არეებზე; დენიტრიფიკაცია; აზოტფიქსაცია; სიმბიოტური აზოტფიქსატორები; თავისუფლად მცხოვრები აზოტფიქ-სატორები; ასოციაციაცური ბაქტერიები.	
თავი 17	**გენეტიკის ძირითადი კანონზომიერებები**	**110**

	ძირითადი წარმოდგენები; მუტაგენეზი; სპონტანური მუტაციები; ინდუცირებული მუტაციები; მუტაგენის შერჩევა; ულტრაიისფერი გამოსხივება (უი); ნიტროზოგუანიდინი; აზოტოვანი მჟავა; მაალკილირებელი აგენტები; მუტაგენებთან მუშაობისას უსაფრთხების წესები; მუტაციის ექსპრესია; მუტანტების გადარჩევა; მუტანტების პირდაპირი გადარჩევა; მუტანტების არაპირდაპირი გადარჩევა; ინდიკატორული საკვები არეების გამოყენება; ანაბეჭდის მეთოდი; მუტანტური უჯრედების პენიცილინით გამდიდრების მეთოდი; გენეტიკური ინფორმაციის გადატანა ბაქტერიებში; ტრანსფორმაცია; კონიუგაცია; არაკონიუგაციური პლაზმიდების მობილიზაცია; შეჯვარება.	
თავი 18	**მიკროორგანიზმების სისტემატიკა და იდენტიფიკაცია**	**124**
	სახელწოდებების შერჩევის ძირითადი პრინციპები; აღწერა და იდენტიფიკაცია; კულტულარული თვისებები; მორფოლოგიური მახასიათებლები; ფიზიოლოგო-ბიოქიმიური თვისებები; უჯრედის შემადგენლობის განსაზღვრა; გენის სისტემატიკა.	
თავი 19	**მიკროორგანიზმთა ეკოლოგია**	**132**
	ადამიანის მიკროფლორა; ნიადაგის მიკროფლორა; წყლის მიკროფლორა; ჰაერის მიკროფლორა.	
თავი 20	**ანტიბიოტიკები**	**142**
	ანტიბიოტიკების წარმოქმნა; მიკროორგანიზმების ანტიბიოტიკური აქტივობის განსაზღვრა; პერპენდიკულარული შტრიხების მეთოდი; აგარის ბლოკების მეთოდი; ანტიბიოტიკების მიმართ მიკროორგანიზმების მგრძნობელობის განსაზღვრა;	
	ლიტერატურა	**144**

შესავალი

მიკროორგანიზმები-უმცირესი ცოცხალი არსებები, რომელთა ზომა უმეტეს შემთხვევაში არ აღემატება 0.1-02მმ, რაც მათ გადიდების გარეშე უხილავს ხდის ადამიანის თვალისათვის. მიკრობთა სამყარო, რომელიც ჩვენს პლანეტაზე არსებობს არის ძალზე მრავალფეროვანი და მრავალრიცხოვანი. ისინი განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან როგორც მორფოლოგიური, ასევე ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური თავისებურებებით. მიკროორგანიზმები შეიძლება დავყოთ ორ ძირითად ჯგუფად - პროკარიოტები და ეუკარიოტები. პროკარიოტებში ბირთვული აპარატი ე. წ. ნუკლეოდი წარმოდგენილია დნმ ერთი მოლეკულით და შეესაბამება ერთ ქრომოსომას. ეუკარიოტებში ბირთვი შეიცავს ქრომოსომების კომპლექტს და გამოყოფილია ციტოპლაზმისაგან მემბრანით. ბირთვული აპარატის ორგანიზაციაში არსებული განსხვავებები კორელირებს ეუ- და პროკარიოტების სხვა თავისებურებებთან [ცხრილი №--].

განსხვავება პროკარიოტებსა და ეუკარიოტებს შორის

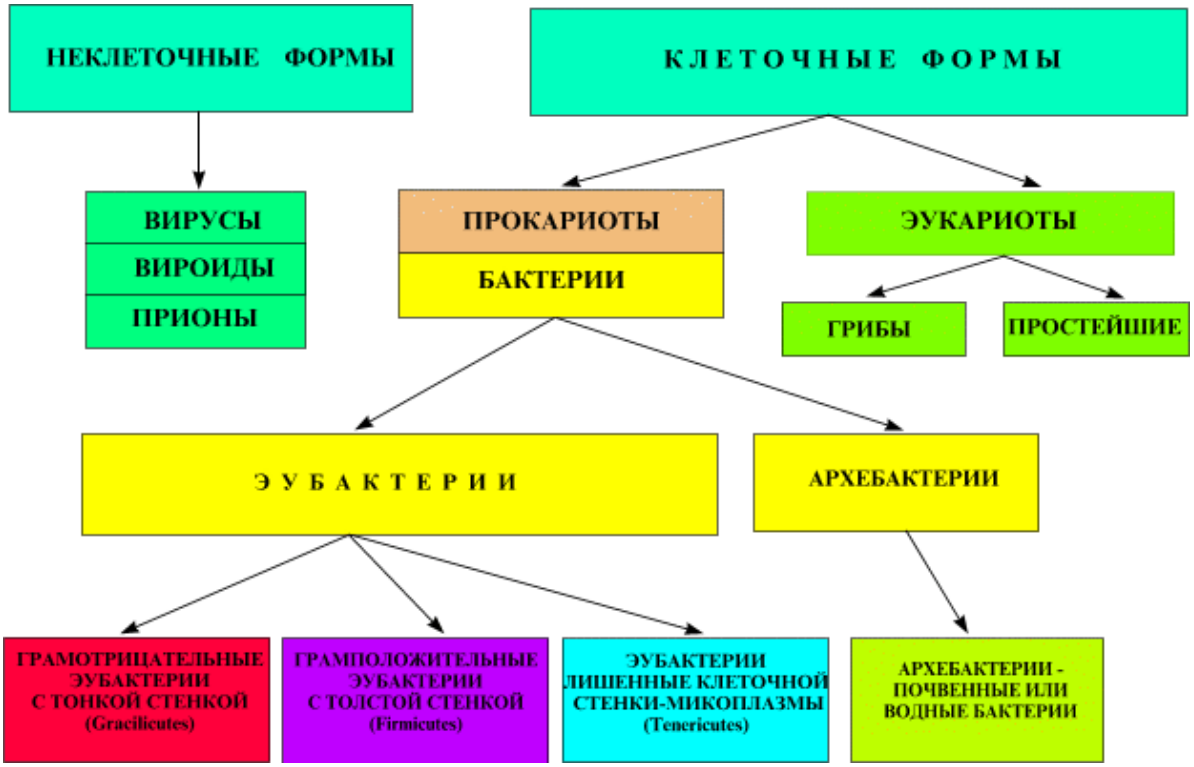
მახასიათებლები	პროკარიოტები	ეუკარიოტები
ციტოლოგიური ნიშან-თვისებები		
უჯრედის უმცირესი ზომა-0.2მკმ	+	
ფორმირებული ბირთვი	-	+
ავტონომიური ორგანელები-მიტოქონდრიები, ქლოროპლასტები	-	+
რიბოსომების ლოკალიზაცია		
განაწილებულია ციტოპლაზმაში	-	-
მიმაგრებულია ენდოპლაზმატურ რეტიკულუმზე	+	+
შოლტები (თუ არის)		
დიამეტრი 0.01-0.02მკმ	+	-
ანათლის ფორმულა 8+1	-	+
დიამეტრი 0.2მკმ		
ანათლის ფორმულა 9+2	-	+
მოლეკულურ-ბიოლოგიური თავისებურებები		
ქრომოსომების რაოდენობა	1	>1
რგოლური ქრომოსომა	1	>1

ხაზოვანი ქრომოსომა	1	>1
რიბოსომების სედიმენტაციის კონსტანტა		
70S	+	-
80S	-	+
რიბოსომული რნმ სედიმენტაციის კონსტანტა		
5S; 16S; 23S; 5S; 5.85S; 18S; 28S;	+ -	- +
ნიშნები, რომლებიც ეყრდნობა ქიმიურ ანალიზს		
პეპტიდოგლიკანი	+	-
გამრავლების თავისებურებანი		
უჯრედის დაყოფა მიტოზის გზით; მეიოზი	-	+
გენების გადატანა და რეკომბინაცია (გამოტეგენეზი; ზიგოტის წარმოქმნა)	+(-)	+
კვება		
დიფუზია ან ტრანსპორტი მემბრანის გავლით	+	+
ენდოციტოზი	-	+
მეტაბოლიტური თავისებურებანი		
სუნთქვის და მაფოტოსინტეზირებელი აპარატი ასოცირებრული პლამზატურ მემბრანასა და მის გამონაზარდებთან	+	+
ქემოლითოტროფული მეტაბოლიზმი; მოლეკულური აზოტის ფიქსაცია; მეთანოგენეზი	+	+
ანოქსიგენური ფოტოსინთეზი	+	-

მიკროორგანიზმები

არაუჯრედული ფორმები – ვირუსები, ვიროიდები, პრიონები.

უჯრედული ფორმები – ბაქტერიები; სოკოები; უმარტივესები



პროკარიოტები. პროკარიოტებში განასხვავებენ ბაქტერიებს (ეუბაქტერიები) და არქეებს (არქებაქტერიები), ამ კლასიფიკაციის საფუძველი არის 16S რიბოსომული რნმ ოლიგონუკლეოტიდური თანმიმდევრობების შედარება, ასევე უჯრედის კედლის შემადგენლობებში აღმოჩენილი განსხვავებები და რიგი სხვა თავისებურებებისა. ცნობილი პროკარიოტების უმრავლესობა ეუბაქტერიებს მიეკუთვნება, არქიბაქტერიები კი წარმოდგენილია მეთანოგენებით, სულფატრედუქტორებით, ექსტრემალური ჰალოფილებით, თერმოპლაზმებით, რომლებიც მოკლებულია უჯრედის კედელს, ასევე ექსტრემალური თერმოფილური ბაქტერიებით, რომლებიც აღადგენენ და ჟანგავენ გოგირდს.

უჯრედის ზომა და ფორმა

პროკარიოტების უმრავლესობა ერთუჯრედიანი ორგანიზმია, ზომით 0.2 – 10.0მკმ. მათ შორის არის "ჯუჯა" ფორმებიც – 0.1 მკმ –ტრიპონემები და მიკოპლაზმები და "გიგანტები" 100მკმ ***Achromatium*** და ***Macromonas***. ფორმით ბაქტერიები მრავალფეროვნია - ჩხირები (ჩხირისებური), კოკები(მრგვალი), ვიბრიონები(მოღუნული ჩხირისებური), სპირილები (სპირალური), სპიროქეტები. არის ასევე სამკუთხა, კვადრატული და ბრტყელი უჯრედები, რომელთაც გააჩნიათ გამონაზარდები-პროსტეკები. [სურათი№----].

უჯრედების დაჯგუფების ტიპი ხშირ შემთხვევაში ბაქტერიის სისტემატიკურ მდგომარეობას განსაზღვრავს. ისინი შეიძლება იყოს ცალობით, დაწყვილებული, გაერთიანებული სწორი ძეწკვისებური ფორმის სახით (სტაფილოკოკები) ან არასწორი ძეწკვის სახით (სტრეპტოკოკი), წარმოქმნან დაჯგუფებები 4. 8 და მეტი უჯრედისაგან (სარცინა). აქტინომიცეტები

წარმოქმნიან მიცელიუმს, ცნობილია ასევე მრავალუჯრედიანი პროკარიოტები - ტრიქომები.

უჯრედის აგებულება

პროკარიოტების უმრავლესობას აქვს რიგიდული უჯრედის კედელი, რომლის ქვეშ განლაგებულია ციტოპლაზმატური მემბრანა. უჯრედის კედელი არის მნიშვნელოვანი სისტემატიკური ნაშანი, რომელზე დაყრდნობითაც პროკარიოტებს ყოფენ შემდეგ ჯგუფებად - გრამდადებითი, გრამუარყოფითი და უჯრედის კედლის გარეშე. უჯრედის თავისებური აგებულებით ხასიათდება არქეები. გრამდადებითი ბაქტერიები განსხვავდება გრამუარყოფითისაგან უჯრედის კედელში მურეინის (პეპტიდოგლიკანის) რაოდენობრივი შემცველობით (დაახლოებით 40-ჯერ მეტი) და გარე მემბრანის არარსებობით. არქეები არ ასინთეზებენ მურეინს მაგრამ ზოგიერთი წარმომადგენელი უჯრედის კედელში შეიცავს ფსევდომურეინს.

ბევრ ბაქტერიას უჯრედის ზედაპირზე გააჩნია გამონაზარდები (ფიმბრიები და პილები), მოძრავ ფორმებში კი – შოლტები. მრავალი პროკარიოტის უჯრედის ზედაპირზე შეიმჩნევა სხვადასხვა სისქის ლორწოვანი კაფსულა, ისინი პოლისაქარიდული, გლიკოპროტეიდული ან პოლიპეპტიდური ბუნებისაა.

პროკარიოტებს ახასიათებს მარტივი შიდაუჯრედული აგებულება, არ გააჩნია ავტონომიური ორგანელები, თუმცა მრავალი მათგანის უჯრედში აღმოჩენილია ჩანართები. მათ შორის აღსანიშნავია სხვადასხვა ტიპის შიდაუჯრედული მემბრანული ბუშტუკები, რომლებიც წარმოიქმნება ციტოპლაზმატური მემბრანის ინვაგინაციის გზით. შიდაციტოპლაზმატური მებრანის კარგად განვითარებული სისტემით ხასიათდება ფოტოტროფული პროკარიოტები (ქრომატოფორები, ტილაკოიდები), ნიტრიფიკაციისა და მეთანობაქტერიები. ზოგიერთი უჯრედი წარმოქმნის გაზის ვაკუოლებს (აეროსომები), გარშემორტყმულს ცილოვანი მემბრანით, მათი ფუნქცია წყლის მიკროორგანიზმებში მცურავი სიმკვრივის რეგულირებაა. მრავალი ბაქტერია უჯრედშიდა სამარაგო ნივთიერებების დაგროვებით ხასიათდება (პოლისაქარიდები, პოლიფოსფატები და სხვა). სპორაწარმომქმნელი ბაქტერიების ცალკეული სახეობებისათვის დამახასიათებელია ცილოვანი ბუნების პარასპორალური სხეულაკების არსებობა.

უჯრედის მოძრაობა

პროკარიოტებში განასხვავებენ მოძრავ და უძრავ ფორმებს. მოძრაობა ძირითადად ხორციელდება შოლტების საშუალებით[სურათი№----]. ასევე მოძრაობის ერთ-ერთი სახეა სრიალი. მოძრავ ფორმებს ახასიათებთ ტაქსისის რეაქციები: აერო-ფოტო- ქემო- და მაგნიტოტაქსისი.

გამრავლება და განვითარება

ბაქტერიების უმრავლესობა მრავლდება ბინარული დაყოფით, იშვიათად დაკვირტვით, ზოგიერთი კი – ეგზოსპორების ან მიცელიუმის ფრაგმენტებით

(აქტინომიცეტები). ცნობილია ასევე მრავალჯერადი დყოფით გამრავლება (ციანობაქტერიებში). მრავალუჯრედიანი პროკარიოტები მრავლდება ტრიქომისაგან ერთი ან რამოდენიმე უჯრედის გამოყოფით. ზოგიერთ ბაქტერიაში აღმოჩენილია კონიუგაცია, თუმცა ის არ უზრუნველყოფს გენეტიკური მასალის სრულ გადაცემას.

ზოგიერთი პროკარიოტისათვის დამახასიათებელია რთული ციკლური განვითარება, რომლის პროცესშიც იცვლება უჯრედის მორფოლოგია და წარმოიქმნება მოსვენებითი ფორმები: ცისტები, ენდოსპორები, აკინეტები [სურათი №-]. ცნობილია ბაქტერიები, რომლებიც წარმოქმნიან ნაყოფსხეულებს.

ბაქტერიების განმასხვავებელი თავისებურებაა სწრაფი გამრავლების უნარი. "ჩემპიონები ' ამ ასპექტში ფოტობაქტერიებია, რომელთა გენერაციის დრო მოიცავს 8წთ. ***E. Coli***-20წთ. გამოიანგარიშეს რომ ერთი უჯრედის შთამომავლობამ შეუზღუდავი ზრდის პირობებში 48 სთ შეიძლება მოგვცეს ბიომასა, რომელიც 4000-ჯერ აღემატება დედამიწის მასას.

ეუკარიოტები

პროკარიოტებისაგან განსხვავებით ეუკარიოტები წარმოდგენილია, როგორც მიკრო ისე მაკროორგანიზმებით. ეუკარიოტებს მიეკუთვნება სოკოები, რიგი წყალმცენარეებისა და უმარტივესებისა.

სოკოები

სოკოოები - ჰეტეროტროფული ორგანიზმების ჯგუფი, რომელთა უმრავლესობა საპროფიტია, არის ასევე პარაზიტული ფომები. ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი მახასიათებელი მიცელიუმის არსებობაა. მიცელიალური სოკოები მირკობიოლოგიის შესწავლის საგანს წარმოადგენს- ***Zygomycetes, Ascomycetes, Deuteromycetes***. ზიგომეცეტებს გააჩნია არასეპტირებული მრავალბირთვიანი მიცელიუმი (ცენოციტური). მათ ახასიათებთ გამრავლების სპეციფიური ტიპი, რომელიც გულისხმობს ზიგოსპორის წარმოქმნას ორი მშობლიური ჰიფისაგან. ზიგომიცეტებს ეკუთვნის მუკორის ტიპის სოკოები- ***Rhizopus, Phycomyces, Absidia*** და სხვა.

ასკომიცეტების (ჩანთიანი სოკოები) მიცელიუმი სეპტირებულია ტიხრებით, მათ ახასიათებთ სპორამატარებელი ორგანო-ასკი, რომელშიც ფორმირდება ასკოსპორები. ასკოსპორების უმრავლესობას ახასიათებს უსქესო გამრავლება კონიდიების საშუალებით [სურათი №---]. ასკომიცეტებს ეკუთვნის საფუვრები, რომლებიც არსებობენ ერთეული უჯრედების სახით და მრავლდებიან დაკვირტვით ან იშვიათად დაყოფით. ასკომიცეტური საფუვრები შეიძლება გამრავლდნენ ასევე სქესობრივი გზით, 2-8 სპორის შემცველი ასკების წარმოქმნით [სურათი№---]. განვითარების გარკვეულ ეტაპზე ზოგიერთი საფუარი წარმოქმნის მიცელიუმს ან ფსევდომიცელიუმს, რომელთა ბოლოებზე სპორების აღმოჩენა არის შესაძლებელი[სურათი№---]. საფუვრების ცალკეული წარმომადგენლები (***Lipomyces, Cryptococcus***) მოსვენებითი სტადიის ეტაპზე წარმოქმნის ქლამიდოსპორებს [სურათი №---].

დეიტერომიცეტები (უსრული სოკოები) – მიკროორგანიზმების მრავალფეროვანი ჯგუფი, რომელსაც არ აქვს სქესობრივი სტადია[სურათი №---]. მრავალ უსრულ სოკოს ახასიათებს პარასექსუალური სტადია, როცა შერწყმა და ბირთვის შემდგომი დაყოფა ხორციელდება უშუალოდ მიცელიუმში. დეიტერომიცეტებს ეკუთვნის ***Penicillum, Aspergillus*** წარმომადგენლები [სურათი №---], ასევე საფუვრები ***Candida, Rhodotorula, kloeckera*** და სხვა.

წყალმცენარეები

წყალმცენარეები აერთიანებს ფოტოტროფულ ორგანიზმებს, რომელთა შორის არის მაკრო და მიკროფორმები. მათ გააჩნიათ ორი ფოტოსისტემა და ახორციელებენ ოქსიგენურ ფოტოსინთეზს. პიგმენტების შემადგენლობა განაპირობებს მათ ფერს-მწვანე, წითელი, ოქროსფერი და სხვა. ყველა წყალმცენარე წარმოქმნის კაროტინოიდებს, ქლოროფილ a, ასევე ზოგიერთი მათგანი ქლოროფილ b, c და ფიკობილინებს. წყალმცენარეების უჯრედებში გროვდება სხვადასხვა სამარაგო ნივთიერებები-სახამებელი, ლამინარინი, პარამილონი.

წყალმცენარეების კლასიფიკაცია ეყრდნობა მათ მორფოლოგიას, მოძრაობის თავისებურებებს, პიგმენტებს, სამარაგო ნივთიერებებს, უჯრედის კედლის შემადგენლობას. მათგან მიკრობიოლოგიის ობიექტებია:

მწვანე წყალმცენარეები-მლაშე და მტკნარი წყლის, ნიადაგის ხეების ბინადარი ფორმები-წარმოდგენილია ერთუჯრედიანი და მრავალუჯრედიანი ფორმებით, რომლებიც მრავლდება სქესობრივი და უსქესო გზით.

დიატომური წყალმცენარეები –ფოტიპლანქტონის ძირითადი მასა. ერთუჯრედიანი მიკროორგანიზმებია, რომელთა უმრავლესობა მოთავსებულია სხვადასხვა ზომისა და ფორმის ბაკანში. ის ორი ნაწილისაგან შედგება და ძალიან წააგავს პეტრის ჯამს, ბაკანის ორი ნახევარი იხსნება უსქესო გამრავლების პროცესში, სცილდება ერთმანეთს და თავისთვის აღიდგენს მეორე ნახევრის დანაკლისს. დიატომური წყალმცენარეები სქესობრივი გზითაც მრავლდება. ამ ჯგუფის მრავალი წარმომადგენელი ხასიათდება ბილატერალური სიმეტრიით და ახორციელებს სრიალით მოძრაობას სპეციალური ნაპრალებიდან გამოსული ლორწოს ხარჯზე.

დინოფლაგელატები-ერთუჯრედიანი მიკროორგანიზმები გვერდებზე განლაგებული ორი შოლტით. ისინი შეადგენენ ფიტოპლანქტონის მნიშვნელოვან ნაწილს, ზოგიერთი მათგანი გამოყოფს ტოქსინს - ლეტალურს ადამიანისათვის, ამიტომ მათი ყვავილობის პერიოდში (წყალსატევების “წითელი ყვავილობა”) იკრძალება თევზჭერა, რადგან ტოქსინი გროვდება წყლის ცხოველების ორგანიზმში.

ევგლენასებრი წყალმცენარეები - მტკნარი წყლების წყალმცენარეების მცირე ჯგუფი, რომელსაც არ გააჩნია უჯრედის კედელი და ძალიან გავს უმარტივესებს. სინათლეზე ზრდის გარდა ისინი იზრდებიან სიბნელეში, იღებენ რა ენერგიას ორგანული ნივთიერებების დაჟანგვის ხარჯზე. ზოგი მათგანი

მოძრაობს შოლტებით. ზოგი-ამებოიდური მოძრაობებით. ზოგიერთი სახეობის საინტერესო თავისებურებაა სინათლის აღმქმელი ორგანოს სტიგმის არსებობა, რომელიც ახდენს უჯრედის ორიენტირებას სინათლის წყაროზე.

უმარტივესები

უმარტივესები არის ბუნებაში ფართოდ გავრცელებული ერთუჯრედიანი ჰეტეროტროფული ორგანიზმების ჯგუფი, მათ არ გააჩნიათ უჯრედის კედელი და შთანთქავენ საკვებ ნივთიერებებს უჯრედული მემბრანის გავლით აბსორბციის ან ენდოციტოზის გზით. მრავლდებიან უსქესო ან სქესობრივი გზით და ზოგჯერ გამრავლების ეს ორი გზა წარმოადგენს ერთიან სასიცოცხლო ციკლს.

ამება – ***Rhizopoda*** წყლის ორგანიზმია, მოძრაობს ფსევდოპოდიების ხარჯზე, რომელიც უზრუნველყოფს ასევე საკვების მოპოვებას და შემდგომ ფაგოციტოზს. ამების სასიცოცხლო ციკლის ერთ-ერთი მახასიათებელია ინცისტირება-მოსვენებითი ფორმის წარმოქმნა აქტიურად მკვებავი უჯრედების-ტროფოზიტებისაგან. ამებები თავისუფლად მცხოვრები ორგანიზმებია, მცირე გამონაკლისს შეადგენს პარაზიტი ფორმები, რომლებიც იწვევს ადამიანის სხვადასხვა დაავადებებს. მაგ. კარიესი, დიზენტერია.

შოლტოსნები- ***Mastigophora*** – ორგანიზმები რომლებიც აერთიანებს პარაზიტულ და თავისუფლად მცხოვრებ ფორმებს. ზოგიერთი იწვევს ადამიანის და ცხოველების რთულ დაავადებებს.

წამწამიანები- ***Ciliata*** – თავისუფლად მცხოვრები ფორმები, რომლებიც ასრულებენ მნიშვნელოვან როლს წყლის თვითგაწმენდაში, კერძოდ დაბინძურების გამომწვევი ორგანული სუბსტრატის დაშლაში. ზოგიერთი წარმომადგენელი სიმბიოზში თანაცხოვრობს ხერხემლიანი ცხოველების საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში.

სპოროზოა- ***Sporozoa*** – უმარტივესების კლასი, რომელიც წარმოქმნის სპორებს განვითარების გარკვეულ ეტაპზე. უმარტივესების ამ პარაზიტ ფორმებს აქვს რთული სასიცოცხლო ციკლი, რომელიც აერთიანებს გამრავლების უსქესო და სქესობრივ ეტაპებს, მათ შორის ბევრია ადამიანისა და ცხოველების დაავადებების გამომწვევი ფორმები.

ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების ზეგავლენა მიკროორგანიზმებზე

მიკროორგანიზმების ზრდა-განვითარებაზე მოქმედი ფიზიკური ფაქტორებიდან აღსანიშნავია ტემპერატურა. ოპტიმალური ტემპერატურა მეზოფილური მიკროორგანიზმებისათვის შეადგენს 25-40^{0}C, ფსიხროფილებისათვის 5-15^{0}C, ცნობილია ექსტრემალური თერმოფილები, რომლებიც იზრდება 70-110^{0}C. ცალკეული მიკროორგანიზმების სპორები უძლებს 160-180^0 C-მდე გაცხელებას და გაყინვას -196^0 C-მდე.

ზოგიერთი მიკროორგანიზმი კარგად იტანს ჰიდროსტატიკურ წნევას 1000 ატმ-მდე. ასევე გამოყოფილია ობლიგატური ბაროფილები, რომლებსაც არ შესწევთ უნარი განვითარდნენ 500 ატმ დაბალი წნევის პირობებში.

მიკროორგანიზმთა ცალკეული წარმომადგენლები გამძლეა მაიონიზირებელი რადიაციის მიმართ. მნიშვნელოვანი ფაქტორი რომელზეც დამოკიდებულია მიკროორგანიზმთა ზრდა არის ოსმოსური წნევა. მაშინ როცა მიკროორგანიზმთა უმრავლესობა არ იზრდება NaCl 0.5მ მაღალი კონცენტრაციის პირობებში, ექსტრემალი ჰალოფილები საჭიროებენ NaCl-ის 2.5მ კონცენტრაციას.

მიკროორგანიზმები მგრძნობიარეა გარემოს მჟავიანობის მიმართ. ექსტრემალური აციდოფილები იზრდება PH - 0.5-1.0 პირობებში, ხოლო ალკალოფილები PH 10.0-11.0, PH7.0 ოპტიმალურია ნეიტროფილებისათვის.

მოლეკულური ჟანგბადის მიმართ დამოკიდებულების მიხედვით მიკროორგანიზმები იყოფა ობლიგატურ აერობებად და ანაერობებად, ფაკულტატურ აერობებად და ანაერობებად, აეროტოლერანტულ ფორმებად. მიკროორგანიზმების უმრავლესობა აერობია, მაგრამ ზოგიერთ მათგანს თრგუნავს ჰაერში არსებული მოლეკულური ჟანგბადის კონცენტრაცია და მათ მიკროაეროფილები ეწოდება. ფაკულტატური ფორმები არსებობს როგორც მოლეკულური ჟანგბადის არსებობის ასევე არარსებობის პირობებში, ჩაანაცვლებენ რა თავისი მეტაბოლიზმის ერთ ფორმას – სუნთქვას, სხვა ფორმით - დუღილით. აეროტოლერანტული ანაერობების ზრდა არ ითრგუნება მოლეკულური ჟანგბადის მცირე კონცენტრაციების პირობებში, თუმცა ისინი ჟანგბადს არ მოიხმარენ (რძემჟავა ბაქტერიები). მკაცრი ანაერობები ვერ იტანენ მოლეკულური ჟანგბადის უმნიშვნელო კვალსაც კი, ის მათთვის შხამს წარმოადგენს (მეთანოგენები, აცეტოგენები, ზოგიერთი სოკო, უმარტივესების ცალკეული სახეობები).

ნივთიერებათა ცვლა

მიკროორგანიზმების მიერ განხორციელებადი ენერგეტიკული და კონსტრუქციული პროცესები ძალიან მრავალფეროვანია [ცხრილი№---].

კონსტრუქციულ პროცესებში გამოყენებული ნახხშირბადის ნაერთების მიმართ დამოკიდებულების მიხედვით მიკროორგანიზმები იყოფა ავტოტროფებად – რომლებიც უჯრედის ნახშირბადშემცველი კომპონენტების სინთეზისათვის იყენებენ CO_2 და ჰეტეროტროფებად, რომლებიც ამ მიზნებისათვის საჭიროებს მზა ორგანულ ნაერთებს. ჰეტეროტროფებს შორის მიკროორგანიზმთა უმრავლესობა საპროფიტია (საპროტროფი), რომლებიც იყენებს სხვა ცოცხალი ორგანიზმების ცხოველმყოფელობის ან დაშლის ხარჯზე წარმოქმნილ ორგანულ ნაერთებს. ჰეტეროტროფული ორგანიზმები აერთიანებს სახეობებს, რომლებიც იზრდება გარემოში მარტივი ორგანული ნაერთების არსებობის პირობებში, და ობლიგატურ პარაზიტებს, (პარატროფები), რომლებიც მთლიანად არის დამოკიდებული მასპინძლის

მეტაბოლიზმზე, იყენებს რა მის მიერ სინთეზირებულ სხვადასხვა ორგანულ ნაერთს.

მიკროორგანიზმების შესაძლებლობების ფართო სპექტრი ვლინდება აზოტის უტილიზაციისას. პრო- და ეუკარიოტების უმრავლესობა იყენებს აზოტის აღდგენილ ფორმებს (ძირითადად ამონიუმის მარილებს), ზოგიერთი საჭიროებს მზა ამინომჟავებს, სხვები კი ითვისებს მის დაჟანგულ ფორმებს (ნიტრატებს). თავისუფლადმცხოვრები და სიმბიოზური პროკარიოტების ძალიან დიდი ნაწილი ხასიათდება მოლეკულური აზოტის ფიქსაციის უნარით. ეს თავისებურება ახასიათებს მხოლოდ პროკარიოტებს, როგორც აერობებს ასევე ანაერობებს.

ნმ და უჯრედის სხვა შენაერთების შემადგენლობაში შემავალი ფოსფორი, მიკროორგანიზმების მიერ აითვისება ძირითადად ფოსფატებიდან. გოგირდის წყაროდ, რომელიც აუცილებელია ამინომჟავებისა და სხვა კოფაქტორების სინთეზისათვის გვევლინება სულფატები. მიკროორგანიზმთა მცირე ჯგუფი, რომელიც არ ახორციელებს ასიმილაციურ სულფატრედუქცუას საჭიროებს გოგირდის აღდგენილ ნაერთებს.

მიკროორგანიზმების მიერ განხორციელებადი ენერგეტიკული პროცესებია: ფოტოსინთეზი, დუღილი, აერობული და ანაერობული სუნთქვა. ყველა მათგანს მივყავართ ენერგიის მარაგის შექმნამდე, ძირითადად ატფ სახით, რომელიც შემდგომ იხარჯება სხვადასხვა სასიცოცხლო პროცესებზე.

ატფ სინთეზი მიკროორგანიზმებში სხვადასხვა გზით ხორციელდება. მემბრანული ფოსფორილირებისას (ჟანგვითი და მაფოტოსინთეზირებელი ფოსფორილირება) ენერგიის ტრანსფორმირება ხდება H ან Na^+ იონების ტრანსმემბრანული ელექტროქიმიური პოტენციალის სახით, სუბსტრატულ ფოსფორილირებას კი მივყავართ ენერგიის შენახვამდე ატფ და სხვა შენაერთების მაკროერგულ ბმებში.

მიკროორგანიზმების ენერგეტიკული და კონსტრუქციული ცვლის ტიპები

ენერგიის წყარო	ელექტრონების დონორები	ნახშირბადის წყარო	
		ორგანული	ნახშირორჟანგი
სინათლე	ორგანული	ოტოორგანოჰეტეროტ-როფია	ფოტოორგანოავტოტროფია
სინათლე	არაორგანული	ფოტოლითოჰეტეროტ-როფია	ფოტოლითოავტოტროფია
ორგანული	ორგანული	ემოორგანოჰეტეროტ-როფია	ქემოორგანოავტოტროფია
რაორგანუ-ლი	არაორგანული	ქემოლითოჰეტეროტ-როფია	ქემოლითოავტოტროფია

მიკროორგანიზმები ბუნებასა და ბიოტექნოლოგიაში

მიკროორგანიზმთა საზოგადოებები წარმოადგენს ეკოლოგიური სისტემების მთლიანობის განმსაზღვრელ მნიშვნელოვან ფაქტორს. განსაკუთრებულ გარემო პირობებში მიკროორგანიზმები შეიძლება იყოს სიცოცხლის ერთადერთი ფორმა. ევოლუციის პროცესში მიკროორგანიზმებს შორის ჩამოყალიბდა ურთიერთობების სხვადასხვა სახე. მათ შორის სიმბიოზის განმსაზღვრელი მრავალი ფაქტორი ეყრდნობა პარტნიორებს შორის განსხვავებულ ურთიერთობებს: მუტუალიზმი-ურთიერთსარგებელი, პარაზიტიზმი-ერთ-ერთი პარტნიორის არასასურველი ზემოქმედება მეორეზე, ნეიტრალიზმი-ინდიფერენტული ურთიერთობა პარტნიორებს შორის.

მიკრობული სამყაროს შესწავლა ხელს უწყობს სრული წარმოდგენა შევიქმნათ გარემოში მიმდინარე ნივთიერებათა წრებრუნვაზე. მეთანის შთანთქმით და წარმოქმნით, CO და CO_2 შთანთქმით, სხვადასხვა ორგანული ნაერთების ტრანსფორმაციით, მათ შორის ექსტრემალურ პირობებში, მიკროორგანიზმები აქტიურად მონაწილეობს ნახშირბადის გარდაქმნის ციკლში. მოლეკულური აზოტის ფიქსირებით, ამიაკისა და ნიტრიტების დაჟანგვით, დენიტრიფიკაციის განხორციელებით მიკროორგანიზმები უზრუნველყოფს აზოტის წრებრუნვას ბუნებაში, ხოლო მათი უნარი დაჟანგონ აღდგენილი გოგირდშემცველი ნაერთები და აღადგინონ დაჟანგული, განსაზღვრავს მათ როლს გოგირდის წრებრუნვაში.

მიკროორგანიზმების როლი ყოველთვის დადებითი როდია. მრავალი მათგანი ადამიანის, ცხოველების და მცენარეების პათოგენია. ზოგი მათგანი იწვევს სასოფლო-სამეურნეო პროდუქტების ფუჭებადობას, შენობების მიწისქვეშა ნაწილების, საბადოების მეტალო კონსტრუქციების დაშლას. ასეთი მიკროორგანიზმების შესწავლა აუცილებელია შესაბამისი პრევენციული ღონისძიებების შესამუშავებლად.

მიკროორგანიზმების ფართო სპექტრი გამოიყენება კვების პროდუქტების პური, ლუდი, ღვინო, რძის პროდუქტები, საკონდიტრო ნაწარმი წარმოებაში. მიკროორგანიზმები გამოიყენება ბუთანოლის, აცეტონის, ძმრის, ლიმონმჟავას, ფერმენტების, ანტობიოტიკების წარმოებაში, მონაწილეობს სტეროიდული ჰორმონებისა და სხვა ნაერთების ტრანსფორმაციაში. მათ გამოიყენებენ ამინომჟავებისა და ცილების წარმოებაში. მიკრობული კომპლექსები აქტიურად გამოიყენება სასოფლო-სამეურნეო ნარჩენების ბიოაირად (მეთანისა და ნახშირორჟანგის ნარევი) გარდაქმნაში, რაც თავის მხრივ იძლევა ახალი ენერგორესურსების შემუშავების საშუალებას. ბოლო წლებში პროკარიოტები აქტიურად გამოიყენება გენურ ინჟინერიაში გენების კლონირებისა და ვექტორების შექმნისათვის.

მიკროორგანიზმთა პოტენციალი ამოუწურავია, მათი შესწავლა იძლევა ბიოტექნოლოგიის ახალი მიმართულებების შემუშავების საშუალებას.

თავი 1. მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიის მოწყობა

მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიის მოწყობა; მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიის მუშაობისა და უსაფრთხოების წესები; მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიის მომზადება სამუშაოდ; ასეპტიკა, ანტისეპტიკა, დეზინფექცია; ბოქსის მომზადება სამუშაოდ;ლაბორატორიული ჭურჭელი - დამუშავება და რეცხვა.

მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიები დანიშნულების მიხედვით იყოფა შემდეგ კატეგორიებად:

1. კლინიკურ-დიაგნოსტიკური (მედიცინა-ვეტერინარია);
2. სანიტარულ-ეპიდემიოლოგიური;
3. ჰიგიენური;
4. სხვადასხვა დაწესებულებებს დაქვემდებარებული (კვების პროდუქტების, ფარმაცევტული ქარხნების და სხვა ტიპის დაწესებულებებთან არსებული);
5. ბაქტერიოლოგიური პრეპარატების კონტროლის ლაბორატორიები;
6. სასწავლო მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიები.

კლინიკო-დიაგნოსტიკური ლაბორატორიის ფუნქციებში შედის სხვადასხვა ინფექციური დაავადებების დიაგნოსტიკა და პრევენციული ღონისძიებების შემუშავება.

სანიტარულ-ეპიდემიოლოგიური და ჰიგიენური ლაბორატორიები ახორციელებენ კონტროლს სხვადასხვა დაწესებულებებში სანიტარულ-ჰიგიენური ნორმების დაცვისა - წყალში, ჰაერში, ნიადაგში, საკვებ პროდუქტებში და ა. შ.

სხვადასხვა დაწესებულებების დაქვემდებარებაში მყოფი ლაბორატორიების ფუნქციაა ამ დაწესებულებების მიერ გამოშვებული პროდუქციის მიკრობიოლოგიური კონტროლი.

ბაქტერიოლოგიური პრეპარატების ლაბორატორია ახორციელებს ვაქცინების, შრატების და მიკროორგანიზმების საფუძველზე დამზადებული ხვა ტიპის პრეპარატების კონტროლს.

სასწავლო ლაბორატორიები განკუთვნილია უნივერსიტეტის ბაკალავრებისა და მაგისტრებისათვის.

მათი დანიშნულების მრავალფეროვნების მიუხედავად მიკრობიოლოგიურ ლაბორატორიებში მიკროორგანიზმებთან მუშაობის ძირითადი მეთოდები საერთოა, ესენია:

- მიკროსკოპული-მიკროორგანიზმთა სხვადასხვა ტიპის-ცოცხალი, ფიქსირებული, შეღებილი და ა. შ. პრეპარატების დათვალიერებით მათი მორფოლოგიის, მოძრაბის თავისებურებების შესწავლა.
- მიკრობიოლოგიური- რომელიც ითვალისწინებს მიკროორგანიზმების განთესვას სხვადასხვა საკვებ არეებზე, მათ იზოლირებას და სუფთა კულტურების ზრდის თავისებურებების შესწავლას მყარ და თხევად საკვებ არეებზე.
- ბიოქიმიური-იძლევა საშუალებას მიკროორგანიზმის ფერმენტული აქტივობის და ქიმიური შემადგენლობის მიხედვით მისი სისტემატიკისა და მისი როლის განსაზღვრისა ბუნებაში მიმდინარე ნივთიერებათა წრებრუნვაში.
- სეროლოგიური-მიკროორგანიზთა ანტიგენური სტრუქტურის შესწავლის საფუძველზე მათი იდენტიფიცირება.
- ბიოლოგიური-ამ მეთოდით ხდება პათოგენური მიკროფლორის გამოცალკევება არაპათოგენური ფორმებისაგან.

მიკრობიოლოგიური მეთოდების ეს ერთიანობა იძლევა საშუალებას განისაზღვროს მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიის აღჭურვისა და მასში მუშაობის მიმართ წამოყენებული მოთხოვნების საერთო ასპექტები.

მიკრობიოლოგიური ლაბორატორია უნდა იყოს აღჭურვილი შემდეგი დანიშნულების მქონე ოთახებითა და სათავსოებით:

1. მიკრობიოლოგიური კვლევებისათვის აუცილებელი ოთახი;
2. სასტერელიზაციო (საავტოკლავო) ოთახი;
3. სამრეცხაო:
4. საპრეპარატო-აღჭურვილი სათანადო მოწყობილობებით სხვადასხვა საღებავების, საკვები არეებისა და სამუშაო ხსნარების დასამზადებლად.
5. თერმოსტატების ოთახი;
6. მაცივრის ოთახი;
7. ოთახი სამუზეუმო კულტურებისათვის;
8. ბოქსი;
9. ვივარიუმი-ლაბორატორიული ცხოველებისათვის;
10. სათავსო სხვადასხვა რეაქტივებისათვის.

სამუშაო ლაბორატორიული ოთახი უნდა იყოს ღია, ნათელი. ლაბორატორიული მაგიდების ზედაპირი და იატაკი უნდა იყოს დაფარული რეცხვის უნარის მქონე საღებავით, კედელი იატაკიდან 170 სმ იღებება ღია ტონის საღებავით. ოთახი უნდა იყოს აღჭურვილი ლაბორატორიული მაგიდებით, კარადებით, თაროებით სხვადასხვა ტიპის აპარატურის მოსათავსებლად. მაგიდებთან უნდა იყოს მიერთებული ელექტროენერგიის წყარო და ბუნებრივი ან თხევადი აირის წყარო.

გარდა ძირითადი სამუშაო ოთახისა ლაბორატორიას უნდა ქონდეს სასტერილიზაციო ოთახი, რომელშიც განლაგდება ავტოკლავები და საშრობი კარადები, ასევე ბოქსი, სამრეცხაო, თერმოსტატების და მაცივრის ოთახები, ასევე სპეციალური სათავსო სუფთა სამუზეუმო კულტურების შესანახად.

ბოქსი წარმადგენს მცირე ზომის ორ ნაწილად გადატიხრულ ოთახს, რომელიც გამოიყენება უშუალოდ მიკროორგანიზმების სუფთა კულტურებთან სამუშაოდ, წინაბოქსში შედიან სუფთა ხალათის ჩასაცმელად, რომელიც გამოიყენება მხოლოდ ბოქსში მუშაობისას, თუ პათოგენურ მიკროორგანიზმებთან უწევთ მუშაობა, აუცილებელია ხელთათმანების, ნიღბის და ბახილების ჩაცმა, ჩემდეგ შედიან შიდა ბოქსში, რომელიც აღჭურვილია მაგიდით, სკამით, ბიოციდური ნათურით და ბუნებრივი ან თხევადი აირის წყაროთი. სასურველია ბოქსში ასევე იყოს დამატებითი დამხმარე მაგიდა, რომელზეც განლაგდება მუშაობისას საჭირო ხელსაწყო-მასალები.

თანამედროვე პერიოდში ძალიან დიდი პოპულარობით სარგებლობს ე. წ. მაგიდის ბოქსები-ლამინარები, ისინი ხასიათდება განსხვავებული კონსტრუქციით– შეიძლება იყოს ღია წინა ხედის მქონე კამერები, ან სრულად დახურული ჰერმეტიზებული კამერა, მუშაობა მიმდინარეობს უარყოფითი საჰაერო წნევის ქვეშ, კამერის წინა ხედზე მიმაგრებული რეზინის ხელთათმანების დახმარებით. ლამინარებში ჰაერის სტერილიზაცია მიიღწევა კამერის შიგნით სტერილური ჰაერის ნაკადის ცირკულირებით.

სასწავლო ლაბორატორიების აუცილებელი მოთხოვნაა თითოეული სტუდენტისათვის 110×70სმ ინდივიდუალური სამუშაო ადგილის გამოყოფა, ამ სამუშაო ადგილზე განთავსდება მიკროსკოპი, ნათურა, საღებავები და რეაქტივები მიკროორგანიზმთა პრეპარატების დასამზადებლად, ბაქტერიოლოგიური მარყუჟი, ნემსი

და ნიჩაბი, გრადუირებული პიპეტები და ჭიქები, სასაგნე და საფარი მინები, პინცეტი, შეღებილი პრეპარატისათვის ონკანი ან მინის "აბაზანა" პრეპარატის გამდინარე წყლით ჩამოსარეცხად. ბამბა, იმერსიურლი ზეთი, მინაზე საწერი ქიმიური ფანქარი, ფილტრის ქაღალდი, ასანთი, ჭურჭელი მადეზინფიცირებელი სითხეებით - 1% ქლორამინის სნარი ან 3% ფენოლი, ან ზედაპირულად აქტიური ნივთიერებებით – ნატრიუმის დოდეცილსულფატი, ნატრიუმის ლაურილსულფონატი. მიკრობიოლოგის მაგიდა უნდა იყოს ყოველთვის სუფთა და მოწესრიგებული, ყველა სამუშაო ინვენტარი მწყობრში და დალაგებული მხედველობის ზონაში აკურატულად.

მიკრობიოლოგიურ ლაბორატორიაში მუშაობისა და უსაფრთხოების წესები:

მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიის თანამშრომლებსა და სრუდენტებს მუდმივად უნდა ახსოვდეს, რომ მიკროორგანიზმებთან მუშაობა მოითხოვს უსაფრთხოების მკაცრი ზომების დაცვას. კერძოდ:

1. მიკრობიოლოგიურ ლაბორატორიაში შედიან მხოლოდ თეთრი ხალათითა და თავსაბურავით;
2. არ შეაქვთ უცხო ნივთები;
3. მკაცრად იცავენ ქიმიურ რექტივებთან მუშაობის წესებს;
4. ფრთხილად მუშაობენ სპირტიან ეთერებთან და არ გადაგააქვთ გაზის წყაროსთან ახლოს;
5. ვინაიდან ზოგიერთი მიკროორგანიზმი, განსაკუთრებით სოკოს სპორები ალერგენებია, არ უნდა დაუშვათ მათი გავრცელება ოთახში - არ დატოვოთ პეტრის ჯამები და სინჯარები თავღიად;
6. პიპეტის გამოყენებისას დარწმუნდით, რომ პიპეტის ერთი ბლაგვი ბოლო მყარად არის დაცული ბამბით;
7. ლაბორატორიაში დაუშვებელია ჭამა;
8. ყველა გამოყენებული ჭურჭელი თუ მასალა იგზავნება საავტოკლავოში გასაუვნებლად და შემდეგ გასარეცხად;
9. თუ მაგიდა ან ტასნაცმელი დაისვარა მიკროორგანიზმით აუცილებელია მისი დაუყოვნებულე გასუფთავება შესაბამისი საშუალებებით;
10. ლაბორატორიაში უნდა იყოს წესრიგი და სისუფთავე, მეცადინეობის დასრულებოს შემდეგ მიკროსკოპის იმერსიული ობიექტივი უნდა გაიწმინდოს ბამბით, მიკროსკოპი დაიფაროს პოლიეთილენის საბურავით, მოწესრიგდეს სამუშაო ადგილი, ხელი დაიბანოთ საპნით.
11. უნდა გახსოვდეთ, რომ სტუდენტი პასუხისმგებელია ლაბორატორიული მოწყობილობებზე და ჭურჭელზე, რომელსაც იყენებს;
12. წასვლის წინ უნდა შემოწმდეს გაზი, ელექტროენეგია.

მიკრობიოლოგიური ლაბორატორიის მომზადება სამუშაოდ

მიკრობიოლოგიური ლაბორატორია უნდა იყოს სრულ წესრიგში და სისუფთავეში. ლაბორატორიის სრული სტერილობის შენარჩუნება შეუძელებლია და არც არის აუცილებელი, თუმცა მიკროორგანიზმთა რაოდენობის მინიმუმამდე დაყვანა გარემოში ხელმისაწვდომია.

ასეპტიკა, ანტისეპტიკა, დეზინფექცია

ასეპტიკა - ღონისძიებების ერთობლიობა, რომელიც ხელს უწყობს თავიდან ავიცილოთ მიკრობიოლოგიური კვლევებისას გარეშე მიკროფლორის შეღწევა საკვლევ მასალაში. ის ითვალისწინებს ინსტრუმენტებისა და მასალების სტერილიზაციას, სპეციალური სანიტარულ-ჰიგიენური ნორმების დაცვას. ასეპტიკის წესები მკაცრად უნდა იყოს დაცული მიკრობიოლოგიურ ლაბორატორიაში მუშაობისას.

ანტისეპტიკა - სამკურნალო – პროფილაქტიკური ღონისძიებების ერთობლიობა, რომელიც მიმართულია სხვადასხვა ინფექციური დაავადებების გამომწვევი მიკროორგანიზმების გასაუვნებლად. ანტისეპტიკური ხსნარების სახით გამოიყენება 5% იოდის სპირტხსნარი, 0.5-2% ქლორამინი, 0.5-1% ფორმალინი, მეთილენის ლურჯისა და ბრილიანტის მწვანეს 1-2% სპირტხსნარები.

დეზინფექცია - გარემოში პათოგენური მიკროორგანიზმების გაუვნებლება. ამ დროს იღუპება არა მარტო პათოგენური, არამედ საპროფიტული მიკროფლორაც, რითაც დეზინფექცია სტერილიზაციის ეფექტს იძლევა.

ლაბორატორიის იატაკი, კედლები და ავეჯი იწმინდება მტვერსასრუტით და მუშავდება სხვადასხვა სადეზინფექციო ხსნარებით. დადგენილია, რომ მტვერსასრუტის ჯაგრისით ოთხჯერადი გადატარებისას სუფთავდება მიკროორგანიზმთა დაახლოებით 47%, ხოლო თორმეტჯერადით - 97%.

სადეზინფექციო ხსნარებად ხშირად იყენებენ 2-3% ნატრიუმის ბიკარბონატს, 3-5% ფენოლს (კარბოლის მჟავა). 0.5-3% ქლორამინის ან ლიზოლის (ფენოლის პრეპარატი, რომელსაც ემატება მწვანე საპონი) წყალხსნარი.

ლაბორატორიის ჰაერის დეზინფექციის ყველაზე მარტივი გზა ჰაერის განიავებაა, სათავსოს ხანგრძლივი ვენტილაცია 30-60წთ-ის განმავლობაში ჰაერში იწვევს მიკროორგანიზმების რაოდენობის მკვეთრ შემცირებას, განსაკუთრებით თუ ტემპერატურული სხვაობა შენობასა და გარემოს შორის მკვეთრია. უფრო ეფექტური მეთოდი ჰაერის დეზინფექციისა არის ულტრაიისფერი დასხივება, ამისათვის იყენებენ 200-400ნმ ტალღის სიგრძის ულტრაიისფერ სხივებს, რომლებიც ხასიათდება მაღალი ანტიმიკრობული აქტივობით და იწვევს მიკროორგანიზმთა როგორც ვეგეტატიური ფორმების, ასევევ სპორების განადგურებას.

ულტრაიისფერი სხივების ზემოქმედება უნდა იყოს ხანგრძლივი და უშუალო, რადგან ისინი ხასიათდება მცირე განვლადობით, ამასთანავე თეთრი ქაღალდი, ან ალუმინისა და ქრომის ზადაპირიანი ფორფიტები ირეკლავს ულტრაიისფერ გამოსხივებას. სტერილიზაციის ხანგრძლივობა დამოკიდებულია ჰაერის დაბინძურების ხარისხზე და მერყეობს 30წთ-დან რამოდენიმე საათამდე.

ულტრაიისფერი გამოსხივების წყაროდ გამოიყენება ბიოციდური ნათურები, მათთან მუშაობისას აუცილებელია უსაფრთხოების წესების დაცვა, რადგან ულტრაიისფერი გამოსხივება უარყოფითად მოქმედებს თვალებზე. მცირე ზომის ოთახში ჩართულ ბაქტერიოციდულ ნათურასთან ყოფნა არ არის რეკომენდირებული, ასევე გასათვალისწინებელია, რომ ბაქტერიოციდული ნათურის ხანგრძლივი მუშაობისას გამოსხივების ინტენსივობა იკლებს, ამიტომაც აუცილებელია ის შესვენებებით ვამუშაოთ.

ბოქსის მომზადება სამუშაოდ.

ბოქსის სამუშაოდ მომზადება ხდება შემდეგი წესების დაცვით:

ყოველდღიურად სამუშაოს დაწყების წინ იატაკი იწმინდება სადეზინფექციო ხსნარით (2% ქლორამინი ან 3% ფენოლი), ჰაერი სტერილდება ბიოციდური ნათურებით, რომელიც მონტაჟდება იატაკიდან 2-2.5მ სიმაღლეზე, 1$მ^3$ფართობზე 1.5-2.5ვტ სიმძლავრის. სამუშაოს დაწყებამდე 30-60წთ-ით ადრე ნათურა უნდა გაითიშოს. ბიოციდური ნათურების არქონის შემთხვევაში ბოქსი იწმინდება 5% ქლორამინით.

ბოქსის დაბინძურების თავიდან ასაცილებლად საკვლევი მასალა ბოქსში შეტანამდე უნდა გასუფთავდეს 3% ქლორამინით. ამავე მიზნებისათვის ბოქსში მუშაობა უნდა წარმოებდეს სტერილური ხალათით, ხელთათმანებით, ნიღბით და ბახილებით.

ბოქსში ჰაერი უნდა გადამოწმდეს ბაქტერიოლოგიურ სისუფთავეზე კვირაში ორჯერ. ამისათვის ხპა და საბუროს არის შემცველი სტერილური, თავღია პეტრის ჯამებს ტოვებენ ბოქსში 15წთ, შემდეგ ახურავენ თავზე და დგამენ თერმოსტატში 48სთ-ით 37°C და 96°C შესაბამისად. კოლონიების რაოდენობა ინკუბაციის შემდეგ არ უნდა აღემატებოდეს 5 ერთეულს, წინააღმდეგ შემთხვევაში ბოქსი ითვლება დაბინძურებულად. ამ დროს ის ექვემდებარება დამატებით დამუშავებას. კვირაში ერთხელ ბოქსი ირეცხება საპნით და სადეზინფექციო ხსნარებით.

სამუშაო ადგილი, სადაც უშუალოდ მიმდინარეობს მიკროორგანიზმებზე მუშაობა საჭიროებს განსაკუთრებულ დამუშავება-დასუფთავებას. სამუშაო მაგიდის დეზინფექცია აუცილებელია როგორც მუშაობის დაწყებამდე, ასევე დასრულების შემდეგ. მაგიდის ზედაპირის გასაწმენდად იყენებენ ლიზოლისა და ქლორამინის ხსნარებს, ასევე 70% ეთანოლს ან იზოპროპანოლს. ეს სპირტები შეიძლება გამოყენებულ იქნეს ასევე ხელების დეზინფექციისათვის. თუ მაგიდის ზედაპირი წყალგაუმტარია მაშინ ლიზოლი ყველაზე ოპტიმალური სადეზინფექციო ხსნარია. მაგიდის ზედაპირის დეზინფექცია შესაძლებელია ასევე ულტრაიისფერი დასხივებით. ამ დროს გასათვალისწინებელია, რომ დასხივების ეფექტურობა დამოკიდებულია დასასხივებელი ობიექტის ბაქტერიოციდულ ნათურასთან სიახლოვეზე.

ლაბორატორიული ჭურჭელი - დამუშავება და რეცხვა

ბაქტერიოლოგიური ჭურჭელი უნდა იყოს სუფთა, ხოლო კვლევების უმრავლებისათვის სტერილური. ჭურჭლის გასარეცხად ლაბორატორიაში გამოყოფილია სამრეცხაო - უზრუნველყოფილი ცხელი და ცივი წყლით, გაზისა და ელექტროქურით, დიდი ჯამებით და სხვა საჭირო ინვენტარით (ჯაგრისები , ტილოები და სხვა). ჭურჭელი ირეცხება თხევადი საპნით ან თხევადი სარეცხი საშუალებებით. ძლიერ დაბინძურებული ჭურჭლის დასარეცხად გამოიყენება ქრომის ხსნარი. ნებისმიერი გამოყენებული პეტრის ჯამი ან სინჯარა, რომელშიც დათესილი იყო მიკროორგანიზმი აუცილებლად გარეცხვის წინ გადის გაუვნებლებას ავტოკლავირებით 1.5-2ატმ 2სთ და მხოლოდ ამის შემდეგ იგზავნება სამრეცხაოში გასარეცხად.

გამოყენებული ჭურჭლის გარდა ახალი გამოუყენებელი ჭურჭელიც საჭიროებს სპეციალურ დამუშავებას. ამისათვის მათ ხარშავენ სარეცხი საპნის წყალხსნარში 15წთ, შემდეგ ავლებენ გამდინარ წყალს და ათავსებენ ქლორწყალბად მჟავას 1-2% ხსნარში, 10-15 წთ ხარშავენ რათა მასცილდეს ტუტეს ნარჩენები, რომელიც შეიძლება შერჩენილი იყოს მინის ტარის დამზადების პროცესში. ასეთ ჭურჭელს დაავლებენ ონკანის წყალს, შემდეგ დისტილირებულ წყალს, აშრობენ საშრობ კარადაში და ინახავენ.

განსაკუთრებული ყურადღება და დამუშავება სჭირდება სასაგნე მინებს, რადგან აუცილებელია მათი გაუცხიმოვნება, ამისათვის გამოუყენებელი სასაგნე მინები თავსდება ნიკოფოროვის ხსნარში 2-3დღით, თუ ცხიმის კვალი მაინც შერჩა, გადაიტანენ ნატრიუმის ბიკარბონატის ხსნარში და ხარშავენ 20-30წთ, შემდეგ ათავსებენ ქლორწყალბადის მჟავაში და ბოლოს ავლებენ გამდინარ წყალს.

გამოყენებულ სასაგნე მინებს უფრო რთული დამუშავება სჭირდება. კერძოდ:

1) 2სთ ისინი თავსდება კონცენტრირებული გოგირდმჟავას ხსნარში, ან ქრომის ხსნარში, შემდეგ ირეცხება გამდინარე წყლით;

2) შემდგომ ეტაპზე მათ ათავსებენ ნატრიუმის ჰიდროკარბონატის ხსნარში და ხარშავენ ნელ ცეცხლზე 20-30წთ.

დარეცხილი ჭურჭელი შრება საშრობ კარადაში და თავსდება შესაბამის დახურულ სათავსოებში.

ნებისმიერი მიკრობიოლოგიური სამუშაოს შესრულების საბოლოო ეტაპი არის ხელების დეზინფექცია 1% ქლორამინის ან ლიზოლის ხსარში დასველებული დოლბანდით.

ლაბორატორიაში იკრძალება კვება და სიგარეტის მოწევა.

ლაბორატორიაში თითოეული სტუდენტი აწარმოებს ე. წ. ლაბორატორიულ ჟურნალს. ეს არის დოკუმენტი, რომელიც საშუალებას იძლევა გადამოწმდეს ჩატარებული სამუშაოების სიზუსტე. მასში ასახული უნდა იყოს ჩატარებული ცდის დეტალები მკაცრად განსაზღვრულად და მოწესრიგებულად.

1. ცდის სახელწოდება, მიზანი, დაწყებისა და დასრულების თარიღი;
2. კვლევის ობიექტები;
3. კვლევის ჩატარების პირობები და წინაპირობები;
4. ცდის დროს გამოყენებული მეთოდების ძირითადი პრინციპები;
5. მიღებული შედეგები.

მიღებული ციფრული შედეგები აისახება ცხრილებში. საჭიროებისამებრ იყენებენ შედეგების ამსახველ გრაფიკულ ან დასურათებულ ვერსიებს. თითოეული ლაბორატორიული სამუშაო სრულდება პირადი დაკვირვებებითა და დასკვნებით.

თავი 2. მიკროსკოპია

სინათლის მიკროსკოპი; მიკროსკოპის მექანიკური ნაწილი; მიკროსკოპის ოპტიკური ნაწილი; პლანოქრომატი.

მიკროორგანიზმთა უჯრედების მორფოლოგიის შესწავლა შესაძლებელია მხოლოდ მიკროსკოპის საშუალებით, რომელიც უზრუნველყოფს ობიექტის გადიდებას. განასხვავებენ მიკროსკოპიის სხვადასხვა ფორმებს გადიდების, სინათლის წყაროს და სხვა მსგავსი პარამეტრების მიხედვით;

1. სინათლის მიკროსკოპია;
2. მიკროსკოპია ბნელ ველში;
3. ფაზ-კონტრასტული მიკროსკოპია;
4. ლუმინესცენტური მიკროსკოპია;
5. ელექტრონული მიკროსკოპია

სინათლის მიკროსკოპია

არსებობს სინათლის მიკროსკოპის სხვადასხვა მოდელი, რომელიც გამოიყენება სასწავლო და კვლევითი სამუშაოებისათვის, თუმცა პრინციპი მათი მუშაობისა მსგავსია. სინათლის მიკროსკოპი საშუალებას იძლევა დავადგინოთ მიკროორგანიზმების ფორმა, ზომა, მოძრაობის მახასიათებლები.

სინათლის მიკროსკოპს გააჩნია მექანიკური და ოპტიკური ნაწილი.

მიკროსკოპის მექანიკური ნაწილი

მექანიკური ნაწილი წარმოდგენილია შტატივით, სასაგნე მაგიდით და ტუბუსით. სასაგნე მაგიდა მოძრაობს ჰორიზონტალურ სიბრტყეში ორი გვერდზე განლაგებული ხრახნის დახმარებით, რაც იძლევა საშუალებას პრეპარატის ნებისმიერი წერტილი დავაყენოთ თვალთახედვის არის ცენტრში. სასაგნე მაგიდის ზედაპირზე არის ორი დამჭერი, საკვლევი პრეპარატის დასამაგრებლად. სასაგნე მაგიდის ქვევით განლაგებულია კონდენსორის კრონშტეინი, რომელიც სპეციალური ხრახნით გადაადგილდება 20მმ რადიუსში. კონდენსორი ხრახნით არის ჩამაგრებული დამჭერზე. შტატივის ზედა ნაწილი-ტუბუსის დამჭერია. მას შეუძლია მოძრაობა მაკრო და მიკროხრახნების საშუალებით, რომელიც განკუთვნილია პრეპარატის უხეში და ზუსტი ფიქსაციისათვის. მიკრომეტრული ხრახნის ერთი ბრუნი უზრუნველყოფს ტუბუსის გადაადგილებას 0.1მმ-ით ზევით ან ქვევით, იმის მიხედვით საათის ისრის მიმართულებით დავატრიალებთ ხრახნს თუ საათის ისრის საწინააღმდეგოდ. ტუბუსის დამჭერის ზედა ნაწილში განლაგებულია რევოლვერი, რომელიც ბრუნავს საკუთარი ღერძის ირგვლივ. მასზე განლაგებული სპეციალურ ფოსოებში ჩამაგრებული ობიექტივები. ტუბუსის შიგნით განლაგებულია პრიზმა, ხოლო ზედა ნაწილში კი ოკულარი.

მიკროსკოპის ოპტიკური ნაწილი

მიკროსკოპის ოპტიკური ნაწილი აერთიანებს: გამანათებელ აპარატს, ობიექტივს და ოკულარს. გამანათებელი აპარატი შედგება სარკისა და კონდენსორისაგან. სარკე მოთავსებულია შტატივის ფუძეზე და გააჩნია ორნაირი ზედაპირი-ბრტყელი და ჩაღრმავებული. ჩაღრმავებული ზედაპირი აგროვებს და ახდენს სინათლის სხივების კონცენტრირებას, რომლებიც მოდის სინათლის წყაროდან, ამიტომაც მას იყენებენ მხოლოდ მაშინ როცა მუშაობენ კონდენსორის გარეშე, ანუ ძალინ მცირე გადიდებებზე. კონდენსორიანად მუშაობის შემთხვევაში, რომელიც გათვალისწინებულია პარალელური სხივების გამოყენებაზე, აუცილებელია ვისარგებლოთ სარკის ბრტყელი ზედაპირი. სარკის ზედაპირზე მიმაგრებული კონდენსორი შედგება რამოდენიმე ლინზისაგან, გამოიყენება სინათლის წყაროდან მომავალი პარალელური სინათლის სხივების შესაგროვებლად და ერთ წერტილში ფოკუსირებისათვის. მასში ჩამონტაჟებულია აპერტურული (ირისული) დიაფრაგმა, რომელიც აკავებს სინათლის ზედმეტ სხივებს და არეგულირებს კონდენსორის აპერტურას. კონდენსორის ქვეშ მდებარეობს სინათლის ფილტრის მოძრავი ჩარჩო.

ობიექტივი (ლათ. Objectum – საგანი) არის მიკროსკოპის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი ნაწილი. ის იძლევა საკვლევი ობიექტის გადიდებასა და უკუგამოსახულებას. ობიექტივი შედგება მეტალის ჩარჩოში მოთავსებული ლინზების სისტემისაგან. ფრონტალური (გარეთა) ლინზის ფოკუსურ მანძილზე არის დამოკიდებული ობიექტივის გადიდება. რაც უფრო მეტია ფრონტალური ლინზის სიმრუდე, მით მცირეა ფოკუსური მანძილი და მეტია ობიექტივის გადიდება. ობიექტივის გადიდება აღნიშნულია მის გარე ჩარჩოზე. ობიექტივის გადიდებაზეა დამოკიდებული სამუშაო მანძილი ანუ მანძილი ფრონტალურ ლინზასა და ობიექტს შორის და თვალთახედვის ფართობი. რაც მეტია ობიექტივის გადიდება, მით ნაკლებია სამუშაო მანძილი და თვალთახედვის არეალი.

ობიექტივი არის მრავალლინზიანი მოკლეფოკუსიანი სისტემა, რომლის ხარისხზეც არის დამოკიდებული ობიექტის გამოსახულება. გარეთა ლინზა ანუ ფრონტალური ლინზა უზრუნველყოფს გადიდებას. შიდა ლინზები კი ახდენს ოპტიკური ნაკლოვანებების კორექციას.

ერთ-ერთი ასეთი ნაკლოვანება არის – სფერული აბერაცია. ის დაკავშირებულია ლინზის უნართან არათანაბრად გარდატეხოს პერიფერიული და ცენტრალური სხივები. პირველი როგორც წესი უფრო მეტად გარდატყდება ვიდრე მეორე, რის გამოც გამოსახულება არის ბუნდოვანი და გაწელილი.

ქრომატული აბერაციები წარმოიქმნება ლინზაში სხვადახვა სიგრძის სინათლის ტალღების გატარებისას, განსხვავებული გარდატეხის მაჩვენებლის გამო სხივები ერთ წრტილში ვერ გროვდება.

ობიექტივს, რომელიც ასწორებს სფერულ და ნაწილობრივ ქრომატულ აბერაციებს მიეკუთვნება **აქრომატები**. ისინი შეიცავს 6 ლინზას და ასწორებს (აკორეგირებს) პირველად სპექტრს (სპექტრის ყვითელ - მწვანე ნაწილს) მეორადი სპექტრის მოშორების გარეშე. გამოსახულება, რომელიც მიიღება აქრომატების დახმარებით არ არის შეღებილი, მაგრამ გვერდებზე შეიმჩნევა წითელი ან ლურჯი ელფერი, რაც თანამედროვე აქრომატებში პრაქტიკულად არ აღინიშნება.

ობიექტივს, რომელიც აშორებს ქრომატულ აბერაციებს მეორადი სპექტრისათვის ე. წ. **აპოქრომატი**. მათში შეიძლება იყოს 1-12 ლინზა. აპოქრომატების დახმარებით

შესაძლებელია ობიექტის შეღებვის მოშორება და ერთნაირად მკვეთრი გამოსახულების მიღება სინათლის სხივების სხვადასხვა ფერისაგან. აპოქრომატებთან მუშაობისას მაქსიმალური ეფექტი მიიღწევა კომპენსაციურ ოკულარებთან მუშაობის პირობებში, რომლებიც აბათილებს ობიექტივების ოპტიკურ ნაკლოვანებებს.

პლანოქრომატი-აპოქრომატების ნაირსახეობა, რომელსაც გააჩნია ბრტყელი თვალთახედვის არე. ისინი მთლიანად ასწორებს ობიექტის ფოკუსირების უსწორ-მასწორობას. ძირითადად გამოიყენება მიკროფოტოგრაფირებისას.

ობიექტივები შეიძლება იყოს მშრალი და ჩაძირული (იმერსიული). მშრალი ობიექტივების შემთხვევაში ობიექტივის ფრონტალურ ლინზასა და კვლევის ობიექტს შორის არის ჰაერი, ხოლო იმერსიული სისტემის შემთხვევაში იმერსიული სითხე. მშრალ ობიექტივთან მუშაობისას ჰაერისა (1.0) და მინის (1.52) გარდატეხის მაჩვენებლებს შორის სხვაობის გამო სინათლის სხივის ნაწილი არ ხვდება თვალთახედვის არეალში. იმერსიული ობიექტივის შემთხვევაში, ფრონტალურ ლინზასა და ობიექტს შორის თავსდება იმერსიული სითხე (წყალი, კედრის ზეთი), რომლის გარდატეხის მაჩვებნებელი უახლოვდება მინისას. იმერსიულ ობიექტივს გააჩნია შავი ზოლი და აღნიშვნა **I-immersion, HI-homogen immersion, OI-oil immersion.**

თავი 3. მიკროსკოპის ძირითადი ტექნიკური მახასიათებლები

ობიექტივის გადიდება; მიკროსკოპის გადიდება; ოკულარი; მიკროსკოპის მუშაობის წესები; იმერსიული ობიექტივი; განათების დაყენება;3 რეპარატის განათება კელერის მიხედვით; მიკროსკოპია ბნელ ველში; ფაზ-კონტრასტული მიკროსკოპია; ლუმინესცენტრული მიკროსკოპია; ელექტრონული მიკროსკოპია.

ობიექტივის გადიდება V გამოითვლება ფორმულით V=l/f;

სადაც l-არის ტუბუსის სიგრძე ან მანძილი ობიექტივის ფოკალურ სიბრტყესა და გამოსახულების სიბრტყეს შორის, ის მერყეობს სხვადასხვა ობიექტივისათვის 125-180მმ; f – ობიექტივის ფოკუსური მანძილი, რაც მეტია მისი მაჩვენებელი, მით ნაკლებია ობიექტივის გადიდება.

ობიექტივების გადიდება მოცემულია მათ ჩარჩოზე (×8. ×40, ×9). მცირე გადიდების ობიექტივებს ახასიათებს უფრო დიდი სამუშაო მანძილი ობიექტივის ფრონტალურ ლინზასა და საკვლევ ობიექტს შორის, ვიდრე დიდი გადიდების ობიექტივებს. მცირე გადიდების ობიექტივებს გააჩნია არა მარტო დიდი სამუშაო მანძილი არამედ თვალთახედვის უფრო დიდი არეალი.

მიკროსკოპის გადიდება.

მიკროსკოპის გადიდების კოეფიციენტი განისაზღვრება ოკულარის გადიდებით (K) და ობიექტივის გადიდებით (V):

$$D=K\times V$$

მაგ.: ×15 გადიდების ოკულარისა და ×90 გადიდების ობიექტივის გამოყენების შემთხვევაში ობიექტის გადიდება იქნება 1390.

თეორიულად მიკროსკოპმა შეიძლება გაადიდოს ობიექტი ×2000 , თუმცა აუცილებელია განვასხვაოთ სასარგებლო და უსარგებლო გადიდება. სასარგებლო გადიდების მაქსიმალური ზღვარი არის ×1400, ამის შემდეგ ჩნდება გარკვეული პრობლემები, მაგ.: დიფრაქცია, რაც სინათლის სხივის ტალღოვან ბუნებას უკავშირდება.

საერთო გადიდება მიკროსკოპის სრულყოფილ მახასიათებელს როდი წარმოადგენს. გადიდებული გამოსახულება შეიძლება იყოს მკვეთრი ან არამკვეთრი.

გამოსახულების სიმკვეთრე განისაზღვრება მიკროსკოპის **გადიდების შესაძლებლობით**, რომელიც დამოკიდებულია გამოყენებული სინათლის ტალღის სიგრძეზე და მიკროსკოპის ოპტიკური სისტემის რიცხვით აპერტურაზე. მიკროსკოპის გადიდების შესაძლებლობა დამოკიდებულია მინიმალურ მანძილზე ორ წერტილს შორის რომლის დროსაც შესაძლებელია მათი გარჩევა.

$$d=\alpha/A_1+A_2$$

სადაც d – არის ორ წერტილს შორის მინიმალური მანძილი;

A_1 – ობიექტივის რიცხითი აპერტურა;

A_2 – კონდენსორის რიცხვითი აპერტურა;

α - გამოყენებული სინათლის ტალღის სიგრძე.

ობიექტივის რიცხვითი აპერტურა არის მისი სინათლის შემგროვებლური უნარის მახასიათებელი და განისაზღვრება ფორმულით

$$A=n\times\sin 1/2\,\alpha,$$

სადაც,

n –არის სინათლის სხივის გარდატეხის მაჩვენებელი, რომელიც გაივლის სასაგნე მინაში ფრონტალურ ლინზასა და სასაგნე მინას შორის.

α – კუთხე, რომლის ერთი მხარე ემთხვევა ოპტიკურ ღერძს, ხოლო მეორე წარმოიქმნება ხაზით, რომელიც აერთიანებს ობიექტივიდან სინათლის სხივების გამოსვლის წერტილს ობიექტივის საზღვართან.

1/2 α - ობიექტივში სინათლის შემსვლელი კუთხის ნახევარი.

რიცხვითი აპერტურა არის ლინზის "წვდომის" მაჩვენებლი და წარმოადგენს ლინზაზე მოხვედრილი სინათლის სხივის რაოდენობრივ საზომს. მაღალი აპერტურის ობიექტივებისა და მოკლე სინათლის ტალღის გამოყენება საშუალებას იძლევა უჯრედების სტრუქტურულ ორგანიზაციასა და დიდი ზომის ვირუსებზე დაკვირვებისა.

ჰაერთან მოსაზღვრე ნებისმიერი ლინზის რიცხვითი აპერტურა არ შეიძლება იყოს ერთზე მეტი, რადგან ჰაერის გარდატეხის მაჩვენებელი ერთის ტოლია. მიკროსკოპის разрешающая способность შეიძლება გაიზარდოს ორი გზით, ან გავანათოთ ობიექტი სინათლის სხივის მოკლე ტალღებით – ულტრაიისფერი სხივებით, რაც საჭიროებს ძვირადღირებული კვარცული ოპტიკის გამოყენებას, ან გავზარდოთ ლინზის მოსაზღვრე გარემოს გარდატეხის მაჩვენებელი, რათა მოვუახლოვოთ მისი მაჩვენებელი მინის გარდატეხის მაჩვენებელს, რომელზეც მოთავსებულია ობიექტი (n=1.5). ამისათვის ობიექტივის ფრონტალურ ლინზასა და საკვლევ ობიექტს შორის ათავსებენ მაღალი გარდატეხის მაჩვენებლის მქონე სითხის წვეთს. მაგ.; წყალი-n=1.3 ან იმერსიული ზეთი n=1.5. თითოეული ამ სითხისათვის უშვებენ სპეციალურ იმერსიულ ობიექტივებს. ობიექტივის რიცხვითი აპერტურა მითითებულია მის ჩარჩოზე.

კონდენსორის რიცხვითი აპერტურა უნდა შეესაბამებოდეს ობიექტივისას. როცა ის მცირეა, მაშინ ობიექტივის ლინზის შესაძლებლობები სრულად არ იქნება გამოყენებული მასში გამავალი სუსტი სინათლის სხივების გამო. თუ კონდენსორის აპერტურა მეტია ობიექტივის აპერტურაზე, რაც ხშირად ხდება მშრალ სისტემებთან მუშაობისას, აუცილებელია კონდენსორის ირისული დიაფრაგმა დაიხუროს ნაწილობრივ, ეს ხელს შეუშლის სინათლის სხივების გაბნევას და იძლევა საჭირო კონტრასტს.

ოკულარი – (ლათ. Okularis –თვალის) შედგება ორი ლინზისაგან – თვალის (ზედა) და შემგროვებლური (ქვედა). ოკულარის სამუშაო გადიდება მოცემულია მის ჩარჩოზე, ის გამოითვლება შემდეგი ფორმულით

$$K=L/F$$ სადაც,

L – არის საუკეთესო მხედველობის მანძილი, რომელიც ტოლია 25.

F – არის ოკულარის ლინზების ფოკუსური მანძილი.

მცირე და საშუალო გადიდების აქრომატულ ობიექტივებთან, ასევე მცირე გადიდების პლანაქრომატულ ობიექტივებთან გამოიყენება გიუგენსის ანუ ორთოსკოპიული ოკულარები. აპოქრომატულ, ასევე დიდი გადიდების პლანაქრომატულ და აქრომატულ ობიექტივებთან კი კომპენსაციური ოკულარები.

მიკროსკოპთან ხანგრძლივი მუშაობისას აუცილებელია ბინოკულარული სისტემით სარგებლობა, რომელიც აღჭურვილია კორექციული ლინზების სისტემით, ის ობიექტის

ხილვადობას აუმჯობესებს, ამცირებს გამოსახულების სიმკვეთრეს და ამით იცავს მხედველობას.

მიკროსკოპთან მუშაობის წესები

1. მიკროსკოპისათვის ადგილი შეირჩევა პირდაპირი მზის სხივების მოხვედრიდან მოშორებით, მუქ ზედაპირზე მუშაობა ნაკლებად ღლის თვალებს.
2. ოკულარში ჩახედვა მიზანშეწიონილია მარცხენა თვალით, ამ დროს მარჯვენა არ უნდა იყოს დახუჭული, ბინოკულარულ სისტემასთან მუშაობისას ოკულარებს შორის მანძილს არეგულირებენ მკვლევარის თვალებს შორის მანძილის შესაბამისად.
3. მიკროსკოპის გადატანა რეკომენდირებულია ორი ხელით, ერთით გადააქვთ შტატივი, მეორეთი კი მიკროსკოპის ძირითადი ნაწილი.
4. არ არის რეკომენდირებული ოკულარის ამოღება მილიდან, რათა არ დაბინძურდეს.
5. ლინზები უნდა იყოს სუფთა, მათ ოპტიკურ ზედაპირზე თითებით შეხება არ შეიძლება;
6. მიკროსკოპი ინახება თავის საბურველში.

იმერსიული ობიექტივი. მშრალი, ფიქსირებული, შეღებილი პრეპარატი თავსდება მიკროსკოპის სასაგნე მაგიდაზე, გამოიყენება ×8 გადიდების ობიექტივი განათების დასარეგულირებლად, შემდეგ პრეპარატზე ცენტრში დააქვთ იმერსიული სითხის ერთი წვეთი, და მშრალ სისტემას ცვლიან იმერსიულით. მაკრომეტრული ხრახნის საშუალებით ტუბუსი ჩამოყავთ ქვევით ობიექტივის იმერსიულ ზეთში ჩაძირვამდე. აუცილებელია სიფრთხილე, რათა ობიექტივის ფრონტალური ლინზა არ შეეხოს სასაგნე მინას და არ დაზიანდეს. ჩაძირვის შემდეგ ასევე მაკრომეტრული ხრახნით სწევენ ზევით ტუბუსს და აკვირდებიან პრეპარატის გამოჩენას, მკვეთრი კონტრასტი და ზუსტი ფოკუსირება მიიღწევა მირკომეტრული ხრახნის გამოყენებით.

სამუშაოს დასრულების შემდეგ ობიექტივის ფორნტალური ლინზა იწმინდება ჯერ მშრალი ხელსახოცით, შემდეგ კი ბენზოლიანით. იმერსიული სითხის დატოვება ლინზაზე დროთა განმავლობაში გამოიწვევს მიკროსკოპის ოპტიკის დაზიანებას.

განათების დაყენება. მოსახერხებელია სინათლის ხელოვნური წყროს გამოყენება-ის მუდმივია, ვიდრე დღის განათება და უკეთ ანათებს ობიექტს.

პრეპარატის განათება კელერის მიხევით.

საუკეთესო განათება მიიღწევა სინათლის წერტილოვანი წყაროს - მაგიდის გამანათებლის გამოყენებისას.

კელერის პრინციპი მდგომარეობს იმაში, რომ გამანათებლის კოლექტორის, კონდენსორის და ობიექტივის აპერტურა უნდა იყოს მსგავი. ამისათვის საჭიროა შემდეგი თანმიმდევრობის დაცვა:

მიკროსკოპიდან 25-30სმ აყენებენ გამანათებელს დაბალვოლტიანი ნათურით;

პრეპარატი თავსდება სასაგნე მაგიდაზე, ყენდება ×8 გადიდების ობიექტივი, კონდენსორს ბოლომდე წევენ ზევით, ბოლომდე ხსნიან მის ირისულ დიაფრაგმას, თითქმის მთლიანად ხურავენ გამანათებლის საველე დიაფრაგმას, ტოვებენ რა მხოლოდ მცირე არეს (1.0-1.2სმ დიამეტრი), გადასწევენ მინას და აყენებენ ბრტყელ სარკეს;

ჩართავენ გამანათებელს ქსელში, სინათლის სხივს აყენებენ ისე, რომ ძალიან მკვეთრი არ იყოს, რათა არ იმოქმედოს თვალებზე, სარკეზე აფარებენ თეთრ ქაღალდს და მასზე ახდენენ ნათურის სინათლის სხივის ფოკუსირებას;

ოკულარში ჩახედვით, სარკის მოძრაობის პროეცირებით ახდენენ პრეპარატის ფოკუსირებას, ისე რომ სინათლის ლაქა მოხვდეს თვალთახედვის არეში, ხოლო პრეპარატი კი ამ განათებული ლაქის ცენტრში.

განაგრძობენ პრეპარატის ფოკუსირებას და დიაფრაგმის გახსნას მანამ, სანამ ნათელი ლაქა არ გასცილდება ოდნავ თვალთახედვის არეალს.

კელერის მიხედვით განათების რეგულირება რეკომენდირებულია ასევე ბნელი და ფაზ-კონტრასტული მიკროსკოპიის დროს.

მიკროსოპია ბნელ ველში

მიკროსკოპია ბნელ ველში ეყრდნობა ტინდალის პრინციპს –გაბნეული სინათლის სხივს გვერდიდან დაკვირვებისას გააჩნია მუქ ფონზე ცისფერი კონუსის ფორმა, ანუ ობიექტის განათებისას დახრილი სინათლის სხივებით სხივები არ ხვდება ობიექტივში, ამიტომ თვალთახედვის არეალი არის ბნელი. თუ საკვლევი პრეპარატი წარმოადგენს მიროორგანიზმთა უჯრედებს, მაშინ დახრილის სინათლის სხივები იმდენად აირეკლება პრეპარატის ზედაპირიდან, და იხრება მათი საწყისი მიმართულებიდან, რომ ხვდება ობიექტივში და მკვლევარი შავ, ბნელ ფონზე ხედავს მანათობელ ობიექტებს (მიკროორგანიზმთა უჯრედებს). პრეპარატის ასეთი განათება მიიღწევა სპეციალური კონდენსორის გამოყენებით. მისი აპერტურა 0.2-0.4 ჯერ უნდა აღემატებოდეს ობიექტივის აპერტურას, წინააღმდეგ შემთხვევაში გვერდითი სხივების ნაწილი მოხვდება ობიექტივში, რაც გამოიწვევს თვალთახედვის არის ნაწილობრივ განათებას და კონტრასტის შემცირებას. (სურათი №---). ბნელი ველის კონდენსორს გააჩნია ჩაბნელებული შუა ნაწილი, ამიტომ ცენტრალური სინათლის სხივები, რომელიც გამოდის სარკიდან კავდება, და პრეპარატის სიბრტყეში ხვდება, მხოლოდ გვერდითი სხივები-არეკლილი სარკის ზედაპირიდან, რომელიც განლაგებულია კონდენსორის შიგნით.

ბნელი მიკროსკოპიის პირობებში შესაძლებელია ძალიან მცირე ზომის მიკროორგანიზმების დანახვა, რომელსაც ვერ ახერხებს სინათლის მიკროსკოპი, თუმცა მოცემულ პირობებში ხდება მხოლოდ ორგანიზმის კონტურების გარჩევა და არა შიდასტრუქტურული ორგანიზაციისა.

ფაზ-კონტრასტული მიკროსკოპია

ფაზ-კონტრასტული მიკროსკოპიის დროს განსხვავება სინათლის სხივების ფაზებში, რომელიც წარმოიქმნება მათი გასვლისას გამჭვირვალე ობიექტებში, ხდება ამპლიტუდური, რის გამოც ობიექტები ხდება კონტრასტული. ადამიანის თვალს შეუძლია აღიქვას განსხვავება სინათლის სხივის ტალღის სიგრძეში (ფერი) და მის ამპლიტუდაში (ინტენსიურობა, სომკვეთრე), მაგრამ ვერ ახერხებს ფაზების გადაადგილების აღქმას. საკვლევი ობიექტის მაღალი კონტრასტის მისაღწევად აუცილებელია ან კონდენსორის დიაფრაგმის სრული დახურვა, რაც არ არის სასურველი, რადგან ის ამცირებს კონდენსორის აპერტურას და ამით მკვეთრად ამცირებს მიკროსკოპის разрешающая способность ან პრეპარატის ფიქსაცია და შეღებვა,

რაც ყოველთვის სასურველი არ არის. ფაზური კონტრასტის ძირითადი ფასეულობა მდგომარეობს იმაში, რომ ის იძლევა საშუალებას დავაკვირდეთ ცოცხალ ორგანიზმებს მათი ფიქსაციისა და შეღებვის გარეშე. ფაზ-კონტრასტული მოწყობილობის გამოყენება არ იწვევს მიკროსკოპის разрешающая способность გაზრდას, მაგრამ იძლევა საშუალებას გამჭვირვალე ობიექტების უფრო მკვეთრად დანახვისა და შიდასტრუქტურული ჩანართების დათვალიერებისა.

ოპტიკური სისტემა, რომელიც გამოიყენება ფაზური კონტრასტის მისაღებად შედგება ფაზური ფირფიტისა და რგოლური დიაფრაგმისაგან. ფაზური ფირფიტა მდებარეობს ობიექტივის უკანა ფოკალურ სიბრტყეში, ეს არის გამჭვირვალე დისკი, რომელზეც არის მეტალის რგოლი. ხოლო რგოლური დიაფრაგმა მდებარეობს კონდენსორის ქვეშ და წარმოადგენს გამჭვირვალე სივრცეს რგოლის სახით, რომელიც დამაგრებულია სინათლისათვის შეუღწევად ფირფიტაზე. ფაზური ეფექტი მიიღწევა პირდაპირი სინათლის სხივების ინტერფერენციით, რომლებიც პრეპარატში გასვლისას არ გადაიხრება და გვერდითი დიფრაგირებული სხივებით, რომლებიც ობიექტში და ფაზურ ფირფიტაში გავლის ხარჯზე ფაზებით ემთხვევა პირდაპირი სინათლის სხივებს ან გადახრილია და იმყოფება უკუფაზაში (საწინააღმდეგო ფაზაში). პირველ შემთხვევაში ორივე ტიპის სინათლის სხივი ერთდება და ობიექტის გამოსახულება ხდება უფრო ღია, ვიდრე ფონი. ეს არის ე. წ. **ღია ნეგატიური კონტრასტი**. ნეგატიური პრინციპის კონტრასტით არის მოწყობილი **ანოპტრალური მიკროსკოპი**. მეორე შემთხვევაში დიფრაქციული სინათლის სხივის ტალღა აკლდება პირდაპირს და ობიექტი ხდება უფრო მუქი –ბნელი, **პოზიტიური კონტრასტი**. ასევე რგოლური დიაფრაგმა ამცირებს პირდაპირი სინათლის სხივების ინტენსივობას, რაც აძლიერებს კონტრასტს.

ლუმინესცენტური მიკროსკოპია

ლუმინესცენტური მირკოსკოპია ეყრდნობა სხვადასხვა ბიოლოგიური წარმოშობის ნივთიერებებისა და საღებავების უნარს ანათებდნენ სინათლის სხივის ზემოქმედებით. ლუმინესცენციის უნარის მქონე ნივთიერებების მოლეკულები შთანთქავენ მათზე მოხვედრილ სინათლის ენერგიას და გადადიან აგზნებულ მდგომარეობაში. ასეთ მდგომარეობაში ისინი იმყოფება მცირე პერიოდის განმავლობაში და შემდეგ კვლავ ბრუნდებიან საწყის ენეგეტიკულ დონეზე. ამ გადასვლას თან ახლავს ზედმეტი ენერგიის გამოყოფა ნათების-ლუმინესცენციის სახით. ამისათვის ობიექტის გასანათებლად იყენებენ ულტრაიისფერი სხივების ტალღებს სიგრძით 300-400ნმ, ლურჯ-იისფერ სხივებს სიგრძით 400-460ნმ.

ბიოლოგიური წარმოშობის ზოგიერთი ნაერთი ბუნებრივად ხასიათდება ლუმინესცირების უნარით-ქლოროფილი, ვიტამინი B_2, კაროტინოიდები, პორფირინები და ზოგიერთი ანტიბიოტიკი. უჯრედში ასეთი ნაერთების შემცველობიდან გამომდინარე მაგ.: მწვანე წყამცენარეებს, ზოგიერთ საფუარს, ბაქტერიას ახასიათებს პირველადი ლუმინესცენცია, მაგრამ ბაქტერიების უმრავლესობის ლუმინესცირების უნარი ძალიან დაბალია, ამიტომ მათ ამუშავებენ ლუმინესცირების უნარის მქონე სპეციალური საღებავებით – ფლუოროქრომებით. ასეთი დამუშავების შემდეგ ობიექტის ლუმინესცირებას ეწ. მეორადი.

ლუმინესცენტური მიკროსკოპია ზრდის გამოსახულების კონტრასტს, და იძლევა საშუალებას ცალკეული შიდაუჯრედული სტრუქტურების დათვალიერებისა, ასევე მათი ფუნქციონალური ცვლილებების დაფიქსირებისა უჯრედის სხვადასხვა მდგომარეობის დროს. ამ ტიპის მიკროსკოპიას ფართოდ იყენებენ ციტოლოგიური გამოკვლევებისას, ცოცხალი და მკვდარი უჯრედების გამოსავლენად, ნიადაგის მიკროორგანიზმების და რიზოსფეროს შესასწავლად.

ელექტრონული მიკროსკოპია

სინათლის მიკროსკოპებისაგან განსხვავებით ელექტრონული მიკროსკოპებთან მხოლოდ მათი ექსპლუატაციის სპეციალისტები მუშაობენ. ელექტრონული მიკროსკოპის разрешения ს ზღვარი 0.1ნმ და სამჯერ აღემატება სინათლი სმიკროსკოპის იგივე მაჩვენებელს.

ელექტრონული მიკროსკოპი საშუალებას იძლევა მხოლოდ არაცოცხალი ობიექტების დათვალიერებისა, რადგან საკვლევი ნიმუში იმყოფება ვაკუუმისა და ინტენსიური დასხივების ქვეშ. თუ სინათლის მიკროსკოპში კონტრასტი განპირობებულია საკვლევი ობიექტის სტრუქტურული ელემენტების მიერ სინათლის სხივის შერჩევითი შთანთქმით-ადსორბციული კონტრასტი, ან ობიექტში გავლისას სინათლის სხივის ტალღის ფაზის შეცვლით – ფაზური კონტრასტი, ელექტრონულ მიკროსკოპში ის განპირობებულია თხელფირფიტოვანი ობიექტის შემადგენლობაში შემავალი მძიმე ატომების მიერ აჩქარებული ელექტრონების გადახრით. (ან ხელოვნური "ქიმიური კონტრასტირებით"), ასეთ კონტრასტს უწოდებენ **დიფრაქციულს**. აბსორბციული კონტრასტი ელექტრონული მიკროსკოპირებისას არასასურველი მოვლენაა, ამ დროს ელექტრონების ენერგიის შთანთქმა იწვევს ქრომატინულ აბერაციებს ან ნიმუშის სითბურ დაშლას. ამიტომ ობიექტი ხშირად საკვლევად მზადდება ულტრათხელი ანათლების (30-100ნმ) სახით.

ელექტრონული მიკროსკოპის ძირითადი მოწყობილობა არის ვაკუუმის სვეტი, რომელშიც თანმიმდევრულად, ღერძული სიმეტრიით განლაგებულია ელექტრონული პუშკა, რომელიც შეიცავს კათოდს და ანოდს, მაგნიტური ლინზები და ლუმინესცენტური ეკრანი. ელექტრონების ნაწილი გაივლის ანოდის ცენტრში (ცენტრალური აპერტურა), და წარმოქმნის ელექტრონულ სხივს, რომელიც ფოკუსირდება პირველი მაგნიტური ლინზით (კონდენსორული) და ობიექტი ნათდება. ობიექტში გასული ელექტრონები ფიქსირდება მეორე მაგნიტური ლინზით (ობიექტივის), რომელიც ახდენს გადიდებული გამოსახულების ფორმირებას, ის შემდგომ დამატებით დიდდება მესამე მაგნიტური ლინზით (პროექციული) და პროეცირდება ლუმინესცენტურ ეკრანზე ან ფოტოფირზე.

ელექტრონულ მიკროსკოპს, რომელიც ქმნის გამოსახულებას თხელფირფიტოვანი საკვლევი ნიმუშის გავლით ელექტრონების გატარების ხარჯზე ეწოდება **ტრანსმისიური მიკროსკოპი**. ის იძლევა საშუალებას მიკროორგანიზმების შიდაუჯრედული სტრუქტურების თავისებურებების შესწავლისა, ამ მიზნისათვის პრეპარატი მუშავდება ქიმიურად სხვადასხვა ფისების ხსნარებში.

მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპის შემთხვევაში გამოსახულება ეკრანზე გამოდის იმის ხარჯზე, რომ პირველად ელექტრონული სხივი ასკანირებს რა საკვლევი ნიმუშის ზედაპირს, ურთიერთქმედებს ობიექტის ატომების ელექტრონულ გარსებთან.

მათი შედარებითი ინტენსივობა დამოკიდებულია რელიეფის დასხივებული ზედაპირის მახასიათებლებზე, ქიმიურ შემდაგენლობაზე, და ელექტროგამტარობაზე. მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპია იძლევა საშუალებას ობიექტის სამგანზომილებიანი (სტერეოსკოპიული) გამოსახულების მიღებისა, რაც განსაკუთრებით ეფექტურია მიკროორგანიზმების ზედაპირული სტრუქტურების, ფორმის და არქიტექტონიკის შესასწავლად. საკვლევი ობიექტი წინასწარ მუშავდება ქიმიურად, შრება სპეციალური მეთოდებით, იმტვერება ოქროთი, პლატინით ან პალადიუმით მეორადი ელექტრონული ემისიის ასამაღლებლად და ელექტროგამტარი ზედაპირის შესაქმნელად, რომელიც აცილებს ზედაპირულ მუხტს.

თავი 4. მიკროორგანიზმების ცოცხალი უჯრედების პრეპარატები

პრეპარატი "გაჭყლეტილი წვეთი"; პრეპარატი „ჩაკიდული წვეთი"; პრეპარატი „ანაბეჭდი"; პრეპარატი მიკროკულტურა ანუ აგარის ფირფიტა; მიკროორგანიზმთა და ფიქსირებული შეღებილი პრეპარატები; მიკროორგანიზმთა და უჯრედების ზომის განსაზღვრა.

მიკროორგანიზმთა მორფოლოგიის შესწავლა შესაძლებელია მიკროსკოპიის და დიფერენციალური შეღებვის სხვადასხვა მეთოდებით. მეთოდის შერჩევა დამოკიდებულია კვლევის კონკრეტულ მიზანზე. თუმცა არის გარკვეული ასპექტები, რომელიც საფუძლად უდევს მიკროორგანიზმთა მორფოლოგიისა და ციტოლოგიის ნებისმიერ მეთოდს, ეს არის პრეპარატების მომზადების, ფიქსაციისა და შეღებვის მეთოდები.

პრეპარატებს, როგორც წესი ამზადებენ სასაგნე მინებზე, რომელთა სისქე არ უნდა აღემატებოდეს 1.2-1.4 მმ. უფრო სქელი მინის გამოყენება ამცირებს გამოსახულების სიმკვეთრეს. მნიშვნელოვანი მომენტია სასაგნე მინების ზედაპირის მომზადება. ის უნდა იყოს სკურპულოზურად გასუფთავებული და გაუცხიმოვნებული, რათა წყლის წვეთი თანაბრად განაწილდეს ზედაპირზე, ამისათვის სასაგნე მინების ზედაპირს ამუშავებენ ქრომის ხსნარით და ავლებენ გამდინარ წყალს და სპირტს (ეთანოლი). ყოველდღიური მუშაობისას სავსებით საკმარისია სასაგნე მინის ზედაპირი გავწმინდოთ საპნით და შემდეგ მშრალი ტილოთი. გაუცხიმოვნების მაღალი ხარისხი ასევე მიიღწევა სასაგნე მინების ზედაპირის დამუშავებით ეთერში დასველებული ბამბით. საფარი მინები ასევე უნდა იყოს გარეცხილი და გამშრალი. მათი სისქე არ უნდა აღემატებოდეს 0.15-0.17მმ. უფრო სქელი მინები აუარესებს გამოსახულებას.

პრეპარატი "გაჭყლეტილი წვეთი"

სასაგნე მინაზე ათავსებენ ონკანის წყლის წვეთს, მასში შეაქვთ მცირე რაოდენობის საკვლევი მიკროორგანიზმების უჯრედები და ზევიდან აფარებენ საფარ მინას. მიკროორგანიზმები, გაზრდილი მყარ საკვებ არეზე შეაქვთ ბაქტერიოლოგიური მარყუჟით და ანაწილებენ წყლის წვეთში თანაბრად, ხოლო თხევად საკვებ არეში გაზრდილი მიკროორგანიზმების გადასატანად სასაგნე მინაზე იყენებენ სტერილურ პიპეტს. უკანასკნელ შემთხვევაში სასაგნე მინაზე წყლის წვეთის შეტანა არ არის აუცილებელი. საკვლევი მასალის წვეთი სასაგნე მინაზე უნდა იყოს იმდენად მცირე, რომ საფარი მინის დაფარების შემდეგ გვერდებზე არ უნდა იყოს ზედმეტი სითხე, თუ ეს მაინც მოხდა მისი დაშრობა შესაძელებელია ფილტრის ქაღალდით.

პრეპარატი ჩაკიდული წვეთი

საკვლევი მიკროორგანიზების სუსპენზიის წვეთი ბაქტერიოლოგიური მარყუჟით გადააქვთ საფარ მინაზე, რომელსაც გადმოაბრუნებენ და ათავსებეს ჩაღმავებული ფოსოს მქონე სასაგნე მინაზე, ისე რომ პრეპარატის წვეთი ჩაეკიდოს ამ ფოსოში. მისი გვერდები წინასწარ მუშავდება ვაზელინით რათა შემდეგ თავიდან ავიცილოთ სასაგნე და საფარი მინების მოძრაობა. ამის შედეგად საკვლევი პრეპარატის წვეთი აღმოჩნდება ჰერმეტიზებულ ტენიან კამერაში, ეს ხელს უწყობს მასზე მრავალდღიან დაკვირვებას.

პრეპარატი "ანაბეჭდი"

აგარიზებული საკვები არიდან, რომელზეც გაზრდილია მიკროორგანიზმები ამოჭრიან კუბს და ფრთხილად გადაიტანენ სასაგნე მინაზე, ისე რომ

მიკროორგანიზმების კოლონიები აღმოჩნდეს ზევით, შემდეგ მას ზევიდან აფარებენ საფარ მინას და ფრთხილად აწვებიან პინცეტით, რათა საფარ მინაზე გადავიდეს ანაბეჭდი, ასეთი საფარი მინა გადააქვთ ახალ სასაგნე მინაზე, რომელზეც დაწვეთებულია წყლის წვეთი ან მეთილენის ლურჯი (1 : 40). ანაბეჭდი მიიღება ასევე თუ აგარიზებულ საკვებ არეზე გაზრდილ მიკროორგანიზმების კოლონიებს ან გაზონს პირდაპირ დავაფარებთ სასაგნე მინას და ოდნავ დავაწვებით გვერდითი მოძრაობების გარეშე.

მიკროორგანიზმთა ცაცხალი პრეპარატების საკვლევად იყენებენ მიკროსკოპის "მშრალ სისტემებს". სამუშაოს დასრულების შემდეგ, პრეპარატებიანი სასაგნე მინები გარკვეული პერიოდი უნდა ჩაიძიროს სადეზინფექციო ხსნარში და მხოლოდ ამის შემდეგ გაირეცხოს.

პრეპარატი მიკროკულტურა ანუ აგარის ფირფიტა.

სტერილურ, თბილ სასაგნე მინაზე პიპეტით დააქვთ სტერილური აგარიზებული საკვები არე 0.2-0.3მლ. მას ანაწილებენ მინის მთელ ზედაპირზე, გაცივების შემდეგ ზედმეტ აგარს აცილებენ სტერილური ლანცეტით ისე რომ სასაგნე მინის ორ მხარეს დარჩეს საფარი მინის ზომის შესაბამისი აგარიზებული საკვები არის ორი კვადრატი, მათ ცენტრში პიპეტით ან ბაქტერიოლოგიური მარყუჟით შეაქვთ მიკროორგანიზმთა სუსპენზიის წვეთი, და ასეთი სასაგნე მინები გადააქვთ ტენიან სტერილურ კამერებში- ანუ სტერილურ პეტრის ჯამში, რომელშიც მოთავსებულია ტენიანი საშრობი ქაღალდი, მას ათავსებენ თერმოსტატში. მიკროსკოპირების წინ მიკროკულტურიან ფირფიტაზე გამოშრობის შემთხვევაში აწვეთებენ წყალს ან საღებავს, შემდეგ ფრთხილად აფარებენ საფარ მინას და ახდენენ მიკროსკოპირებას.

სასაგნე მინაზე მიკროორგანიზმთა ზრდის მეთოდი საშუალებას იძლევა მიკრობთა ზრდა-განვითარებაზე უშუალო დაკვირვებისა. ასეთ პრეპარატებში არ ირღვევა უჯრედების განლაგების თანმიმდევრობა, ზრდა შეიძლება განხორციელდეს როგორც აერობულ ასევე ანაერობულ პირობებში.

აგარის ფირფიტა შეიძლება მოთავსდეს საფარ მინაზე და მომზადდეს პრეპარატი "ჩაკიდული წვეთი", ასეთ პრეპარატზე შესაძლებელია სრიალით მოძრავ მიკროორგანიზმებზე დაკვირვება.

მიკროორგანიზმთა ფიქსირებული შეღებილი პრეპარატები

ფიქსირებული, შეღებილი პრეპარატების მომზადება მოიცავს შემდეგ ეტაპებს: ნაცხის მომზადება, გაშრობა, ფიქსაცია და შეღებვა.

ნაცხის მომზადება – სპირტით გაუცხიმოვნებული სასაგნე მინის ზედაპირზე ათავსებენ ონკანის წყლის ერთ წვეთს და ბაქტერიოლოგიური მარყუჟით მასში გადააქვთ საკვლევი მასალის მცირე რაოდენობა, "გაჭყლეტილი წვეთი"-ს პრეპარატის მსგავსად. მიღებულ სუსპენზიას სასაგნე მინის ზედაპირზე თანაბრად ანაწილებენ მარყუჟით 1-2სმ^2 ფართობზე. ნაცხი უნდა იყოს იმდენად თხელი რომ ჰაერზე შრებოდეს.

ნაცხის გაშრობა – მზა პრეპარატის გაშრობა სასურველია ჰაერზე ოთახის ტემპერატურაზე. თუ ნაცხის გაშრობა გვიანდება მისი ოდნავი შეთბობა შესაძლებელია ცეცხლის ალზე, ძალიან ფრთხილად რამოდენიმეჯერ გადატარებით, წინააღმდეგ შემთხვევაში მაღალი ტემპერატურა გამოიწვევს უჯრედების დეფორმირებას.

პრეპარატის ფიქსაცია – ემსახურება რამოდენიმე მიზანს: მოკლას მიკროორგანიზმები, რათა მათთან მუშაობა შემდგომში იყოს უსაფრთხო, უზრუნველყოს უჯრედების მყარი ფიქსაცია სასაგნე მინის ზედაპირზე, გახადოს ნაცხი საღებავის მიმართ აღქმადი, რადგან მკვდარი უჯრედები უკეთ იღებება. ფიქსაციის ყველაზე გავრცელებული ფორმა არის თერმული დამუშავება. ამისათვის პრეპარატს სამჯერ გადაატარებენ ცეცხლის ალის ყველაზე მაღალი ტემპერატურის წერტილში. ნაცხის გადახურების შემთხვევაში ადგილი აქვს შიდაუჯრედული სტრუქტურების უხეშ დარღვევებს, ზოგჯერ კი უჯრედების დეფორმაციას. ფიქსაციის კიდევ ერთი ხერხია ქიმიური ფიქსაცია (იხ. დანართი). მაფიქსირებელ სითხეს აწვეთებენ ნაცხზე, ან ნაცხიან სასაგნე მინას გარკვეული დროით ათავსებენ მაფიქსირებელ სითხეში.

შეღებვა – მიკროორგანიზმების უჯრედებს ძირითადად ღებავენ ანილინის საღებავებით. ასხვავებენ მჟავე და ფუძე საღებავებს. მჟავეა საღებავი, რომელშიც შეღებვის უნარის მქონე იონი (ქრომოფორი) –ანიონია. ფუძე საღებავებში ქრომოფორი კათიონია. მჟავე საღებავების მაგალითებია; ეოზინი, ერითროზინი, ნიგროზინი, მჟავე ფუქსინი- ყველა ეს საღებავები ინტენსიურად უკავშირდება უჯრედის ციტოპლაზმატურ კომპონენტებს. ფუძე საღებავები-მეთილენის ლურჯი, ფუძე ფუქსინი, გენციანვიოლეტი, კრისტალური იისფერი, საფრანინი - უკავშირდება უჯრედის ბირთვულ კომპონენტებს. საღებავები შეიძლება ასევე დავყოთ პოზიტიურ და ნეგატიურ საღებავებად.

პოზიტიური საღებავები ღებავს უშუალოდ მიკროორგანიზმთა უჯრედებს, ნეგატიური კი სივრცეს, რომელიც გარს აკრავს საკვლევი ობიექტის უჯრედს.

არსებობს შეღებვის მარტივი და დიფერენციალური ფორმა. მარტივი შეღებვისას იღებება მთლიანი უჯრედი, ისე, რომ ხილული ხდება მისი ფორმა და ზომა. დიფერენციალური შეღებვა ითავლისწინებს უჯრედების ცალკეული სტრუქტურების შეღებვას, მისი საშუალებით ხდება უჯრედის ჩანართებისა და ცალკეული კომპონენტების გამოვლენა.

მიკროორგანიზმთა მარტივი შეღებვისათვის იყენებენ ფუქსინს, გენციან ვიოლეტს ან მეთილენის ლურჯს. ფიქსირებულ პრეპარატზე ასხამენ საღებავის რამოდენიმე წვეთს და აყოვნებენ 1-3წთ, საჭიროების შემთხვევაში (საღებავის დაშრობა) ამატებენ საღებავს, დასრულების შემდეგ პრეპარატი ირეცხება გამდინარე წყალში უფერული წყლის გამოჩენამდე. პრეპარატი შრება ჰაერზე, ოთახის ტემპერატურაზე ან ფრთხილად სცილდება წყლის წვეთები საშრობი ქაღალდით, შემდგომ მასზე აწვეთებენ იმერსიულ სითხეს და იყენებენ ×90 გადიდების ობიექტივს. უფრო სუფთა პრეპარატის მისაღებად, შესაძლებელია საღებავი დავასხათ არა პირდაპირ ნაცხს, არამედ მასზე დაფარებულ საშრობ ქაღალდს, ან გამოვიყენოთ მარტივი შეღებვის კიდევ ერთი მოდიფიკაცია, გამზადებულ ნაცხზე მოვათავსოთ შესაბამისი საღებავით გაჟღენთილი საშრობი ქაღალდი, ბოლო ორი მოდიფიკაცია, ხელს უწყობს უფრო სუფთა მუშაობას და ააცილებს ზედმეტი საღებავის დაღვრას პრეპარატზე.

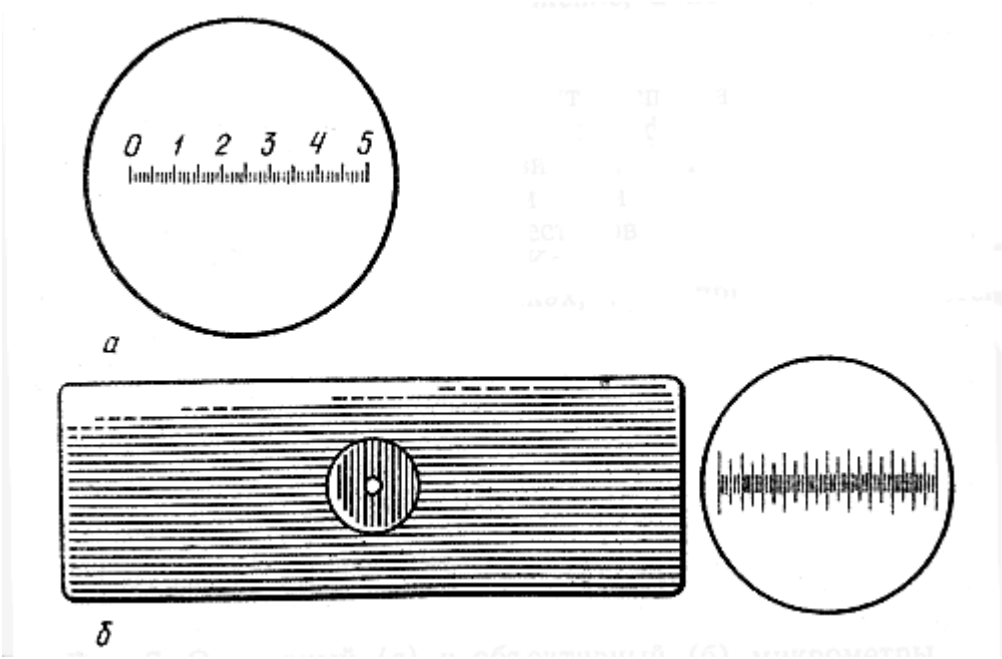
შეღებვა როგორც წესი შესაძლებელია "ანაბეჭდი"-ს და "გაჭყლეტილი წვეთი"-ს, პრეპარატების დამზადებისას აუცილებლად გასათვალისწინებელია, რომ საკვლევი კულტურის ასაკი, საკვები არე და კულტივირების პირობები მნიშვნელოვნად მოქმედებს მიკროორგანიზმების მორფოლოგიასა და ციტოლოგიაზე.

მიკროორგანიზმთა უჯრედების ზომის განსაზღვრა

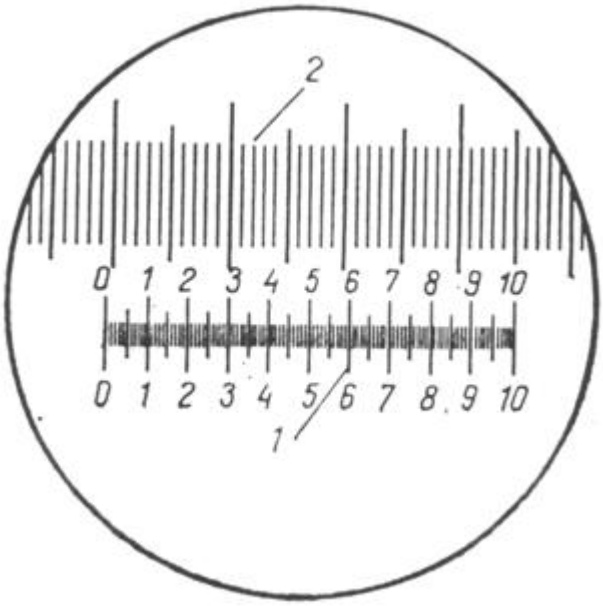
მიკროორგანიზმების ზომას საზღვრავენ მიკროსკოპის ქვეშ ოკულარის ან ობიექტივის მიკრომეტრის გამოყენებით. გასაზომად უკეთესია ცოცხალი უჯრედების გამოყენება, რადგან ფიქსაცია და შეღებვა იწვევს მათი ზომებისა და ფორმის მეტ-ნაკლებ ცვლილებას. ზომების დასადგენად ხელსაყრელია ფაზ-კონტრასტული მოწყობილობის გამოყენება, თუ უჯრედები ძალიან მოძრავია შესაძლებელია პრეპარატის ოდნავი შეთბობა ან გამლღვალი აგარის წვეთის დამატება. უჯრედების საზომი ერთეულია მიკრომეტრი (მკმ).

ოკულარის მიკრომეტრი არის მრგვალი მინის ფირფიტა, რომლის ცენტრშიც მდებარეობს სახაზავი. სახაზავი დაყოფილია 50 ნაწილად. ოკულარიდან ამოაქვთ თვალის ლინზა და მის ნაცვლად ჩაახრახნიან ოკულარ-მიკრომეტრს. მისი საშუალებით უჯრედის ზომის დადგენა შეუძლებელია, მანამ სანამ არ გვეცოდინება მისი თითოეული დანაყოფის "ფასი", რისთვისაც გამოიყენება ობიექტივის მიკრომეტრი.

ობიექტივის მიკრომეტრი – მეტალის ფირფიტა, შუაში თავისუფალი სივრცით. ამ სივრცეში მოთავსებულია 1მმ სახაზავი. ის დაყოფილია 100 ნაწილად, ანუ მისი დანაყოფები შეესაბამება 0.01მმ-10მკმ (სურათი). ოკულარული მიკრომეტრის თითოეული დანაყოფის "ფასის" დასადგენად, ობიექტივის მიკრომეტრს ათავსებენ მიკროსკოპის სასაგნე მაგიდაზე და აფიქსირებენ მცირე გადიდების ქვეშ. შემდეგ ობიექტივის მიკრომეტრის და ოკულარის მიკრომეტრის გადიდებები მოჰყავთ შასაბამისობაში, და აკვირდებიან ობიექტივის მიკრომეტრის ერთ დანაყოფს ოკულარის მიკრომეტრის რამდენი დანაყოფი შეესაბამება, თუ მაგ.: ობიექტ - მიკრომეტრის ორ დანაყოფს შეესაბამება ოკულარ-მიკრომეტრის ხუთი დანაყოფი, ე.ი. ოკულარ-მიკრომეტრის ერთი დანაყოფის შეესაბამება - 4მკმ (20/5) (სურათი). ამის შემდეგ სასაგნე მაგიდაზე ათავსებენ საკვლევ პრეპარატს და ითვლიან ოკულარ-მიკრომეტრის დანაყოფების რაოდენობას, რომელსაც შეესაბამება მიკრობული უჯრედი, და ამ რაოდენობას ამრავლებენ დანაყოფის "ფასზე" ანუ ობიექტივ-მიკრომეტრთან შესაბამისობაში მყოფ ზომაზე მკმ-ში. მონაცემთა სიზუსტისათვის აუცილებელია 20-30 უჯრედის გაზომვა. მრგვალი ფორმის უჯრედების გაზომვისას საზღვრავენ დიამეტრს, ხოლო სხვა ფორმების შემთხვევაში სიგრძესა და სიგანეს. მიუთითებენ უჯრედების საშუალო ზომას და ვარირების საზღვრებს ანუ მაქსიმალურ და მინიმალურ მონაცემებს.



სურათი. ოკულარის (ა) და ობიექტივის მიკრომეტრი (ბ)



სურათი. ოკულარის მიკრომეტრის დანაყოფის „ფასის“ განსაზღვრა

1. ოკულარ-მიკრომეტრის სახაზავი;
2. ობიექტივ-მიკრომეტრი.

თავი 5. მიკროორგანიზმთა კვლევის ციტოქიმიური მეთოდები

მიკროორგანიოზმთა უჯრედების შეღებვა გრამის მეთოდით; გრამის მიხედვით შეღებვის ტექნიკა; გრამის მეთოდი სინევის მოდიფიკაციით; გრამის მეთოდი კალინის მოდიფიკაციით; საღებავები და რეაქტივები გრამის წესით შეღებვისათვის.

მიკრობული უჯრედი – რთული ცოცხალი სისტემა, რომელიც ხასიათდება მასში შემავალი სტრუქტურების მაღალი მოწესრიგებულობით. თითოეულ სტრუქტურას გააჩნია თავისი ფუნქცია, მათი ურთიერთქმედება კი უზუნველყოფს უჯრედის, როგორც ერთი მთლიანის ფუნქციონირებას.

შიდაუჯრედული სტრუქტურების შესასწავლად იყენებენ სპეციალურ შეღებვის მეთოდებს - კვლევის ციტოქიმურ მეთოდებს. ფორმის მიხედვით მიკროორგანიზმთა უჯრედები არ გამოირჩევა დიდი მრავალფეროვნებით და ხშირად, იმისათვის რომ მივაკუთვნოთ საკვლევი ორგანიზმი ამა თუ იმ სისტემატიკურ კატეგორიას აუცილებელია უჯრედების და მასში შემავალი სტრუქტურებისა და ნივთიერებების შეღებვა.

მიკროორგანიზმთა უჯრედების შეღებვა გრამის მეთოდით

მიკრობული უჯრედების დიფერენციალური შეღებვის ეს მეთოდი ეყრდნობა განსხვავებებს უჯრედის კედლის აგებულებაში. მეთოდის არსი იმაში მდგომარეობს, რომ ზოგიერთი სახეობის უჯრედში იოდსა და ფუძე საღებავს შორის წარმოიქმნება სპირტში უხსნადი ნაერთები, ხოლო დანარჩენებში ეს ნაერთები წარმოიქმნება, მაგრამ დროებით და სპირტით დამუშავებისას გამოირეცხება, იშლება. პირველი ჯგუფის მიკროორგანიზმებს ეწოდება – გრამდადებითი, მეორეს - გრამ უარყოფითი.

გრამის მიხედვით შეღებვის ტექნიკა-კარგად გაუცხიმოვნებულ სასაგნე მინაზე დააქვთ მიკროორგანიზმთა საკვლევი კულტურების სამი ნაცხი (მათ შორის ორი-საკონტროლოა, წინასწარ ცნობილი შედეგებით გრამის წესით შეღებვის მიმართ). ნაცხს აშრობენ ჰაერზე და აფიქსირებენ სპირტქურის ალზე, შემდეგ ღებავენ 1წთ გენციანვიოლეტის ფენილის ხსნარით (ან კრისტალური იისფერით), სასაგნე მინა უკავიათ ოდნავ დახრილ მდგომარეობაში. შემდეგ საღებავს გადაასხამენ, და პრეპარატზე დააქვთ ლუგოლის ხსნარი, აჩერებენ 1წთ (ნაცხის გაშავებამდე), შემდეგ პრეპარატს ამუშავებენ 96% სპირტით მუდმივი ნჯღრევის პირობებში 15-20წმ, ძალიან მნიშვნელოვანია ექსპოზიციის ხანგრძლივობის სიზუსტის დაცვა, პრეპარატის წყლით გარეცხვის შემდეგ მას ღებავენ ფეიფერის ფუქსინით 1წთ განმავლობაში და რეცხავენ გამდინარე წყლით. ასეთი დამუშავების შემდეგ გრამდადებითი მიკროორგანიზმები იძენს მუქ იისფერს, ხოლო გრამუარყოფით-ჟოლოსფერს (ფუქსინის ფერი).

გრამის წესით შეღებვის შედეგები დამოკიდებულია კულტურის ასაკზე, გადაბერებული კულტურის მკვდარი უჯრედები ყოველთვის გრამუარყოფითად იღებება. ამიტომ შესაღებად სასურველია შეირჩეს ახალგაზრდა, ერთდღიანი კულტურები. ზოგიერთი ბაქტერია (პროტეები) იღებება გრამვარიაბელურად, ანუ ნაწილი უჯრედებისა გრამდადებითად, ნაწილი-გრამუარყოფითად.

გრამის მეთოდი სინევის მოდიფიკაციით.

ფიქსირებულ ნაცხზე აფარებენ ფილტრის ქაღალდის 3მმ სიფართის ზოლს, რომელიც წინასწარ გაჟღენთილია 1% კრისტალური იისფერის სპირტხსნარით და

გამშრალია. ქაღალდზე დააქვთ 2-3 წვეთი წყალი, აჩერებენ პრეპარატს 2-3წთ. შემდეგ შეღებვა გრძელდება ზევით აღწერილი თანმიმდევრობით.

გრამის მეთოდი კალინის მოდიფიკაციით

სასაგნე მინაზე დააქვთ მცირე რაოდენობის დისტილირებული წყალი და მასში ათავსებენ საკვლევი უჯრედების მინიმალურ რაოდენობას, უმატებენ 0.5% კრისტალური იისფერის სპირტხსნარს. სუსპენზიას თანაბრად ანაწილებენ 1სმ^2 ფართობზე, აშრობენ და აფიქსირებენ ერთჯერადი გადატარებით სპირტქურის ალზე. ამის შემდეგ პრეპარატს 1წთ განმავლობაში ამუშავებენ რეაქტივით, რომელიც შეიცავს 10მლ 5% ფეიფერის ფუქსინს, 10მლ 10% იოდის ხსნარს, 10მლ აცეტონს და 70მლ 0.52% კალიუმის იოდიტის ხსნარს. პრეპარატს შემდეგ წამით ათავსებენ 96% ეთილის სპირტში და სწრაფად აშრობენ ფილტრის ქაღალდით.

1. საღებავები და რეაქტივები გრამის წესით შეღებვისათვის:
2. გენციანვიოლეტის ფენოლური ხსნარი:
3. გენციანვიოლეტი – 1 გრ, სპირტი 96% -10 მლ, კრისტალური ფენოლი – 2 გრ, დისტილირებულ წყალი – 100 მლ.
4. ზოგჯერ იყენებენ გენციანვიოლეტის სპირტხსნარს - გენციანვიოლეტი (ან კრისტალური იისფერი) - 1გრ, სპირტი 96% (რექტიფიკატი) -100 მლ, გლიცერინი- 5 მლ. ბოთლს ასეთი ხსნარით ათავსებენ თერმოსტატში 24სთ-ით, შემდეგ ფილტრავენ.
5. ლუგოლის ხსნარი: (კალიუმის იოდიტი-2გრ, იოდი კრისტალური -1 გრ, წყალი დისტილირებული – 300 მლ). საწყისად ამზადებენ კალიუმის იოდიტის კონცენტრირებულ ხსნარს 5 მლ წყალში, მასში ხსნიან იოდს, შემდეგ უმატებენ 300 მლ წყალს.
6. სპირტი 96 %.
7. ფეიფერის ფუქსინი-ცილის კარბოლური ფუქსინის წყალხსნარი: 1მლ ცილის კარბოლური ფუქსინი და 9მლ დისტილირებული წყალი.

თავი 6. ბაქტერიების მჟავემედეგობის განსაზღვრა ცილ-ნილსენის მეთოდით

სპორების შეღებვა; ცილ-ნილსენის მეთოდი მიულერის მოდიფიკაციით; პეშკოვის მეთოდი; კაფსულების შეღებვა; კაფსულების შეღებვა გინსის მეთოდით; შოლტების შეღებვა; ლეფლერის მეთოდი; მოროზოვის მეთოდი; ბაქტერიების ბირთვული ნივთიერების შეღებვა; რომანოვსკი-გიმზის მეთოდი; ფელგენის მეთოდი; ომელიანსკის მეთოდით ვოლუტინის (მეტაქრომატინული გრანულების) შეღებვა; გლიკოგენის შეღებვა; გრანულოზის შეღებვა; ცხიმების შეღებვა.

მჟავემედეგობა არის თვისება, რომელიც ძირითადად ახასიათებს მიკობაქტერიებს და ზოგიერთ აქტინომიცეტებს. ის დაკავშირებულია უჯრედის კედლის ქიმიურ შემადგენლობასთან, კერძოდ მასში მიკოლის მჟავის არსებობასთან. მჟავემედეგობა ვლინდება უჯრედების მიერ საღებავების რთულ აღქმაში, შეღებვისას კი – მათ მჭიდრო მიერთებაში.

სპირტქურის ალზე პრეპარატის ფიქსაციამდე, ის მზადდება კლასიკური მეთოდით (იხ. თავი---). ფიქსირებისა და გაცივების შემდეგ პრეპარატზე ათავსებენ საშრობი ქაღალდის ზოლს, რომელსაც გაჟღენთავენ ცილის კარბოლური ფუქსინით და აცხელებენ ცეცხლის ალზე 5წთ. არ უნდა დაუშვათ პრეპარატის გამოშრობა, აუცილებლობის შემთხვევაში შესაძლებელია წყლის 1-2წვეთის დამატება, ასევე არ შეიძლება საღებავის დუღილის კონდიციამდე მიყვანა, როგორც კი ჩნდება ორთქლი პრეპარატს აშორებენ ცეცხლის ალს. პრეპარატის შეღებვისა და გაგრილების შემდეგ მას აცილებენ საშრობ ქაღალდს, ხოლო ნაცხს რეცხავენ გამდინარე წყლის სუსტ ჭავლში, წყლის გაუფერულებამდე. პრეპარატს აშრობენ საშრობი ქაღალდით და ჩაძირავენ 3-5 წამით 5% H_2SO_4 ან 3% HCl ხსნარში. კვლავ რეცხავენ წყლით, აშრობენ საშრობით და ღებავენ 3-5წთ ლეფლერის მეთილენის ლურჯით. მჟავემედეგი ბაქტერიები იღებება წითლად, ხოლო არამედეგი –ლურჯად.

საღებავები და რეაქტივები მჟავემედეგი ბაქტერიების შესაღებად.

1. *ცილის კარბოლური ფუქსინი. ფუძე ფუქსინი -1 გრ, კრისტალური კარბოლის მჟავა (ფენოლი) – 5 გრ, სპირტი 96% - 10მლ. გლიცერინი – რამოდენიმე წვეთი, დისტილირებული წყალი – 100 მლ. ფუძე ფუქსინი იხსნება ეთანოლში და ემატება წყალში გახსნილი ფენოლი, ხსნარს კარგად ურევენ და ტოვებენ რამოდენიმე დღით. გამოყენებამდე ხსნარი უნდა გაიფილტროს.*
2. *ლეფლერის მეთილენის ლურჯი: 30მლ მეთილენის ლურჯის გაჯერებულ სპირტხსნარს შეურევენ 100 მლ 0.01% KOH. მეთილენის ლურჯის გაჯერებული სპირტხსნარი მზადდება შემდეგნაირად: 1.6 გრ მეთილენის ლურჯი იხსნება 100 მლ 96% ეთანოლში.*
3. *გოგირდმჟავას 5 % ხსნარი ან მარილმჟავას 3 % ხსნარი.*

სპორების შეღებვა

ბაქტერიების სპორები ვეგეტატიურ უჯრედებთან შედარებით უარყოფითი საარსებო გარემო პირობების მიმართ მაღალი მდგრადობით ხასიათდება. ეს არის მრგვალი, ოვალური ან ელოფსოიდური ფორმის წარმონაქმნები, თუ სპორის დიამეტრი არ აღემატება უჯრედის დიამეტრს, რომელშიც ის წარმოიქმნება, ასეთ უჯრედს **ბაცილარული** ეწოდება. თუ აღემატება, მაშინ სპორის უჯრედში განლაგების

მიხედვით ცენტრში თუ ბოლოებში, ამ უჯრედს უწოდებენ შესაბამისად **კლასტრიდიალურს** (ცენტრში) და **პლექტრიდიალურს** (ბოლოებში). ბაცილარულ უჯრედში სპორა შეიძლება განლაგდეს ცენტრში - ცენტრალურად, ბოლოში - ტერმინალურად ან ერთ-ერთ ბოლოსთან ახლოს-სუბტერმინალურად.

სპორები მჟავემედეგი სტრუქტურებია, ამიტომ რთულად იღებება, ეს აიხსნება სპორის გარსის სიმკვრივით, მასში თავისუფალი წყლის მცირე რაოდენობით და ლიპიდების მაღალი შემცველობით. მარტივი ან გრამის წესით შეღებილ პრეპარატებში სპორები რჩება შეუღებავი.

სპორების გარსის დაბალი განვლადობის გამო, მათი შეღებვის საწყის ეტაპზე იყენებენ ქიმიურ ნივთიერებებს, რომელიც ცვლის მათ გარსს. შემდგომი შეღებვისას იღებება, როგორც სპორა ასევე უჯრედის ციტოპლაზმა, რაც ხელს უშლის მიკროსკოპირებას, ამიტომ აუცილებელია შეღებვის შემდეგ უჯრედების ნაწილობრივი გაუფერულება, ციტოპლაზმიდან საღებავის გამოსადევნად, რათა შეღებილი დარჩეს მხოლოდ სპორა. საწყის ეტაპზე სპორები მუშავდება სხვადახვა ქიმიური ხსნარებით: ქრომმჟავა, მარილმჟავა, გოგირდმჟავა, ძმარმჟავა, ან წყალბადის ზეჟანგი, შემდგომ უჯრედი იღებება სპორასთან ერთად, ბოლოს ხდება ციტოპლაზმის გაუფერულება და სპორის შეღებვა დამატებით კონტრასტული საღებავით.

ცილ-ნილსენის მეთოდი მიულერის მოდიფიკაციით.

მიულერმა ცილ-ნილსენის მიერ ბაქტერიების მჟავემედეგობის გამოსავლენი მეთოდის მოდიფიკაციის გზით სპორების შეღებვის ახალი მეთოდი შეიმუშავა.

ნაცხის ფიქსაციამდე სპირტქურის ალზე პრეპარატი მზადდება კლასიკური მეთოდით. შემდეგ ცეცხლის ალზე ფიქსირებულ და გაგრილებულ პრეპარატზე დააქვთ ქრომის მჟავის 5% ხსნარი. 5-10 წუთიანი ექსპოზიციის შემდეგ ჩამორეცხავენ წყლით. პრეპარატს აფარებენ საშრობი ქაღალდის ზოლს და ჟღენთავენ ცილის კარბოლური ფუქსინით. პრეპარატს აცხელებენ ცეცხლის ალზე ოთქლის გაჩენამდე (არ მიყავთ დუღილამდე), ამატებენ საღებავის ახალ პორციას. ეს პროცედურა ტარდება 7 წთ განმავლობაში. მნიშვნელოვანია, რომ საღებავი აორთქლდეს, მაგრამ ქაღალდი არ გამოშრეს. გაგრილების შემდეგ საშრობ ქაღალდს აცლიან პრეპარატს, რეცხავენ გამდინარე წყლით და აშრობენ სუფთა საშრობით. ამის შედეგად უჯრედები თანაბრად იღებება. შემდეგ აუცილებელია უჯრედის ციტოპლაზმის გაუფერულება, ამისათვის პრეპარატს ამუშავებენ 1% მარილმჟავას ან გოგირდმჟავას ხსნარით 15-30წმ. დროის ხანგრძლივობის გადამეტების შემთხვევაში უფერულდება სპორაც, გამონაკლისია ***Bacillus mycoides*** და ***Bacillus mesentericus*** (ექსპოზიცია - 16-18წმ). შემდეგ პრეპარატი ირეცხება წყლით და 2 წუთის განმავლობაში იღებება მეთილენის ლურჯით.

თუ მეთოდოლოგია სწორად არის დაცული, ციტოპლაზმის ცისფერ ფონზე მკვეთრად გამოჩნდება წითელი ფერის სპორები.

პეშკოვის მეთოდი.

ცეცხლის ალზე ფიქსირებულ პრეპარატს უმატებენ ლეფლერის მეთილენის ლურჯს, მიყავთ ადუღებამდე და ადუღებენ 15-20წმ სასაგნე მინის ცეცხლის ალზე დაჭერით. ნაცხს რეცხავენ გამდინარე წყალში და ღებავენ 20-30წმ 0.5% ნეიტრალური წითელის წყალხსნარით, კვლავ რეცხავენ, აშრობენ და პრეპარატს იკვლევენ

იმერსიული ობიექტივის გამოყენებით. სპორები იღებება ცისფრად ან ლურჯად, ციტოპლაზმა-ვარდისფრად.

სპორების შესასწავლი ოპტიმალური ობიექტებია: ***Bacillus mycoides, Bacillus mesentericus*** ოთხდღიანი კულტურები.

ბაქტერიების სპორების შესაღები რეაქტივები.

1. *ცილის კარბოლური ფუქსინი;*
2. *ლეფლერის მეთილენის ლურჯი;*
3. *მეთილენის ლურჯის გაჯერებული წყალხსნარი 2 გრ საღებავი და 100 მლ დისტილირებულ წყალი;*
4. *ქრომის მჟავა 5 %ხსნარი;*
5. *მარილმჟავა ან გოგირდმჟავა 1% ხსნარი.*

კაფსულების შეღებვა

მიკროორგანიზმების უჯრედები შეიძლება გარშემორტყმული იყოს კაფსულებით, განსაკუთრებით ნახშირწყლებით მდიდარ საკვებ არეებზე ზრდისას. ამ სტრუქტურებს გააჩნიათ გელის კონსისტენცია და ცუდად ჩანს ცოცხალი უჯრედების მიკროსკოპირებისას. კაფსულების ქიმიური შემადგენლობით მიკროორგანიზმები განსხვავდება ერთმანეთისაგან, ამიტომ მათი გამოვლენა შეღებვის რომელიმე ერთი მეთოდით ხშირად შეუძლებელია. ასევე, კაფსულები შეღებვისას ადვილად დეფორმირდება, მის შემადგენლობაში შემავალი ნივთიერებები კი ძნელად იერთებს საღებავს. ის ადვილად სცილდება პრეპარატს გარეცხვისას. კაფსულების შესაღებად იყენებენ "ნეგატიური" (ნეგატიური კონტრასტირება) შეღებვის მეთოდს თხევადი ტუშის გამოყენებით. ამისათვის მიკროორგანიზმთა უჯრედების მცირე რაოდენობა მარყუჟით გადააქვთ განზავებული ფუქსინის წვეთში, უმატებენ ტუშის წვეთს, აფარებენ საფარ მინას და ათვალიერებენ ×40 გადიდებაზე. პრეპარატის საერთო ბნელ ფონზე კარგად ჩანს უფერული კაფსულები, რომლებიც გარს ეკვრის ვარდისფრად შეღებილ უჯრედებს.

კაფსულების შეღებვა გინსის მეთოდით.

სასაგნე მინის ბოლოზე აწვეთებენ ტუშს და შეაქვთ მასში მიკროორგანიზმთა უჯრედები. კარგად ანაწილებენ და საფარი მინის კიდით სასაგნე მინის მთელ ზედაპირზე აკეთებენ ნაცხს, აშრობენ ოთახის ტემპერატურაზე, 5-10წთ აფიქსირებენ ნიკიფოროვის ხსნარში ან 3წთ აბსოლუტურ მეთანოლში, შემდეგ ნაცხს ღებავენ ცილის კარბოლური ფუქსინის წყალხსნარით (თანაფარდობა 1/3), შეღებვის ხანგრძლივობა 2-3წთ, შემდეგ პრეპარატს რეცხავენ გამდინარე წყლით, აშრობენ ჰაერზე და ახდენენ მიკროსკოპირებას იმერსიული სისტემის გამოყენებით. პრეპარატის მუქ ნაცრსფერ ფონზე კონტრასულად ჩანს ვარდისფერი ან ჟოლოსფერი უჯრედები, გარშემორტყმული უფერული კაფსულებით.

კაფსულების შეღებვის ბურის მეთოდი არის უფრო მარტივი და გინსის მეთოდის მსგავსად ითვალისწინებს ტუშით ნაცხის გაკეთებას, მხოლოდ მიკროსკოპირება ხდება ყოველგვარი ფიქსაციის გარეშე, შედეგი იგივეა.

კაფსულების გამოსაკვლევად ოპტიმალურია აზოტობაქტერის კულტურები

ტუშის მომზადება:

ტუშისა და წყლის ხსნარს თანაფარდობით 1:9 ურევენ და ასტერილებენ 1 ატმ 30წთ ბამბის საცობიან სინჯარებში. სტერილიზაციის ნაცვლად ტუშს შეიძლება

დავუმატოთ რამოდენიმე წვეთი ფორმალინი. ასეთი სახით მომზადებულ ტუშს აყოვნებენ 2 კვირა, სანამ ხსნარი არ დაიწმინდება და შერეული ნაწილაკები არ დაილექება ჭურჭლის ფსკერზე. პრეპარატის მოსამზადებლად იყენებენ ხსნარის მხოლოდ ზედა ნაწილს.

შოლტების შეღებვა

მიკროორგანიზმთა შოლტები 002-0.04მკმ თხელი წარმონაქმნებია, რომლებიც უჯრედის დამუშავებისას ადვილად სცილდება, რაც მათ გამოკვლევებს აძნელებს. შოლტების შეღებვის საფუძველია მათი ქიმური დამუშავება, რაც ზრდის ამ სტრუქტურების მოცულობას.

საკვლევი კულტურის მოსამზადებლად აუცილებელია რამოდენიმე დღე ზედიზედ მისი ყოველდღიური გადათესვა ახალ საკვებ არეზე (თხევადზე). კვლევის ჩატარების დღეს, მარყუჟით იღებენ საკვლევ მასალას და გადააქვთ სინჯარაში, რომელშიც ასხია 5-6მლ 37°C გამთბარი ონკანის წყალი. შერევა არ არის რეკომენდირებული, ბაქტერიალური მასა თავისთავად უნდა გაიშალოს წყალში 30-60წუთის განმავლობაში.

სამუშაოს დაწყებამდე აუცილებელია დავაკვირდეთ უჯრედების მოძრაობას "ჩაკიდული წვეთის" პრეპარატში. მოძრაობის არარსებობის შემთხვევაში სინჯარას დგამენ თერმოსტატში 1 $^{1}/_{2}$-2 დღით.

პრეპარატის მოსამზადებლად აუცილებელია აბსოლუტურად სუფთა სასაგნე მინები. ამისათვის მათ ხარშავენ კალიუმის ბიქრომატის ხსნარში, შემდეგ ორჯერადად რეცხავენ NaOH ხსნარში, შემდეგ ავლებენ წყალს და ინახავენ 96% სპირტში. გამოყენებამდე, სასაგნე მინის იმ მხარეს, რომელზეც მოთავსდება პრეპარატი ძლიერად ახურებენ და შემდეგ აგრილებენ.

ლეფლერის მეთოდი. ბაქტერიების 12-16 საათიანი კულტურა გადააქვთ სასაგნე მინაზე და აშრობენ ოთახის ტემპერატურაზე, დასაშვებია ნაცხის გაშრობა სპირტქურის ალზე სწრაფი გადატარებით. შემდგომ პრეპარატს ამუშავებენ პრატრავიტელით 3-5 წთ, ახურებენ რამ მას ორთქლის გამოჩენამდე, ან 15-20 წთ აყოვნებენ ოთახის ტემპერატურაზე, შემდეგ რეცხავენ გამდინარე წყლის ძლიერი ჭავლით 30 წმ და აშრობენ ჰაერზე.

პრეპარატს ღებავენ ცილის კარბოლური ფუქსინით 3-4წთ ან, ხსნარით, რომელიც შეიცავს 1 წილ გაჯერებული ფუქსინის ხსნარს და 10 წილ წყალს ოდნავი შეთბობით, ორთქლის წარმოქმნამდე. შემდეგ პრეპარატს რეცხავენ წყლით, აშრობენ და იკვლევენ იმერსიული სისტემის გამოყენებით. ბაქტერიების უჯრედები და შოლტები იღებება ვარდისფრად.

პრატრავიტელის მომზადება; 12გრ ტანინი იხსნება შეთბობით 48მლ წყალში, ემატება 30 მლ $FeSO_4$ გაჯერებული წყალხსნარი და 6 მლ ფუქსინის გაჯერებული სპირტხსნარი (96% სპირტში). ხსნარი მზადდება გამოყენებამდე რამოდენიმე დღით ადრე, ინახება ბნელ ადგილას, შლიფიან კოლბაში. გამოყენებადმე იფილტრება.

მოროზოვის მეთოდი

მზადდება სამი რეაქტივი:

I-1მლ ყინულოვანი ძმარმჟავა, 2 მლ ფორმალინი, 100 მლ დისტილირებული წყალი;

II-5 გრ ტანინი, 1 მლ თხევადი კარბოლის მჟავა (ფენოლი), 100 მლ დისტილირებული წყალი;

III – 5 გრ კრისტალური ვერცხლის ნიტრატი ($AgNO_3$), 100 მლ დისტილირებული წყალი.

80 მლ ვერცხლის ხსნარს წვეთებად ემატება ამიაკის წყალხსნარი წარმოქმნილი ნალექის საბოლოო გასხნამდე. თუ ამიაკი ზედმეტი იქნა, მაშინ დარჩენილი 20 მლ ვერცხლის ხსნარიდან ვუმატებთ რამოდენიმე წვეთს, ოპალესცენციის გამოჩენამდე.

შოლტების შესაღებად ვერცხლის მიღებული ხსნარი იხსნება დისტილირებულ წყალში 1:100 თანაფარდობით.

შეღებვის ტექნიკა შემდეგში მდგომარეობს: 1წთ განმავლობაში პრეპარატს ასხამენ I რეაქტივს, გადაღვრიან, რეცხავენ ონკანის წყლით, უმატებენ II რეაქტივს, ათბობენ სუსტ ცეცხლის ალზე 1 წთ ორთქლის წარმოქმნამდე, რეცხავენს წყლით, შემდეგ შეთბობის პირობებში უმატებენ III რეაქტივს 1-2 წთ მუქი ყავისფერი შეფერილობის გამოჩენამდე, რეცხავენ წყლით აშრობენ და ათვალიერებენ მიკროსკოპში იმერსიის გამოყენებით.

ბაქტერიების ბირთვული ნივთიერების შეღებვა

ციტოქიმიური კვლევებისას გენომის არსებობაზე საუბრობენ დნმ-ზე თვისობრივი რეაქციის საშუალებით.

რომანოვსკი-გიმზის მეთოდი. ამ მეთოდით პროკარიოტულ უჯრედებში ერთდროულად იკვლევენ გენომს და ვოლუტინს. საწყისად პრეპარატს აფიქსირებენ 5 წთ მეთილის სპირტში ან კარნუას ფიქსატორში. უკანასკნელ შემთხვევაში ძმარმჟავას კვალის წასაშლელად პრეპარატს რეცხავენ სპირტით და აშრობენ ჰაერზე. ღებავენ რომანოვსკი-გიმზის საღებავით ერთი დღე-ღამის განმავლობაში, შემდეგ ავლებენ სუსტ ტუტე რეაქციის მქონე წყალს (PH-7.2), აშრობენ და აკვირდებიან მიკროსკოპში. გენომი იღებება წითელ – იისფრად, ციტოპლაზმა – ღია ვარდისფრად.

საღებავები: კარნუას საღებავი შეიცავს აბსოლუტურ სპირტს, ქლოროფორმს, ყინულოვან ძმარმჟავას 6 : 3 : 1 თანაფარდობით. რომანოვსკი-გიმზის საღებავი. ქიმიური წარმოება უშვებს ხსნარს, რომელიც შეიცავს აზურს (ორგანული საღებავი, მიიღება მეთილენის ლურჯისაგან), ეოზინს და მეთილენის ლურჯს. უშუალო გამოყენებამდე 10მლ დისტილირებულ წყალს (PH-7.2) უმატებენ საღებავის 10 წვეთს.

ფელგენის რეაქცია.

მას იყენებენ დნმ შესაღებად. ნუკლეოპროტეიდების სუსტ მჟავე ჰიდროლიზს მივყავართ პურინული და პირიმიდინული ფუძეების გამოთავისუფლებამდე დეზოქსირიბოზისაგან. ჰიდროლიზისას დეზოქსირიბოზა გარდაიქმნება ß-ჰიდროქსილევულინის ალდეჰიდად, რომელიც ურთიერთქმედებს ფუქსინგოგირდმჟავას გოგირდოვან ნაწილთან, გამოყოფს რა წითელი ფერის ფუქსინს. შედეგად გენომი იღებება.

საკვლევი ბაქტერიების პრეპარატები მუშავდება კარნუას ფიქსატორით 5 წთ, ირეცხება აბსოლუტური სპირტით, შემდეგ ხდება ჰიდროლიზი 1N HCl,

60°C გახურებით, შემდეგ პრეპარატი თავსდება 1-2 წთ 1N HCl ცივ ხსნარში და გადააქვთ ფუქსინგოგირდმჟავაში (შიფის რეაქტივი) 3-4 სთ. პრეპარატი

თანმიმდევრულად ირეცხება სამ კიუვეტაში, რომელშიც ასხია გოგირდოვანი წყალი 20-20წთ, შემდეგ ირეცხება დისტილირებული წყლით. შრება და ხდება მიკროსკოპირება. გენომი იღებება იისფრად.

მიკროორგანიზმთა უჯრედის ჩანართები-ნივთიერებები, რომელიც წარმოიქმნება უჯრედის მეტაბოლიზმის შედეგად.

ომელანსკის მეთოდით ვოლუტინის (მეტაქრომატინული გრანულები) შეღებვა

ვოლუტინი - პოლიფოსფატი, სამარაგო ფოსფატი და ნმ წარმოებული აზოტშემცველი ნივთიერება, ახასიათებს მსგავსება ფუძე საღებავებთან და მეტაქრომაზია ანუ საღებავისაგან განსხვავებული ფერის მიღების უნარი.

მეთოდი ეყრდნობა ვოლუტინის თვისებას ცუდად გაიხსნას მჟავე ხსნარებში. გაუცხიმოვნებულ სასაგნე მინაზე დააქვთ ბაქტერიების თხელი ნაცხი, აშრობენ ჰაერზე, აფიქსირებენ სპირტქურის ალზე და ღებავენ ცილის კარბოლური ფუქსინით, 0.5-1 წთ შემდეგ პრეპარატი ირეცხება წყლით, უფერულდება 1% H_2SO_4 ხსნარით, კვლავ ირეცხება, დამატებით იღებება მეთილენის ლურჯით (1 : 40) 30წმ, ირეცხება, შრება საშრობი ქაღალდით, და მიკროსკოპირდება იმერსიული სისტემის გამოყენებით. ვოლუტინის გრანულები იძენს წითელ ფერს ლურჯი ციტოპლაზმის ფონზე.

ასევე შესაძელებლია ფიქსირებული პრეპარატები შეიღებოს 10-30 წმ ლეფლერის მეთილენის ლურჯით ან 1% ტოლუიდინის ლურჯით, შემდეგ გაირეცხოს წყლით, დაშრეს საშრობი ქაღალდით. ასეთ პრეპარატს მიკროსკოპირებისას გააჩნია ლურჯი-იისფერი (მეთილენის ლურჯის შემთხვევაში) ან წითელი, ცისფერი ციტოპლაზმის ფონზე (ტოლუიდინის ლურჯის შემთხვევაში).

გლიკოგენის შეღებვა. გლიკოგენი - ნახშირწყალი, ცხოველური სახამებელი. გვხვდება როგორც ეუკარიოტებში, ასევე პროკარიოტებში. ხშირად ის გროვდება ბაცილების და საფუვრების უჯრედებში.

სუფთა სასაგნე მინაზე დააააქვთ მიკროორგანიზმთა სუსპენზიის წვეთი და მას უმატებენ იგივე რაოდენობის I_2 ხსნარს KI-ში (7გრ I_2 და 20 გრ KI იხსნება 100-300მლ დისტილირებულ წყალში). ზევიდან აფარებენ საფარ მინას, ზედმეტ სითხეს გვერდებიდან აცილებენ ფილტრის ქაღალდით. პრეპარატს ათვალიერებენ იმერსიის გამოყენებით. გლიკოგენის შეფერილობა ვარირებს ღია ყვითელიდან - მუქ ყავისფერამდე.

გლიკოგენის გამოსავლენად ოპტიმალურია ***Sacharomyces cerevisiae*** და ***Bacillus mycoides*** 1-2 დღიანი კულტურები.

გრანულოზის შეღებვა. გრანულოზა-ნახშირწყალი, გვხვდება მხოლოდ პროკარიოტებში და მხოლოდ ერბომჟავადუღილის ბაქტერიებში ***Clostridium butyricum*** სპორაწარმოქმნის სტადიის წინა პერიოდში.

საკვლევი ბაქტერიის ერთ წვეთს სასაგნე მინაზე ემატება ერთი წვეთი ლუგოლის ხსნარი, იფარება საფარი მინით და დაკვირვება წარმოებს იმერსიული სისტემების გამოყენებით.

საკვლევ ობიექტად სასურველია გამოყენებულ იქნეს ერბომჟავა ბაქტერიის დაგროვებითი კულტურა. ამისათვის: მეცადინეობამდე 3-4 დღით ადრე სინჯარები 1/3 ივსება წვრილად დაჭრილი გაუთლელი კარტოფილით, ემატება ცარცი დანის წვერით და ბოლომდე ივსება ონკანის წყლით. სინჯარებს ათავსებენ წყლის აბაზანაზე 70 ^{o}C 10 წთ, შემდეგ აცივებენ და დგამენ თერმოსტატში 30°C.

პრეპარატის დასამზადებლად ამ სინჯარებიდან პიპეტით იღებენ სუსპენზიის ერთ წვეთს. გრანულოზა იღებება ლურჯ-იისფრად და ლოკალიზდება უჯრედის ერთ ბოლოზე.

ცხიმების შეღებვა. ცხიმს შეიცავს თითქმის ყველა სახეობის მიკროორგანიზმი, განსაკუთრებით დაბერებული კულტურები.

სასაგნე მინაზე დააქვთ 40% ფორმალინის წვეთი. მასში ბაქტერიოლოგიური მრყუჟით შეაქვთ მიკროორგანიზმთა კულტურა. ფორმალინი კლავს უჯრედებს და აფხვიერებს გარსს. 5 წუთის შემდეგ ამავე წვეთში შეაქვთ მეთილენის ლურჯი, 10 წუთის შემდეგ კი - სუდან III (ცხიმში სხნადი საღებავი, ცხიმების ინდიკატორი). მიღებული პრეპარატი იფარება საფარი მინით და მიკროსკოირდება იმერსიის გამყენებით.

უჯრედების ციტოპლაზმა იღებება ლურჯად, ცხიმოვანი ჩანართები-ნარინჯისფერად.

საკვლევი ობიექტები შეიძლება იყოს საფუვრები და ბაცილები.

მრავალი გრანულა, რომელიც იღებება სუდან III ან შავი სუდანით (0.3% ხსნარი 70% ეთანოლში), შეიცავს ß-ოქსიერბომჟავას. მის გამოსავლენად მზადდება 24 საათიანი კულტურის პრეპარატი. ნაცხი შრება ჰაერზე, ფიქსირდება სპირტქურის ალზე, იღებება შავი სუდანით 5-15წთ (საღებავის გაშრობას მნიშვნელობა არ აქვს). შემდეგ საღებავი ირეცხება წყლით, პრეპარატი შრება ფილტრის ქაღალდით და მუშავდება ქსილოლით, რამოდენიმეჯერ მასში პრეპარატიანი სასაგნე მინის ჩაძირვით. გაუფერულების დრო არ უნდა აღემატებოდეს 1 წთ. პრეპარატს დამატებით ღებავენ 0.5% საფრანინის წყალხსნარით 5-10წმ. პოლი-ß-ოქსიერბომჟავას ჩანართები გამოიყურება, როგორც მოშავო-მოლურჯო გრანულები ვარდისფერ ციტოპლაზმაში.

სუდან III- 0.1 გრ სუდან III იხსნება 200 მლ 96 % ეთანოლში ან კონცენტრირებულ რძემჟავაში.

თავი 7. მიკროორგანიზმები და კვება

საკვები არეების შერჩევის ძირითადი პრინციპები; საკვები არეები; დიფერენციალურ-დიაგნოსტიკური საკვები არეები; საკვები არეების მომზადება. ხორცპეპტონიანი ბულიონი (ხპბ); ხორცპეპტონიანი აგარი (ხპა); ხორცპეპტონიანი ჟელატინი (ხპჟ); კარტოფილის აგარი; ლუდის სუსლო და სუსლო აგარი; გაუცხიმოვნებული რძე; საფუვრიანი საკვები არეები; საფუვრის წყალი; საფუვრის ავტოლიზატი; საფუვრის ექსტრაქტი.

მიკროორგანიზმზთა კულტივირება არის მიკრობიოლოგიის ერთ-ერთი ძირითადი მეთოდი. ლაბორატორიულ პირობებში მათი კულტივირების ეფექტურობაზე მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული მიკრობთა შესწავლისა და პრაქტიკული გამოყენების წარმატებები. კულტივირება ეყრდნობა მიკროორგანიზმთა ფიზიოლოგო-ბიოქიმიურ თავისებურებებს და იმ გარემო პირობების ფიზიკო-ქიმიურ ასპექტებს, რომელიც აუცილებელია მათი სიცოცხლისუნარიანობისათვის.

საკვები არეების შერჩევის ძირითადი პრინციპები

ლაბორატორიულ პირობებში მიკროორგანიზმთა კულტივირებისას გამოყენებული საკვები არე უნდა შეიცავდეს ყველა კომპონენტს, რომელიც აუცილებელია ორგანიზმის ზრდა-განვითარებისათვის. მიკროორგანიზმთა კონსტრუქციული და ენეგეტიკული მეტაბოლიზმი ძალზე მნრავალფეროვანია, შესაბამისად ასევე მრავალფეროვანია მათი მოთხოვნები საკვები კომპონენტების მიმართ და აქიდან გამომდინარე მრავალფეროვანია საკვები არეები, რომელიც გამოიყენება ლაბორატოიულ პირობებში მათი კულტივირებისას. უნივერსალური საკვები არე, რომელიც ხელსაყრელია მიკროორგანიზმთა აბსოლუტური უმრავლესობის კულტივირებისათვის არ არსებობს.

კულტივირებისათვის საჭირო საკვები არეების ძირითადი კომპონენტებია-ნახშირბადი და აზოტი. სწორედ ეს კომპონენტები განსაზღვრავს საკვები არის სპეციფიურობას.

ნახშირბადის მიმართ დამოკიდებულების მიხედვით მიკროორგანიზმები იყოფა-ავტოტროფებად და ჰეტეროტროფებად. ავტოტროფები ნაშირბადის ერთადერთ წყაროდ იყენებს ნახშირორჟანგს, ვინაიდან მისი კონცენტრაცია ჰაერში არ აღემატება 0.03% და უჯრედში ამ ნაერთის დიფუზიის გზით მოხვედრილი რაოდენობა არ არის საკმარისი ავტოტროფების ნორმალური ცხოველმყოფელობისათვის, ამიტომ ავტოტროფების კულტივირებსათვის მომზადებულ საკვებ არეებში შეაქვთ ნატრიუმის ბიკარბონატი ($NaHCO_3$) ან კარბონატები, ძირითადად კალციუმის კარბონატი ($CaCO_3$). ზოგჯერ საკვებში შეჰყავთ 1-5% ნახშირორჟანგით გაჯერებული ჰაერი.

ჰეტეროტროფების მოთხოვნილებელი ვერ დაკმაყოფილდება მხოლოდ ნახშირორჟანგით, მათი განვითარებისათვის საკვები არე უნდა შეიცავდეს ნახშირბადის შემცველ ორგანულ ნაერთებს. ინდივიდუალური თავისებურებებიდან გამომდინარე მათ ესაჭიროებათ – მჟავები, სპირტები, ნახშირწყლები, არომატული ნაერთები. ასევე გასათვალისწინებელია, რომ ზოგიერთი სახეობის მიკროორგანიზმი მომთხოვნია ერთდროულად ნახშირბადის რამოდენიმე ორგანული წყაროს მიმართ

(***Pseudomonadaceae)***, ხოლო ზოგიერთი კი კონკრეტულად ერთ რომელიმე წყაროს მოითხოვს. მაგ.: მეთანდამჟანგველი ბაქტერიები ნახშირბადის წყაროდ გამოიყენებს მხოლოდ მეთანს და მეთანოლს.

საკვები არის მეორე მნიშვნელოვანი კომპონენტია აზოტი. ის შედის უჯრედის კომპონენტების შემადგენლობაში ძირითადად აღდგენილი სახით – ამინო ($-NH_2$) ან იმინო($-NH$)–ჯგუფების სახით. მიკროორგანიზმების დიდი ნაწილისათვის აზოტის წყარო ამონიუმის მარილებია. ამ შემთხვევაში საკვებ არეში შეაქვთ NH_4Cl ან $(NH_4)_2SO_4$. ზოგიერთი მიკროორგანიზმი გამოიყენებს აზოტის წყაროდ ნიტრატებს, ამ შემთხვევაში საკვები არე უნდა შეიცავდეს KNO_3 ან $NaNO_3$. არის შემთხვევები, როცა მიკროორგანიზმი მოითხოვს ამინომჟავების სრულ კომპლექტს ნორმალური ფუნქციონირებისათვის, ამ დროს ამინომჟავების L ან DL ფორმები სტერილურ საკვებში შეაქვთ (0.1-0.05გრ/100მლ) უშუალოდ მიკროორგანიზმების დათესვის წინ. გლიცინი, ალანინი, პროლინი, ლიზინი და ორნითინი იხსნება დისტილირებულ წყალში, ფენილალანინი და ტრიფტოფანი- NaOH-ით გატუტებულ დისტილირებულ წყალში, ხოლო დანარჩენი ამინომჟავები HCl-ით შემჟავებულ დისტილირებულ წყალში. ამინომჟავები – ცისტინი და ცისტეინი, ასევე ამიდები-გლუტამინი და ასპარაგინი არამდგრადია შეთბობის მიმართ, ამიტომ მათი სტერილიზაცია ხდება გაფილტვრით. დარარჩენი ამინომჟავები სტერილდება 0.5ატმ 15 წთ.

ზოგიერთი მიკროორგანიზმის მოთხოვნას აზოტის მიმართ აკმაყოფილებენ საკვებ არეში ცილის ჰიდროლიზატის შეტანით. ჰიდროლიზატების მისაღებად იყენებენ ცხოველური (ხორცი, თევზი, ჟელატინი, კაზეინი) ან მცენარეული (სოიო ან მზასუმზირა) წარმოშობის ცილებს, ასევე მიკროორგანიზმთა უჯრედებს – საფუვრები, წყალმცენარეები, ბაქტერიები.

განსაკუთრებულად მომთხოვნ მიკროორგანიზმებს ზრდიან ცილების ან პეპტონების (ცილის არასრული დაშლის პროდუქტი) შემცველ საკვებ არეებზე. პეპტონი მიიღება ცილების პროტეოლითიური ფერმენტებით დამუშავების გზით და წარმოადგენს პოლი- და ოლიგოპეპტიდების, ამინომჟავების, ორგანული აზოტოვანი ნაერთებისა და მიკროელემენტების ერთობლიობას. ამ შემთხვევაში გასათვალისწინებელია, რომ პეპტონს მიკროორგანიზმები იყენებენ არამარტო როგორც აზოტის, არამედ ნახშირბადის და ენერგიის წყაროდ.

ზოგიერთ ბაქტერიას შეუძლია აზოტის ერთადერთ წყაროდ გამოიყენოს მოლეკულური აზოტი N_2, ეს აზოტფიქსატორი მიკროორგანიზმებია. ამ შემთხვევაში საკვებში აზოტის წყაროს შეტანა არ წარმოადგენს აუცილებლობას, აირადი აზოტით მის მომარაგებას უზრუნველყოფს საკვები არის ჰაერთან შეხება ან ატმოსფეროში აზოტის კულტივირება.

მრავალი მიკროორგანიზმი საჭიროებს ე. წ. ზრდის ფაქტორებს –ვიტამინებს, პურინებს, პირიმიდინებს, ამინომჟავებს. ამ ფაქტორის მიმართ დამოკიდებულების მიხედვით მიკროორგანიზმები შეიძლება დავყოთ **პროტოტროფებად** და **აუქსოტროფებად**. პროტოტროფებს არ სჭირდებათ ზრდის ფაქტორები, ხოლო აუქსოტროფები მომთხოვნი არიან მათ მიმართ. ვიტამინები სტერილურ საკვებ არეში შეაქვთ უშუალოდ დათესვის წინ. ამისათვის რეკომენდებულია გამოყენებულ იქნეს ისეთი ხსნარები, რომელშიც ვიტამინის კონცენტრაცია ასჯერ აღემატება მის შემცველობას საკვებ არეში. ხსნარები მზადდება სტერილურ ჭურჭელში სტერილური დისტილირებული წყლის გამოყენებით.

ხსნარების სტერილიზაციისას უნდა იყოს გათვალისწინებული მათი დამოკიდებულება ტემპერატურის მიმართ, ზოგი მათგანი სტერილდება წყლის აბაზანაზე (რიბოფლავინი, ფოლის მჟავა), ზოგი კი გაფილტვრით (თიამინი).

სხვადახვა ზრდის ფაქტორების შემცველი საკვები არეების მაგალითებია- საფუვრის ექსტრაქტი, საფუვრის ავტოლიზატი, სიმინდის ექტრაქტი.

მიკროორგანიზმების კულტივირებისათვის ასევე აუცილებელია გოგირდი, ფოსფორი და სხვა მიკროელემენტები. ყველა მათგანი საკვებ არეში უნდა შედიოდეს ორგანიზმისათვის ხელმისაწვდომი ფორმით. მიკროორგანიზმების უმრავლესობის მოთხოვნები გოგირდის მიმართ კმაყოფილდება საკვებ არეში სულფატების შეტანით. იშვიათ შემთხვევაში, როცა მიკროორგანიზმი საჭიროებს გოგირდის აღდგენილ ფორმას, მაშინ სულფიდის ან სულფჰიდრილური ჯგუფის შემცველი ორგანული ნაერთის (ცისტეინი) სახით.

ფოსფორმჟავას მარილები უზრუნველოფს მიკროორგანიზმების მოთხოვნებს ფოსფორის მიმართ, ყველა დანარჩენ ელემენტს-K, Na, Ca, Mg, Fe, Co, Cu – მიკროორგანიზმები აითვისებს არაორგანული მარილების კათიონების და ანიონების სახით.

იმისათვის რომ თავიდან ავიცილოთ ნალექის წარმოქმნა ფოსფატის ზოგიერთ კათიონთან ურთიერთქმედებისას საკვებ არეს უნდა დაემატოს ეთილდიამინტეტრააცეტატი (ედტა-0.001-1გრ/ლ) ან ნატრიუმის ჰექსამეტაფოსფატი (4გრ/ლ). კომპლექსები, რომელსაც ეს ნაერთები წამოქმნის კათიონებთან ასრულებს რეზერვის ფუნქციას, რის გამოც დისოციაციის შედეგად ხსნარში გადმოდის თავისუფალი კათიონები.

მიკროორგანიზმებს ესაჭიროებათ ასევე მიკროელემენტები-Mo, Zn, Mn და სხვა ძალიან მცირე კონცენტრაციით (1მკგ-1მგ/ლ). ბუნებრივი საკვები არეები ამ მიკროელემენტებს შეიცავს, ხოლო სინთეტურში ისინი უნდა იქნეს შეტანილი. მიკროელემენტების ხსნარები სტერილდება ცალკე და შეაქვთ საკვებ არეში უშუალოდ დათესვის წინ.

მიკროორგანიზმების კულტივირებისათვის საჭირო საკვები არეები, გარდა ბიოსინთეზის პროცესებისათვის აუცილებელი კომპონენტებისა უნდა შეიცავდეს ენერგეტიკული პროცესებისათვის აუცილებელ პროდუქტს. ენერგიის მიღების ხერხის მიხედვით მიკროორგანიზმები იყოფა - **ქემოტროფებად** და **ფოტოტროფებად**.

ქემოტროფები იყენებს სხვადახვა ნაერთების დაჟანგვის ენერგიას: ქემოლითოტროფები-არაორგანული ნივთიერებების (H_2S, S, H_2,NH^{4+} , NO^{2-}, Fe^{2+}) დაჟანგვის ენერგიას. ქემოორგანოტროფები ენეგიის სუბსტრატად იყენებს ორგანულ ნაერთებს, რომელიც ამავე დროს მათთვის ნახშირბადის წყაროს წარმოადგენს. თუმცა არის მიკროორგანიზმები, რომლებიც კონსტრუქციული და ენერგეტიკული პროცესებისათვის განსხვავებულ ნაერთებს საჭიროებენ. მაგ.: ჰომოფერმენტატული რძემჟავაბაქტერიები ენერგიას ღებულობენ შექრების დუღილით, მაგრამ თითქმის არ იყენებენ მათ კონსტრუქციულ მეტაბოლიზმში. კონსტრუქციული მიზნებისათვის მათ ესაჭიროებათ ამინომჟავები, პურინული და პირიმიდინული ფუძეები, ვიტამინები.

ფოტოტროფები იყენებს სინათლის ენერგია. ამიტომ მათი ენერგეტიკული მოთხოვების დაკმაყოფილება ხდება ბუნებრივი ან ხელოვნური განათების პირობებში კულტივირებით.

საკვები არეები

მიკრობიოლოგიის ერთ-ერთი ძირითადი ამოცანაა ამა თუ იმ სუბსტრატში მიკროორგანიზმთა რაოდენობის (კოლონიაწარმომქმნელი ერთეულები-კოე) განსაზღვრა. გერმანელი მეცნიერის რ. კოხის მიერ შემოთავაზებულ იქნა ხორცის ბულიონზე დამზადებული მეტ-ნაკლებად **უნივერსალური** საკვები არე, რომელზეც კარგად იზრდება აზოტშემცველი ორგანული ნივთიერებების ამთვისებელი მიკროორგანიზმები.

მოგვიანებით ც. ვინოგრადსკიმ მიკრობიოლოგიურ პრაქტიკაში დანერგა **ელექტიური** ანუ შერჩევითი საკვები არეები, რომელიც განკუთვნილია მიკროორგანიზმთა გარკვეული ჯგუფისათვის. ისინი შექმნილია განსაკუთრებულად მკაცრი პირობების გათვალისწინებით, რომელშიც უნდა გაიზარდოს შერჩეული მიკროორგანიზმი და არავითარი სხვა სახეობა. ელექტიური საკვები არეების ძირითადი პრინციპია - მიკროორგანიზმთა შერჩევითი მოთხოვნილებების გათვალისწინება ზრდა-განვითარების სპეციფიურ პირობებში. შესაბამისი ჯგუფის მიკროორგანიზმების ფიზიოლოგიის ცოდნის შემთხვევაში შესაძლებელია შეირჩეს არა მარტო საკვები არის ქიმიური შედგენილობა, არამედ კულტივაციის ოპტიმალური პირობები - აერაცია, ტემპერატურული და PH რეჟიმი, რითაც იქმნება ამ მიკროორგანიზმის განვითარებისათვის საჭირო ეკოლოგიური ნიშის ლაბორატორიული იმიტაცია. ელექტიური საკვები არეების მაგალითებია-საკვები არეები აზოტფიქსატორებისათვის, ნიტრიფიკატორებისათვის, და სხვა. ისინი გამოიყენება ამ ჯგუფის მიკროორგანიზმების გამოსაყოფად მათი საარსებო გარემოდან და დაგროვებითი კულტურის მისაღებად.

დაგროვებითი საკვები არეები შემოთავაზებულ იქნა ჰოლანდიელი მეცნიერის მ. ბეიერინკის მიერ. მასში მკვლევარებს შეაქვთ დიდი რაოდენობით მათთვის საინტერესო კომპონენტი, რომელსაც აითვისებს მიკროორგანიზმთა გარკვეული ჯგუფი და სწორედ ისინი დომინირებდეს იქნება მოცემულ გარემოში.

ა. იმშენეცკიმ გამოიყენა ოპტიმალური საკვები არე ცელულოზოდამშლელი მიკროორგანიზმებისათვის. ამ საკვები არის შექმნის ძირითადი პრინციპი მდგომარეობს იმაში, რომ შეიქმნას შერჩეული მიკროორგანიზმისათვის მაქსიმალურად ოპტიმალური პირობები საკვებ არეში სხვადასხვა დანამატების შეტანით (ზრდის მასტიმულირებელი ვიტამინები, მიკროელემენტები და სხვა).

დიფერენციალურ-დიაგნოსტიკური საკვები არეები გამოიყენება მიკროორგანიზმთა სხვადასხვა სახეობების გამოსაცალკევებლად. მათი შერჩევის პრინციპი ეყრდნობა ბაქტერიების ბიოქიმიურ თავისებურებებს შორის არსებულ განსხვავებებს. დიფერენციალურ-დიაგნოსტიკური საკვები არის შემადგენლობაში შედის შემდეგი კომპონენტები:

1. ძირთითადი საკვები არე, რომელიც უზრუნველყოფს ბაქტერიების გამრავლებას;
2. ქიმიური სუბსტრატი, რომლის მიმართ განსხვავებული დამოკიდებულება არის მიკროორგანიზმის დიაგნოსტიკური ნიშანი;
3. ფერადი ინდიკატორი რომლის მიმართ რეაქციაც ამტკიცებს მოცემული ფერმენტული სისტემის ფუნქციონირებას მიკრობის უჯრედში.

შედგენილობის მიხედვით საკვები არეები იყოფა ორ ჯგუფად: **ბუნებრივი** (ნატურალური) და **სინთეტური** (ხელოვნური).

ბუნებრივია საკვები არე, რომელიც შედგება ცხოველური ან მცენარეული წარმოშობის პროდუქტებისაგან, გააჩნია რთული, გაურკვეველი ქიმიური შემადგენლობა. ეს არის მცენარეების სხვადასხვა ნაწილები, ცხოველური ქსოვილები, საფუარი, ალაო,

ნაკელი, ზღვის, ტბის წყლები. ისინი გამოიყენება ექსტრაქტების სახით. მათზე იზრდება მიკროორგანიზმების უმრავლესობა, რადგან ისინი შეიცავს მიკრობებისათვის აუცილებელ ყველა კომპონენტებს. შემადგენლობის მიხედვით მცირედ შესწავლილი ეს საკვები არეები არ არის სასურველი და მოსახერხებელი მიკროორგნიზმების ნივთირებათა ცვლის შესასწავლად, რადგან არ იძლევა საშუალებას გათვალისწინებულ იქნეს მიკროორგანიზმთა საკვები მოთხოვნები, ამიტომაც ბუნებრივი საკვები არეები ძირითადად გამოიყენება მიკროორგანიზმთა კულტურების შესანახად, დასაგროვებლად და დიაგნოსტიკური მიზნებისათვის.

სინთეტური-არის საკვები არე, რომლის შემადგენლობაში მკაცრად განსაზღვრული კონცენტრაციის სუფთა ქიმიური ნაერთები შედის. ისინი შეიძლება იყოს მარტივი და რთული, ფართოდ გამოიყენება ნივთიერებათა ცვლის შესასწავლად. არსებობს ასევე ე. წ. ნახევრად სინთეტური საკვები არეები, მათ შემადგენლობაში ცნობილ ქიმიურ ნაერთებთან ერთად შედის ბუნებრივი კომპონენტები.

ნახევრადსინთეტური საკვები არეები ფართოდ გამოიყენება მიკრობიოლოგიურ პრაქტიკაში ანტიბიოტიკების, ვიტამინების, ამინომჟავების და მიკრობთა ცხოველქმედების სხვა პროდუქტების მისაღებად.

საკვები არეები შეიძლება იყოს სხვადასხვა კონსისტენციის: **თხევადი, მყარი, ნახევრად თხევადი**.

მყარი საკვები არეები გამოიყენება ბაქტერიების რაოდენობის განსაზღვრისათვის, სუფთა კულტურების გამოსაყოფად, და სხვა მიზნებისათვის. მყარ საკვებს ღებულობენ თხევად არეებში 1.5-5% აგარის ან 10-15% ჟელატინის დამატებით. ნახევრადთხევადი საკვების დამზადებისას შეაქვთ 0.1-0.2% აგარი.

აგარი-მცენარეული კოლოიდი, რომელიც მიიღება ზღვის წყალმცენარეებისაგან. მის შემადგენლობაში შედის პოლისაქარიდები და მცირე რაოდენობით აზოტური ნაერთები. ქარხნული წარმოების აგარი შეიძლება იყოს ფირფიტების, ღეროების ან ფხვნილის სახით, მისი დნობის ტემერატურა 100°C, გამყარების – 40C^{o}.

ჟელატინი-მჟავე აზოტშემცველი პროდუქტი, მიიღება ძვლების, ხრტილის, თევზის ქერცლის ხარშვისას. მისი დნობის ტემპერატურა (22-25°C) დაბალია ვიდრე მიკროორგნიზმების უმრავლესობის ინკუბაციისათვის საჭირო ოპტიმალური ტემპერერატურა (30-37°C). მიკროორგანიზმების უმრავლესობას შესწევს უნარი ჟელატინის გათხიერებისა.

მყარი საკვები არეების ფუნქციას ასრულებს ასევე გელისშემცველი ფირფიტები, რომელიც მიკრობიოლოგიაში შემოიტანა ც. ვინოგრადსკიმ.

იმ მიკროორგანიზმებისათვის, რომლებიც ითვისებენ აზოტის ორგანულ ფორმებს ხშირად გამოიყენება ხორცპეპტონიანი არე: ხორცპეპტონიანი ბულიონი (ხპბ) , ხორც-პეპტონიანი აგარი (ხპა) და ხორც-პეპტონიანი ჟელატინი (ხპჟ).

საკვები არეების მომზადება. ხორცპეპტონიანი ბულიონი (ხპბ)

ხორცპეპტონიანი საკვები არეების მოსამზადებლად იყენებენ ხორცის ბულიონს. ამისათვის 500 გრ დაკეპილ ხორცს (ძვლების, ცხიმის, ძარღვების გარეშე) ემატება 50 ^{o}C გაცხელებული 1ლ ონკანის წყალი, ნარევს აყოვნებენ 12სთ ოთახის ტემპერატურაზე ან 1 სთ 50-55°C. შემდეგ ხორცს წურავენ, ექსტრაქტს გაფილტრავენ ბამბიან დოლბანდში, ადუღებენ 30 წთ კოლოიდური ცილების კოაგულირებისათვის, კვლავ ფილტრავენ, პირველად ბამბიან დოლბანდში, მეორედ ქაღალდის ფილტრში.

ფილტრატს უმატებენ შესაბამისი რაოდენობის ონკანის წყალს 1 ლ-მდე შესავსებად, ანაწილებენ კოლბებში, და ასტერილებენ 120°C 20 წთ.

ზოგჯერ ლაბორატორიულ პირობებში ხორცის ნაყენს ადუღებენ ხორცთან ერთად და შემდეგ წურავენ, ამ დროს მიიღება კარგი ხარისხის ბულიონი. აუცილებლობის შემთხვევაში ბულიონს უმატებენ მცირე რაოდენობით პეპსინს რომელიც ხელს უწყობს მასში ცილოვანი კომპონენტების ჰიდროლიზს, ამის შემდეგ საკვები არე ხელმისაწვდომი ხდება მიკროორგანიზმების უფრო მეტი სახეობისათვის.

ხპბ მისაღებად 1ლ ხორცის ბულიონს უმატებენ 5-10 გრ პეპტონს საკვების კალორიულობის ასამაღლებლად და 5 გრ სუფრის მარილს ოსმოსური აქტივობისათვის. არეს ათბობენ მუდმივი მორევის პირობებში პეპტონის სრულ გახსნამდე.

ამის შემდგომ აყენებენ ნეიტრალურ ან სუსტ ტუტე რეაქციას 20% Na_2CO_3 ხსნარის დამატებით. საკვები არის შესამოწმებლად მოსახერხებელია ინდიკატორი ბრომთიმოლბლაუს ორი წვეთი, მას ურევენ ბულიონის რამოდენიმე წვეთში. ნეიტრალურ არეში ინდიკატორი-მწვანეა, მჟავე არეში-ყვითელი, ტუტეში- ლურჯი.

PH დაყენების შემდეგ საკვებ არეს კვლავ ადუღებენ 5-10 წთ, ამ დროს კოაგულირებული ცილების მოსაცილებლად არეს კვლავ ფილტრავენ ქაღალდის ფილტრით გაღიავების გარეშე ან აღიავებენ ცილით. ამისათვის კვერცხის ცილას ურევენ ორჯერ მეტი წყლის რაოდენობაში და უმატებენ 50 °C მდე გაგრილებულ ბულიონში. ნარევს ადუღებენ მუდმივი მორევით, 10წთ სუსტ ცეცხლზე, შემდეგ ფილტრავენ. გამჭვირვალე ბულიონს ანაწილებენ სინჯარებში და ასტერილებენ 120 °C 20 წთ.

ხორცპეპტონიანი აგარი (ხპა). 1 ლ ხპბ უმატებენ 15-20 გრ აგარს, აცხელებენ აგარის გალღობამდე, აყენებენ სუსტ ტუტე რეაქციას 20% Na_2CO_3 დამატებით, ანაწილებენ სინჯარებში და ასტერილებენ 120°C 20 წთ.

ხორცპეპტონიანი ჟელატინი (ხპჟ). 1 ლ ხპბ უმატებენ 100-150 გრ ჟელატინს. მისი ლღობის ტემპერატურა დამოკიდებულია არეში მის კონცენტრაციაზე, თუ 100% კონცენტრაციაა, მაშინ ის ლღვება 24°C, თუ 15%- მაშინ 25°C.

ჟელატინის გალღობის შემდეგ აყენებენ საკვები არის სუსტ ტუტე რეაქციას ზემოთ აღნიშნული მეთოდით, ადუღებენ 5 წთ, აგრილებენ 40-50°C-მდე. მცირე რაოდენობის წყალთან შერეული კვერცხის ცილას უმატებენ ამ გაგრილებულ მასაში, ურევენ და კვლავ აცხელებენ. ცილების დალექვის შემდეგ საკვები არე ხდება გამჭვირვალე. მას გაფილტრავენ ცხელ მდგომარეობაში ქაღალდის ფილტრით, ანაწილებენ სინჯარებში და ასტერილებენ კოხის აპარატში-სამჯერადი გაცხელებით 30-30წთ ყოველ 24 საათში.

კარტოფილის აგარი. 200 გრ გათლილ კარტოფილს ჭრიან წვრილად, ამატებენ 1ლ ონკანის წყალს და ხარშავენ 30 წთ. ნახარშს ფილტრავენ ბამბიანი დოლბანდით და შეავსებენ წყლით საწყის მოცულობამდე. მიღებულ სითხეს უმატებენ 20% აგარს, ადუღებენ აგარის სრულ გალღობამდე, აყენებენ სუსტ ნეიტრალურ რეაქციას (PH=7), ასტერილებენ 1ატმ 20 წთ.

ლუდის სუსლო და სუსლო აგარი. ქერის მარცვლებს ალბობენ ცივ წყალში და 35°C აღივებენ, როცა გამონაზარდი ორჯერ აღემატებოდეს იქნება მარცვლის ზომას, მათ აგროვებენ, აშრობენ და ღებულობენ ალაოს. ბადაგის მოსამზადებლად, ალაოს

ფქვავენ მსხვილად და უმატებენ წყალს (250გრ ალაოზე 1 ლ წყალი). ამილაზის უკეთესი გამოსავალისათვის ნარევს აცხელებენ 57°C-მდე სახამებელზე რეაქციის გაქრობემდე (იოდით ლურჯი შეფერილობა). სახამებლის დაშაქრებაზე სინჯებს იღებენ ფაიფურის ჯამში.

ბადაგს ფილტრავენ ბამბაში, შემდეგ ფილტრის ქაღალდში. ასეთი ბადაგი შეიცავს 10-20% შაქარს. შაქრის ზუსტი შემცველობა დგინდება სპეციალური საზომი აპარატით. ბადაგს აზავებენ შაქრის 6-8% შემცველობამდე და ასტერილებენ 30 წთ 115°C, 0.5 ატმ. ასევე შესაძელებლია მზა ბადაგის შეძენა ლუდის ქარხნებში.

სუსლო-აგარის მისაღებად ლუდის ბადაგს ამატებენ 2.5-3% აგარს, აცხელებენ აგარის გალღობადე, ფილტრავენ და ასტერილებენ.

გაუცხიმოვნებული რძე საკვები არის დასამზადებლად გამოიყენება ე.წ. ცხომმოცლილი რძე, რადგან ცხიმი უარყოფითად მოქმედებს მიკროოგანიზმების ზრდაზე. რძისათვის ცხიმის მოცლა შესაძლებელია მისი 34°C გაცხელებით და სეპარირებით.

სტერილიზაციისას გასათვალისწინებელია, რომ დიდხანს რძის ავტოკლავირება არ შეიძლება, რადგან ლაქტოზა (რძის შაქარი) განიცდის კარამელიზირებას.

გაუცხიმოვნებელ რძეს ანაწილებენ სინჯარებში და ასტერილებენ 0.5ატ. 10 წთ. სტერილიზიციამდე საკვები არის მჟავიანობა არ უნდა აღემატებოდეს 22° ტერნერს, სხვა მხრივ რძე აიჭრება. სტერილიზაციის შემდეგ საკვებ არეს ათავსებენ თერმოსტატში 3 დღე 30°C, რათა მოხდეს სხვადასხვა სპორაწარმომქმნელი ბაქტერიების ზრდის პროვოცირება. სამი დღის შემდეგ სინჯარებს ათვალიერებენ და იმათ რომლებშიც მიკროორგანიზმებია განვითარებული არ გამოიყენებენ.

ხანგრძლივი ავტოკლავირების შედეგად კარამელიზიებული რძის გამოყენება საკვე არედ დაუშვებელია.

საფუვრიანი საკვები არეები.

საფუვრის წყალი. 50-100 გრ მშრალ საფუარს ხსნიან 1 ლ წყალში, ადუღებენ 10 წთ, ფილტრავენ ქაღალდის ფილტრში და ასტერილებენ გამდინარე ორთქლში 30-30 წთ სამი დღის განმავლობაში ყოველდღიურად.

საფუვრის ავტოლიზატი- 200 გრ დაპრესილი საფუარი იხსნება 1 ლ წყალში, ემატება 2 გრ Na_2HPO_4, 1N NaOH წვეთებით PH 6.1-მდე დასაყვანად და 5 მლ ქლოროფორმი, ხსნარს აყოვნებენ 37°C 2დღე -ღამე, შემდეგ მიყავთ pH-7.4, ადუღებენ 30 წთ, ფილტრავენ ქაღალდის ფილტრით, ანაწილებენ ჭურჭელში და ასტერილებენ 115°C 30 წთ.

საფუვრის ექსტრაქტი- 1 კგ დაპრესილი საფუარი იხსნება 1 ლ წყალში, ნარევს ადუღებენ 1 სთ, სამჯერ ფილტრავენ ქაღალდის ფილტრით და ასტერილებენ 115°C 30 წთ.

თავი 8. მიკროორგანიზმთა კულტივირების პირობები

აერობული მიკროორგანიზმების კულტივირება; ტემპერატურა; სინათლე; წყალი; პერიოდული და უწყვეტი კულტივირება;

მიკროორგანიზმთა კულტივირებისათვის მნიშვნელოვანია არა მარტო საკვები კომპონენტების შერჩევა, არამედ ისეთი ფაქტორების დარეგულირება, როგორიცაა გარემოს pH, აერაცია, ტემპერატურა, განათება, ტენიანობა.

გარემოს pH

pH მიმართ მიკროორგანიზმებს განსხვავებული დამოკიდებულება გააჩნია,

1. აციდოფილები – ოპტიმალური pH<7
2. ფსიხროფილები – ოპტიმალური pH>7
3. ნეიტროფილები-ოპტიმალური pH=7

ამიტომ საკვებ არეში მჟავიანობის დადგენა გარემოს ოპტიმიზაციის აუცილებელი პირობაა. მისი განსაზღვრა შესაძლებელია, როგორც სპეციალური ქაღალდის ინდიკატორებით, ასევე აპარატით-pH-მეტრით. გარემოს მჟავიანობის დარეგულირება ხდება სხვადასხვა მჟავებისა (HCl, H_2SO_4) და ტუტეების ($NaOH$, KOH) გამოყენებით. სტერილიზაციის შემდეგ საკვები არის pH შეიძლება შეიცვალოს, ამიტომ მისი კორექტირება უნდა მოხდეს სტერილიზაციის შემდეგ სტერილური ხსნარების დამატებით.

საკვები არის აქტიური pH , რომელიც ხელსაყრელია მიკროორგანიზმების ზრდა-განვითარებისათვის კულტივირების პროცესში ხშირად იცვლება, ამის მიზეზი შეიძლება იყოს მეტაბოლიზმის პროდუქტები ან ორგანიზმის მიერ საკვები კომპონენტების არათანაბარი გამოყენება. რათა თავიდან ავიცილოთ გარემოს pH მკვეთრი ცვლილება და შევინარჩუნოთ მისი მეტ-ნაკლები მუდმივობა, გამოიყენება სპეციალური ბუფერული ხსნარები, ძირითადად მიკრობიოლოგიაში იყენებენ ფოსფატურ ბუფერებს. თუმცა ეს ყოველთვის როდია გამოსავალი, რადგან არის მიკროორგანიზმები, რომლებიც კულტივირებისას მკვეთრად ცვლიან საკვები არის pH, ამ დროს ბუფერის გამოყენება არ არის საკმარისი ოპტიმიზაციისათვის, ამ შემთხვევაში გამოიყენება ცარცი, რომელიც ანეიტრალებს ორგანიზმის ცხოველმყოფელობის პროცესში გამოყოფილ მჟავებს.

გარემოს pH ოპტიმიზაცია კულტივირების მთელი პრეიოდის განმავლობაში აუცილებელია განსაკუთრებით იმ მიკროორგანიზმებისათვის, რომლებიც აქტიურად გამოყოფენ მჟავას და არ არიან მის მიმართ მდგრადი. ასეთია რძემჟავა ბაქტერიები და ფსევდომონადების უმრავლესობა.

აერაცია. ჟანგბადი შედის წყლისა და სხვა ნაერთების შემაგენლობაში, ამიტომაც მუდმივად მიეწოდება უჯრედს, თუმცა ზოგიერთი ორგანიზმი საჭიროებს განუწყვეტელ აერაციას, ასეთ მიკროორგანიზმებს **ობლიგატური აერობები** ეწოდება. მათი ენერგეტიკული პროცესი აერობული სუნთქვაა, მოლეკულური ჟანგბადი ტერმინალური დამჟანგველის როლს ასრულებს. ობლიგატურ აერობებში ასხვავებენ **მიკროაეროფილებს**-მიკროორგანიზმები, რომლებსაც ესაჭიროებათ ჟანგბადი, მაგრამ უკეთ იზრდებიან ჟანგბადის უფრო დაბალი პარციალური წნევის პირობებში, ვიდრე ეს ატმოსფერიოშია. სხვა მიკროორგანიზმები, პირიქით იზრდება, მხოლოდ უჟანგბადო

გარემოში. მათი უმრავლესობისათვის ჟანგბადი ტოქსიკურია. ეს ობლიგატური ანაერობებია. მიკროორგანიზმებში გამოყოფენ ასევე **ფაკულტატურ ანაერობებს**, რომელთა წარმომადგენლები იზრდება როგორც ჟანგბადიან ასევე უჟანგბადო არეში. მოლეკულური ჟანგბადის მიმართ განსხვავებული დამოკიდებულება აისახება მიკროორგნიზმთა კულტივირების პირობებსა და მეთოდებზე.

აერობული მიკროორგანიზმების კულტივირება.

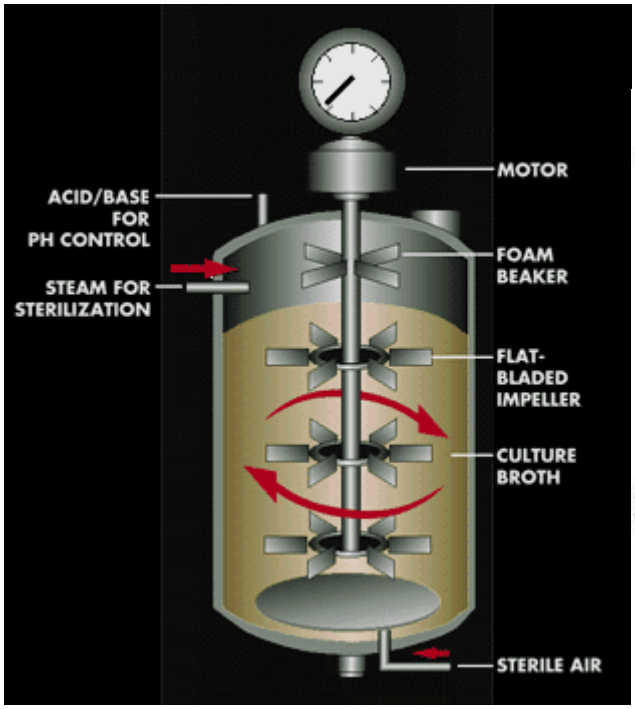
ედაპირული კულტივირება თხევად და მყარ საკვებ არეებზე.

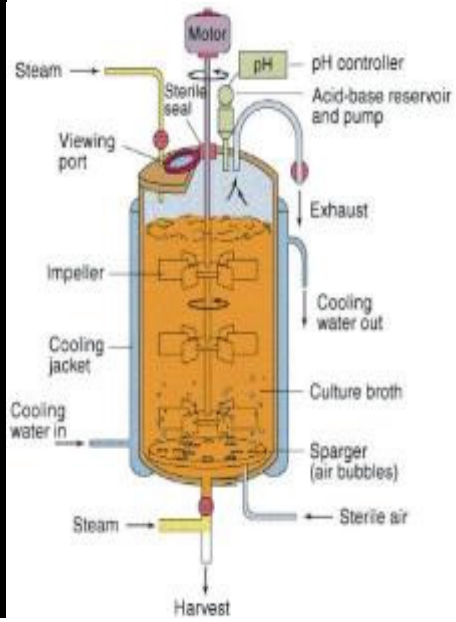
ამ შემთხვევაში მიკროორგანიზმები იზრდება მყარი და თხევადი საკვები არის ზედაპირზე და ჟანგბადი მათ მიეწოდება უშუალოდ ჰერიდან, ამ დროს მნიშვნელოვანია გავზარდოთ ჰაერთან შეხების ზედაპირის ფართობი. ამიტომ საკვები არეები თხელი შრის სახით ისხმევა დიდი ზომის ჭურჭელში-პეტრის ჯამი, კოლბა, მატრიცა (სურათი №---). თხევად საკვებ არეში მიკროორგანიზმები იზრდება თხელი ზედაპირული ფირფიტის სახით. ფაკულტატური ანაერობები იზრდება, როგორც საკვები არის ზედაპირზე, ასევე სიღრმეში, იწვევს რა საკვების მეტ-ნაკლებად თანაბარ შემღვრევას.

სიღრმული კულტივირება

სიღრმული კულტივირების ყველა მეთოდის ძირითადი არსი მდგომარეობს საკვები არის ჟანგბადთან შეხების ზედაპირის გაზრდაში. აღსანიშნავია, რომ ამ დროს მიკროორგანიზმები იყენებს ხსნად ჟანგბადს. ჟანგბადის ხსნადობა წყალში არ არის დიდი, ამიტომაც აერობების სიღრმული ზრდის უზრუნველსაყოფად აუცილებელია მისი მუდმივი აერაცია. საკვები არის აერაციისას ითვალისწინებენ ორ მაჩვენებელს: **აერაციის ხარისხი** და **აერაციის ინტენსივობა**. აერაციის ინტენსივობა-დროის გარკვეულ მონაკვეთში საკვები არის გარკვეულ მოცულობაში ჟანგბადის ხსნადობის სიჩქარე. აერაციის ხარისხი-დროის გარკვეულ მონაკვეთში საკვები არის კონკრეტულ რაოდენობაში შემავალი ჰაერის მოცულობა.

ლაბორატორიაში სიღრმული კულტივირების ყველაზე ფართოდ გავრცელებული ფორმაა სანჯღრეველების გამოყენება. რაც უფრო დიდია ბრუნვის სიჩქარე, მით მეტია ჟანგბადთან საკვები არის შეხების ფართობი და ჟანგბადით მისი გაჯერების ხარისხი. აერირება მიიღწევა ასევე საკვებ არეში სტერილური ჰაერის ნაკადის შეშვებით, ამისათვის გამოიყენება ფერმენტიორი. ჰაერის გატარებული ნაკადის რაოდენობა აქ რეგულირდება ავტომატურად. ფერმენტიორში შესვლამდე ჰაერი განიცდის მრავალჯერად სტერილიზაციას სპეციალური ფილტრებით (სურათი).





ანაერობული მიკროორგანიზმების კულტივირება

ანაერობების კულტივირება რთული პროცესია, რომლის განმავლობაშიც მინიმუმამდე უნდა იქნეს დაყვანილი ან მთლიანად გამოირიცხოს ჟანგბადთან მიკროორგანიზმების ურთიერთობა. ამისათვის შეიძლება იქნეს გამოყენებული, როგორც თხევადი ასევე მყარი, აგარიზებული საკვები არეები.

ანაროსტატებში კულტივირება

ანაროსტატი-მანომეტრით აღჭურვილი ვაკუუმური თერმოსტატი. მისგან გამოდევნიან ჰაერს, შემდეგ კი მას ავსებენ შემდეგი აირების ნარევით აზოტი (90-80%), ნახშირორჟანგი (10-20%). წნევა-67×10^3 პა.

მკაცრ ანაერობებთან (მეთანწარმომქმნელი, აცეტოგენური ბაქტერიები, ცალულოზოდამშლელები და სხვა) მუშაობა უფრო სკურპულოზურ მიდგომას მოითხოვს, ამ დროს მთლიანად უნდა გამოირიცხოს ჟანგბადის მოხვედრა კულტივაციის გარემოში. ამ მიზნით:

1. *კულტივაციისათვის საჭირო საკვები არეები და დანამატები მზადდება უშუალოდ ავტოკლავირების წინ, მაქსიმალურად უჟანგბადო გარემოში (დუღილი და სხვა);*
2. *ავტოკლავირების შემდეგ საკვები არეები ცივდება ჟანგბადისაგან თავისუფალი სტერილური აირის ნაკადით;*
3. *მიკროორგანიზმების დათესვამდე საკვებში შეაქვთ აღმდგენები (ცისტეინი, ნატრიუმის სულფიდი) იმ ჟანგბადის ქიმიური შთანთქმისათვის, რომელიც შეიძლება მოხდვეს ჭურჭელში რეზინის საცობებიდან დიფუნდირების გზით;*
4. *დათესვა წარმოებს უჟანგბადო აირის ნაკადის პირობებში;*
5. *მიკროორგანიზმებს ზრდიან ჰერმეტულ ჭურჭლებში;*
6. *ყველა რეზინის მილი, რომლის გავლითაც მიეწოდება გარემოს უჟანგბადო აირი უნდა ხასიათდებოდეს ჟანგბადის დიფუზიის დაბალი ხარისხით;*
7. *ყველა გადათესვა ან დანამატების შეტანა წარმოებს უჟანგბადო აირით გატარებული სპეციალური შპრიცებით.*

8. *ჟანგბადის შთანთქმისა და საკვები არის დაჟანგვის ხარისხი ხასიათდება ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალით-Eh, რომელიც იზომება ელექტრომეტრულად ან ინდიკატორული საღებავებით (რეაზურინი).*

ასევე ანაერობების კულტივირებისათვის გამოიყენება სპეციალური კამერები – Gas-pak, რომლებიც დახურულ სივრცეში წარმოქმნიან წყალბადს და ნახშირორჟანგს და შთანთქავენ ჟანგბადს. ამ დროს აუცილებლად გათვალისწინებულ იქნეს გამოყენებული რეაქტივების შთანთქმის უნარი და ჩაკეტილი სივრცის ფართობი, რომელშიც ხდება მიკროორგანიზმების კულტივირება.

ლაბორატორიულ პირობებში ჟანგბადის მშთანთქმელად გამოიყენება პიროგალოლის ტუტე ხსნარი ან ნატრიუმის დითიონიტი, ვინაიდან მრავალი აერობი საჭიროებს ნახშირორჟანგს, პიროგალოლს ხსნიან არა ტუტეში, არამედ ნატრიუმის ბიკარბონატში. ჟანგბადის შთანთქმას აკონტროლებენ ჟანგვა-აღდგენითი ინდიკატორით (0.024% NAOH, 0.015% მეთილენის ლურჯის წყალხსნარი, 6% გლუკოზა, ანტისეპტიკი-თიმოლი). გამოყენებადმე ხსნარს ასხამენ სინჯარაში, აცხელებენ წლის აბაზანაზე გაუფერულებამდე, და ათავსებენ ანაეროსტატში, ანაერობულ პირობებში ის რჩება უფერული.

აღმდგენებად იყენებენ ნატრიუმის სულფიდს ან თიოგლიკოლატს, კონცენტრაციით, რომელიც არ მოქმედებს მიკროორგანიზმების ზრდაზე.

ტემპერატურა

ტემპერატურული ინტერვალი, რომელშიც იზრდება მიკროორგანიზმები საკმაოდ დიდ ფარგლებში ვარირებს.

მეზოფილები-25-27°C;

თერმოფილები-45-90°C;

ფსიხროფილები-5-10C°.

სინათლე

მიკროორგანიზმთა უმრავლესობის ზრდისათვის განათება არ არის საჭირო. სინათლე ესაჭიროება მხოლოდ ფოტოტროფულ ორგანიზმებს. ამ დროს ბუნებრივი

განათება იშვიათად გამოიყენება, რადგან ის არ არის მუდმივი. როგორც წესი ფოფოტროფების კულტივირება ხდება ლუმინოსტატებში, რომლებიც აღჭურვილია ნათურებით. აუცილებელი ტემპერატურა აქ წარმოიქმნება მაცივრისა და ვენტილაციური მოწყობილობის ხარჯზე.

განათების წყაროს შერჩევა დამოკიდებულია მისი გამოსხივების სპექტრსა და ტალღების სიგრძეზე.

წყალი

მიკროორგანიზმთა ზრდა შეუძლებელია წყლის გარეშე, ის აუცილებლად უნდა იყოს გარემოში უჯრედისათვის ხელმისაწვდომ ფორმაში, ანუ თხევად ფაზაში. ბუნებაში და ლაბორაატორიულ პირობებში, საკვებ არეებში წყლის ნაწილი ასოცირებულია მასში გახსნილი ნივთიერებების მოლეკულებთან და არ არის ხელმისაწვდომი მიკროორგანიზმებისათვის. სუბსტრატში წყლის მისაწვდომობა გამოიხატება სიდიდით, რომელსაც წყლის აქტივობა ეწოდება

$$a_w=p/p^0$$

სადაც P-ხსნარის ორთქლის წნევა;

P^0-სუფთა წყლის ორთქლის წნევა მოცემული ტემპერატურის პირობებში.

a_w მნიშვნელობა დისტილირებული წყლისათვის არის 1.00. წყალში სხვადასხვა ნივთიერებების გახსნისას ეს მნიშვნელობა კლებულობს და შესაბამისად მცირდება უჯრედისათვის წყლის ხელმისაწვდომობა.

მიკროორანიზმები იზდება a_w=0.99-0.63 პირობებში. ბაქტერიებში წყლისადმი მოთხოვნა უფრო მაღალია, ვიდრე სოკოებსა და საფუვრებში.

გარემოში წყლის აქტივობა განისაზღვრება ფორმულით

$$a_w=A/100$$

სადაც A-ატმოსფეროს შედარებითი ტენიანობა (%). საკვებ არეში წყლის აქტივობის შესაცვლელად შეაქვთ NaCl, KCl, გლუკოზა, პოლიეთილენგლიკოლი.

პერიოდული და უწყვეტი კულტივირება. არსებობს მიკროორგანიზმთა თხევად საკვებ არეებში კულტივირების ორი პრინციპულად განსხვავებული მეთოდი. ერთ შემთხვევაში საკვებ არეში ინოკულაციის შემდეგ არ ემატება და არ გამოიტანება არცერთი კომპონენტი გარდა აირადი ფაზისა. ასეთ დახურულ სისტემას ეწოდება **პერიოდული კულტურა,** მასში უჯრედები არსებობს განსაზღვრული პერიოდის განმავლობაში, რომლის დროსაც იცვლება საკვები არის შედგენილობა და გარემო პირობები.

უწყვეტი კულტურა ხასიათდება საკვები არის მიწოდების იმავე სიჩქარით რა სიჩქარითაც მას აცილებენ მიკრობულ ბიომასას. ამ დროს ფერმეტიორში კულტურის მოცულობა არ იცვლება. უწყვეტი კულტივირების წარმატების ერთ-ერთი აუცილებელი პირობაა შერევის მაღალი ხარისხი.

სინქრონული კულტურა -კულტურა, რომლის უჯრედები იმყოფება განვითარების ერთი და იმავე სტადიაზე. კულტივაციის ამ მეთოდს იყენებენ უჯრედების "ასაკობრივი" თავისებურებების შესასწავლად.

თავი 9. მიკროორგანიზმთა კულტურების შენახვა

მინერალურ ზეთში შენახვა; ლიოფილიზაცია; მიკროორგანიზმთა შენახვა დაბალ ტემპერატურაზე; შენახვა გლოცეროლში; შენახვა დისტილირებულ წყალში; უჯრედების მშრალად შენახვა ადსორბენტებზე; მიკროორგანიზმთა სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა ხანგრძლივი შენახვის შემდეგ.

მიკროორგანიზმებთან მუშაობის აუცილებელი პირობაა მათი სწორი შენახვა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შესანარჩუნებლად. უნივერსალური მეთოდი, რომელიც გამოსადეგი იქნება ყველა მიკროორგანიზმისათვის არ არსებობს. თუმცა ერთ-ერთი ყველაზე ოპტიმალურია **პერიოდული გადათესვა**. აერობულ მიკროორგანიზმებს თესავენ სინჯარებში, დახრილ აგარზე, მიკროაეროფილებს ნახევრადთხევად საკვებ არეში, რომელიც შეიცავს 0.2-0.3% აგარს. ანაეობებს-თხევადი ან მყარი საკვები არის სიღრმეში. კულტურები ითესება ორ-ორ სინჯარაში, ერთი გამოიყენება სამუშაოდ, მეორე შესანახად და განსაახლებლად. გადათესვის სიხშირე ინდივიდუალურია თითოეული სახეობისათვის. უნდა შეირჩეს ოპტიმალური სიხშირე, რადგან ხშირი გადათესვა მიკროორგანიზმების ბიოქიმიურ აქტივობას აქვეითებს.

მინერალურ ზეთში შენახვა.

ეს მეთოდი გამოიყენება ბაქტერიებისა და მიკროსკოპული საოკოების შესანახად, მინერალური ზეთი ხელს უშლის საკვების გამოშრობას, აქვეითებს მეტაბოლურ პროცესებს უჯრედში და ახანგრძლივებს დროის ინტერვალს გადათესვებს შორის.

მას შემდეგ რაც მიკროორგანიზმებს განთესავენ მათ ოპტიმალურ საკვებ არეებზე და გაზრდიან, ზევიდან ასხამენ მინერალურ ზეთს - 0.8-0.9 სიმკვრივის მქონე სამედიცინო ვაზელინის ზეთი. გამოყენებამდე ზეთი სტერილდება 1 ატმ ავტოკლავში, შემდგე ტენის მოსაცილებლად ათავსებეს საშრობში 1სთ 150°C-მდე და ბოლოს ტოვებენ ოთახის ტემპერატურაზე 48-72სთ. კულტურებზე მისი გადასხმისას ზეთის შრის სისქე არ უნდა აღემატებოდეს 1სმ.

იოფილიზაცია.

ლიოფილიზაცია-გაყინული უჯრედების გაშრობა ვაკუუმის ქვეშ. ასეთი უჯრედები ინახება ვაკუუმის ქვეშ თავმოჩრჩილურ ამპულებში. ამ მეთოდით კულტურები ინახება 10-20 წელი.

მიკროორგანიზმებს ზრდიან ოპტიმალურ პირობებში სტაციონარულ ფაზამდე ან მოსვენებითი ფორმების მიღებამდე. შემდეგ ხდება უჯრედების ან მოსვენებული ფორმების მოთავსება ე.წ. დამცავ სითხეებში. წარმატებული ლიოფილიზაციისათვის დამცავ სითხეში უჯრედების სიმკვრივე უნდა იყოს მაქსიმალური-10^{9}-10^{10}-1 მლ. მიღებულ სუსპენზიას ათავსებენ ნეიტრალური მინისაგან დამზადებულ ამპულებში 0.5-1.0მლ და ყინავენ -20—70°C. შემდეგ აჩრჩილავენ თავს ვაკუუმით. ასეთი ამპულები ინახება სიბნელეში 4-6°C.

რეაქტივაციისათვის ლიოფილიზირებულ უჯრედებს უმატებენ 0.5მლ დისტილირებულ ან ონკანის წყალს. დეჰიდრატაციის შემდეგ უჯრედები გადააქვთ მდიდარ საკვებ არეებზე.

ლიოფილიზაცია არ არის უნივერსალური მეთოდი მიკროორგანიზმთა შენახვისა, მას ძალიან ცუდად ეგუება ფოტოტროფული და ქემოლითოტროფული ბაქტერიები, მიკოპლაზმები, მრავალი ობლიგატური ანაერობი, ზოგიერთი საფუარი.

მიკროორგანიზმთა შენახვა დაბალ ტემპერატურაზე.

ეს მეთოდი ყველაზე უნივერსალურია, თუმცა საჭიროებს ძალიან დიდ სიფრთხილეს თხევად აზოტთან მუშაობისას. გაყინვამდე უჯრედები სუსპენდირდება სხვადახვა ხსნარებში (მაგ.: 10-20% გლიცერინი), ათავსებენ ამპულებში და აჩრჩილავენ თავს, შემდეგ ყინავენ -70 ^{o}C და გადააქვთ თხევად აზოტში -196°C. ასეთი წესით შენახული უჯრედების გალღობა უნდა მოხდეს რაც შეიძლება სწრაფად, ამიტომ ამპულებს ათავსებენ წყლის აბაზანაზე 35-45°C, შემდეგ უჯრედები გადააქვთ მდიდარ საკვებ არეებზე.

შენახვა გლიცეროლში

ერთ-ერთი ყველაზე მოსახერხებელი მეთოდი უჯრედების შენახვა გლიცეროლში დაბალ ტემპერატურაზე. (-20°C). ძირითადად ამ მეთოდს იყენებენ სხვადასხვა მიკროორგანიზმების სპორების შესანახად.

შენახვა დისტილირებულ წყალში

ეს მეთოდი არ საჭიროებს სპეციალურ ხელსაწყოებს, ამ დროს მიკროორგანიზმები ინახება დისტილირებულ წყალში ან 1% NaCl ხსნარში. მიკროორგანიზმების ოპტიმალურ საკვებ არეებზე კულტივირების შემდეგ, ხდება უჯრედების სუსპენდირება დისტილირებულ წყალში ან NaCl ხსნარში, სიმჭიდროვე სასურველია 10^8-10^9/1მლ. ამის შემდეგ სუსპენზიას ჩაასხამენ სინჯარებში და ინახავენ მაცივარში ან ოთახის ტემპერატურაზე, ეს მეთოდი რეკომენდებულია სტაციონარულ ფაზაში მყოფი უჯრედების ან მოსვენებული ფორმების შესანახად.

უჯრედების მშრალად შენახვა ადსორბენტებზე

ეს მეთოდი გამოიყენება აქტინომიცეტების, მიკროსკოპული სოკოების და ანაერობული სპორაწარმომქმნელი ბაქტერიების შესანახად. ადსორბენტებად იყენებენ ნიადაგს, კვარცის ქვიშას, ბამბას, სილიკაგელს. მეთოდის არსი მდომარეობს იმაში, რომ ამპულაში ან სინჯარაში მოთავსებულ სტერილურ ადსორბენტში შეაქვთ შესანახი კულტურების სუსპენზია და ინახავენ მაცივარში ან ოთახის ტემპერატურაზე.

მიკროორგანიზმთა სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა ხანგრძლივი შენახვის შემდეგ ხდება მდიდარ საკვებ არეზე მისი განთესვით და გაზრდილი კოლონიების გადათვლით. მიკროორგანიზმების გადარჩენის პროცენტი გამოითვლება გადარჩენილი უჯრედების პროცენტული თანაფარდობით შენახული სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების საერთო რაოდენობის მიმართ, რომელიც 100 % მიიჩნევა.

თავი 10. მიკროორგანიზმთა კულტურებთან მუშაობის წესები

თესვის ტექნიკა; მიკროორგანიზმთა სუფთა კულტურები; დაგროვებითი კულტურა; სუფთა კულტურის მიღება ცალკეული კოლონიიდან; სუფთა კულტურის გამოყოფა ერთი უჯრედიდან ლინდნერის წვეთოვანი მეთოდი; სუფთა კულტურების გამოყოფა მიკრომანიპულატორის გამოყენებით; კულტურის სისუფთავის განსაზღვრა.

თესვის ტექნიკა. ლაბორატორიაში მიკროორგანიზმებს ზრდიან მყარ ან თხევად საკვებ არეებზე, პეტრის ჯამებზე, კოლბებში, სინჯარებში ან მატრაცებში(სურათი№-).

ჭურჭელს და საკვებ არეებს ასტერილებენ (იხილეთ შემდეგი თავები).

მიკროორგანიზმების გაზრდას საკვებ არეებზე ეწოდება ***კულტივირება***, ხოლო შედეგად განვითარებულ მიკროორგანიზმს-***კულტურა***. მიკროორგანიზმთა შეტანას რომელიმე საკვლევი მასალიდან სტერილურ საკვებ არეში ეწოდება ***დათესვა***. ხოლო ერთი საკვები არიდან მეორეში კი - ***პასირება ანუ გადათესვა***. მიკროორგანიზმთა თესვის პროცესი საჭიროებს მკაცრი წესების დაცვას, რათა თავიდან ავიცილოთ სუფთა კულტურის დაბინძურება გარეშე მიკროფლორით. დათესვამდე აუცილებელია ჭურჭელზე გაკეთდეს შესაბამისი წარწერა კულტურის დასახელებისა და დათესვის თარიღის შესახებ.

დასათესად ან პრეპარატის მოსამზადებლად მიკროორგანიზმთა უჯრედების აღება ხორციელდება ბაქტერიოლოგიურ მარყუჟით ან ნემსით (სურათი№---), იმ შემთხვევაში როცა მიკროორგანიზმები გაზრდილია მყარ საკვებ არეზე. თხევადი საკვები არის შემთხვევაში სასურველია ბაქტერიოლოგიური მარყუჟის ან პიპეტის გამოყენება. ბაქტერიოლოგიური მარყუჟები და ნემსები მზადდება ვოლფრამისგან და მაგრდება სპეციალურ სამაგრში, მარყუჟის თავის დიამეტრი 4-5მმ (სურათი№--).

გამოყენებამდე ბაქტერიოლოგიური მარყუჟი (ნემსი) სტერილდება ცეცხლის ალზე, მისი სტერილიზაციისას რეკომენდირებულია მარყუჟი დავიკავოთ ვერტიკალურად ცეცხლთან მიმართებაში, რათა ის თანაბრად გამოიწვას. გახურებისას უნდა გვახსოვდეს, რომ უმაღლესი ტემპერატურა ფიქსირდება ცეცხლის ალის პერიფერიულ და ზედა ნაწილებში, ამიტომ არ ღირს მარყუჟის დაშვება ცეცხლის ალში ძალიან ღრმად. სტერილიზაციის შემდეგ მარყუჟს სწრაფად აცივებენ სტერილური ჭურჭლის შიდა ზედაპირზე და სტერილურ საკვებ არეში, რათ არ მოხდეს მიკროორგანიზმების დაზიანება გახურებული მარყუჟით და მხოლოდ ამის შემდეგ იყენებენ მას მიკროორგანიზმების დასათესად.

მიკროორგანიზმების განთესვა შესაძლებელია სინჯარებში (მყარ ან თხევად საკვებ არეზე). აერობებისათვის საკვები არის მოცულობა სინჯარაში უნდა შეადგენდეს 1/3, ანაერობებისათვის -2/3. მყარი საკვები არის სინჯარებში სტერილიზაციის შემდეგ აუცილებელია სინჯარების დაცერება, რათა გავზარდოთ "სამუშაო" ფართობი.

კოლბები გამოიყენება მხოლოდ თხევად არეში მიკროორგანიზმთა კულტივირებისათვის. ხოლო პეტრის ჯამებზე მიკროორგანიზმები იზრდება მყარ საკვებ არეზე.

სინჯარას იკავებენ მარცხენა ხელით, ისე რომ დაცერებულ აგარზე დათესილი მიკროორგანიზმები ჩანდეს, მარჯვენა ხელის 1-3თითით უკავიათ მარყუჟი და ასტერილებენ, შემდეგ ფრთხილად ამავე ხელით, ისე რომ მარყუჟს ხელს არ უშვებენ ხსნიან საცობს, რომელიც უკავიათ ცეცხლის ალთან ახლოს, მარყუჟს ბოლომდე შეიყვანენს სინჯარაში, აგარის სიღრმეში, შემდეგ იღებენ მარყუჟის წვერით სათეს მასალას, საცობს გადაატარებენ ცეცხლის ალზე და დაახურავენს სინჯარას, ხოლო მარყუჟით სათესი მასალა შეაქვთ ან ახალ სინჯარაში დაცერებულ აგარზე ან თხევად საკვებ არეში ან პეტრის ჯამზე. თუ ცეცხლის ალზე გადატარებისას ბამბის საცობი აალდა, არ არის საჭირო მისი ჩაქრობა, დავახუროთ თავი სინჯარას და საცობი თავისით ჩაქრება. ასევე თუ მუშაობის პროცესში საცობი დავარდა მაგიდაზე, არ შეიძლება მისი აღება და კვლავ გამოყენება, ეს გამოიწვევს კულტურის დაბინძურებას. აუცილებელია ახალი სტერილური საცობის აღება. პეტრის ჯამზე დათესვა შესაძლელია მარყუჟით შტრიხების გაკეთებით აგარის ზედაპირზე, ან ასევე შეიძლება მარყუჟით მხოლოდ სათესი მასალის შეტანა და შემდეგ დრაგალსკის შპადელით თანაბარი გადანაწილება. გამოყენებული მარყუჟი სტერილდება ცეცხლის ალზე შეწითლებამდე ვერტიკალურად, ბოლოს გადაატარებენ ჰორიზონტალურად მთელს სიგრძეზე და ინახავენ.

თხევადი საკვები არიდან გადათესვისას მასალას იღებენ პიპეტებით, რომელსაც უნდა ჰქონდეს მორგებული ტუმბო ან ბამბის საცობი, უსაფრთხოების მიზნით. სუსპენზიის შესაბამის რაოდენობას გადაიტანენ ან ისევ თხევად საკვებ არეში, ან აგარიან საკვებ არეზე პეტრის ჯამზე, ამ შემთხვევაში გადანაწილება სათესი მასალის ხდება დრაგალსკის შპადელით. გამოყენებული პიპეტები უნდა მოთავსდეს 2-5% ფენოლის ან 2% ქლორამინის ხსნარში და მერე გაირეცხოს.

ყველა აღწერილი მანიპულაცია ტარდება ბოქსში გაზქურის ან სპირტქურის ალზე. დათესვის მერე მიკროორგანიზმები იზრდება შესაბამის პირობებში თემოსტატებში ან ანაეროსტატებში. მიკროორგანიზმთა კულტივირებას გარკვეული ტემპერატურული რეჟიმის პირობებში ეწოდება ***ინკუბირება ანუ ინკუბაცია*** (ლათ. Incubacio- გაზრდა).

მიკროორგანიზმთა სუფთა კულტურები

მიკროორგანიზმთა ფიზიოლოგიას, ბიოქიმიას, განვითარების თავისებურებებს როგორც წესი სუფთა კულტურებზე სწავლობენ. სუფთაა კულტურა, რომელიც შეიცავს მხოლოდ ერთი სახეობის უჯრედებს. მიკროორგანიზმებთა მუშაობის აუცილებელი პირობაა დაგროვებითი კულტურებიდან სუფთა კულტურის გამოყოფა. ეს პროცესი მოიცავს სამ ეტაპს:

- დაგროვებითი კულტურის მიღება;
- სუფთა კულტურის გამოყოფა;
- კულტურის სისუფთავის დადგენა.

დაგროვებითი კულტურა

დაგროვებით კულტურაში ჭარბობს ერთი ფიზიოლოგიური ჯგუფის ან ერთი სახეობის უჯრედები. მისი მიღებისა და გამოყენების მეთოდები მიკრობიოლოგიურ პრაქტიკაში დანერგა ს. ვინოგრადსკიმ და მ. ბეიერინკმა. მეთოდის არსი მდგომარეობს ისეთი ელექტიური ანუ შერჩევითი გარემო პირობების შექმნაში, რომელიც

უზრუნველყოფს მიკროორგანიზმთა შერეული პოპულაციებიდან სასურველი მიკროორგანიზმების უპირატესად განვითარებას.

ელექტიური პირობების შესაქმნელად აუცილებელია მოცემული მიკროორგანიზმების ფიზიოლოგიური თავისებურებებისა და მოთხოვნილებებლის ზუსტი ცოდნა. ეს პირობები ძირითადად იქმნება შესაბამისი საკვები არის შერჩევით, რადგან მიკროორგნიზმთა მოთხოვნილებები საკვები ელემენტების მიმართ განსხვავებულია. მაგ.; აზოტფიქსატორი მიკროორგანიზმები იზრდება საკვებ არეში, რომლის შემადგონლობაშიც არ არის აზოტის ბმული ფორმები, ამიტომ არეში ნიადაგის შეტანით შეიქმნება აზოტფიქსატორებისთვის ოპტიმალური პირობები. ავტოტროფული მიკროორგანიზმების დაგროვებით კულტურებს ღებულობენ საკვებ არეებზე, რომელშიც ნახშირბადის ერთადერთი წყარო ნახშირორჟანგია. ასეთ არეში ნახშირბადის სხვა ნაერთების არარსებობა ხელს უშლის ჰეტეროტროფების განვითარებას. იმ მიკროორგანიზმთა დაგროვებითი კულტურების მისაღებად, რომლებსაც ახასიათებთ მაღალი მოთხოვნები საკვები არის მიმართ გასხვავებულ მიდგომას საჭიროებს, ამ დროს უნდა იქნეს გათვალისწინებული შერეული პოპულაციების წევრების დამოკიდებულება გარემოში დაგროვებული ნივთიერებათა ცვლის პროდუქტების მიმართ. ზოგჯერ საჭირო ხდება საკვებ არეში ანტიბიოტიკების შეტანა, სხვადასხვა კულტურების ზრდის დათრგუნვის მიზნით. ასე მაგ.: გრამუარყოფითი მიკროორგანიზმების დაგროვებითი კულტურის მისაღებად აუცილებელია საკვებში პენიცილინის დამატება (0.2-100მგ/ლ), ამით ითრგუნება გრამდადებითი მიკროორგანიზმების ზრდა. ელექტიური პირობების შექმნისას ასევე აუცილებელია გათვალისწინებულ იქნეს მიკროორგანიზმთა განსხვავებული დამოკიდებულება აერაციის, განათების, ტემპერატურის მიმართ. რაც მთავარია ყურადღება უნდა მიექცეს მიკროორგანიზმის მიერ ენდოსპორის წარმოქმნის უნარს. სპორაწარმომქმნელი ბაქტერიების დაგროვებითი კულტურების მისაღებად საკვები არის ინოკულაცია ხდება წინასწარ პასტერიზებული (75-80°C) სუბსტრატით, რითაც თავიდან არის აცილებული იმ ბაქტერიების განვითარება, რომლებიც არ წარმოქმნის სპორებს. დაგროვებითი კულტურის მიღებაზე საუბრობენ ვიზუალური დათვალიერებით, მიკროსკოპირებით ან მეტაბოლიზმის პროდუქტების შესწავლით.

სუფთა კულტურის გამოყოფა

სუფთა კულტურის მიღება შეიძლება დაგროვებითი კულტურის ერთი კოლონიიდან ან ერთი უჯრედიდან.

სუფთა კულტურის მიღება ცალკეული კოლონიიდან

მიკროორგანიზმთა სუფთა კულტურების მიღების ძირითადი მეთოდი არის რ. კოხის მეთოდი. მისი პრინციპი მდგომარეობს ერთი კოლონიიდან სუფთა კულტურის გამოყოფაში. მაგრამ ამ მეთოდის გამოყენება შეუძლებელია მიკროორგანიზმებისათვის, რომლებიც ცუდად ან საერთოდ არ იზრდება მყარ საკვებ არეებზე. ასეთებია მრავალი ბაქტერია, წყალმცენარე და უმარტივესი.

აერობული მიკროორგანიზმების სუფთა კულტურების გამოყოფისას, დაგროვებით კულტურას თესავენ მყარი საკვები არის ზედაპირზე. ამისათვის, აგარიზებულ სტერილურ საკვებ არეს ჩამოასხამენ პეტრის ჯამებზე, გამყარების შემდეგ მასზე აწვეთებენ დაგროვებითი კულტურის სუსპენზიას (სუსპენზია მზადდება ან სტერილურ წყალში ან თხევად საკვებ არეში), შემდეგ დრაგალსკის შპადელით

თანაბრად ანაწილებენ კულტურას აგარის მთელ ზედაპირზე, ამავე შპადელით თანმიმდევრობით ეხებიან და ანაწილებენ მასზე არსებულ მიკროორგანიზმებს მე-2, 3, 4, 5 პეტრის ჯამზე. პირველ ორ პეტრის ჯამზე, როგორც წესი შეიმჩნევა მიკროორგანიზმთა ზრდა აგარის სრულ ზედაპირზე, შემდგომ პეტრის ჯამებზე კი, მიკროორგანიზმთა ცალკეული კოლონიების სახით. იგივე შედეგი მიიღწევა თუ მიკროორგანიზმთა დაგროვებითი კულტურის განთესვას მოვახდენთ მარყუჟით შტრიხის მეთოდით. საკვები არის ზედაპირზე აკეთებენ შტრიხებს სხვადასხვა მიმართულებით, როგორც ნაჩვენებია სურათზე (სურათი№---).

დათესვის შემდეგ პეტრის ჯამებს ათავსებენ თერმოსტატში თავდაღმა, რათა კონდენსატმა არ შეაფერხოს კულტურების ზრდა. კულტივირების ხანგრძლივობა დამოკიდებულია მიკროორგანიზმთა სახეობაზე. მიღებული იზოლირებული კოლონიები გადააქვტ მყარ ან თხევად საკვებ არეში სინჯარებში.

აეროტოლერანტული მიკროორგანიზმების იზოლირებული კოლონიები ძირითადად მიიღება სიღრმული კულტივირებით. ამისათვის, მყარ საკვებ არეს ჩამოასხამენ სინჯარებში 15-20მლ და ასტერილებენ. დათესვამდე სინჯარებს ათავსებენ თბილი წყლის აბაზანაზე. აკეთებენ დაგროვებითი კულტურების განზავებებს სტერილური ონკანის წყლით, განზავებების რაოდენობა დამოკიდებულია დაგროვებითი კულტურის სიმჭიდროვეზე (სასურველია, რომ 0.5-1.0მლ დათესვისას მივიღოთ იზოლირებული კოლონია). შესაბამისი განზავებიდან იღებენ 0.5-1.0მლ და გადააქვთ მყარ საკვებ არიან სინჯარებში, რომლებიც შემთბარია 45°C-50°C, კარგად აურევენ და სინჯარის შიგთავსს სტერილურად გადაიტანენ სტერილურ პეტრის ჯამზე. ინოკულირება ხდება თერმოსტატში. აგარის სიღრმეში გაზრდილ ცალკეულ კოლონიებს ამოჭრიან კაპილარული მილით ან მარყუჟით და გადაიტანენ ამ მიკროორგანიზმისათვის ოპტიმალურ თხევად საკვებ არეში.

ობლიგატურ ანაერობებთან მუშაობისას, კულტივირებისათვის იყენებენ ანაეროსტატს. მეთოდის არსი მდგომარეობს იმაში, რომ დაგროვებითი კულტურის განზავებებს აკეთებენ 45°C-50°C აგარიზებულ საკვებ არეში, სინჯარებში. საკვებს სწრაფად აცივებენ და ზევიდან ასხამენ სტერილურ პარაფინის და ვაზელინის ზეთის ნარევს (თანაფარდობით 3:1), რაც ხელს უშლის საკვებ არეში ჟანგბადის შეღწევას. კულტივირების შემდეგ, სინჯარიდან კოლონიების გამოსაყოფად მათ ათბობენ 45C^{o}-50C^{O} ისე რომ აგარი მოსცილდეს სინჯარის კიდეებს, შიგთავსი ფრთხილად გადმოაქვთ სტერილურ პეტრის ჯამებზე, იზოლირებული კოლონიების ამოსაჭრელად იყენებენ კაპილარს ან მარყუჟს და გადააქვთ სტერილურ თხევად საკვებ არიან სინჯარებში. სიღრმული კულტივირებისათვის რეკომენდებულია ღია ფერის საკვები არეების გამოყენება.

როცა საუბარია ექტსტრემალური ანაერობების სუფთა კულტურების მიღებაზე გამოიყენება ხანგეიტის მეთოდი. გათხიერებულ აგარიზებულ საკვებ არეში შეაქვთ დაგროვებითი კულტურა მასში ინერტული აირის გატარების პირობებში, რათა მოხდეს გარემოს განთავისუფლება ჟანგბადისაგან. შემდეგ სინჯარას ახურავენ რეზინის საცობს და ათავსებენ სამაგრზე, რომელიც ანჯღრევს, ატრიალებს მას, ამ დროს აგარის თხელი ფენა ეკვრის სინჯარის კიდეებს და მასში იზრდება კოლონიები, რომელიც შეუიარაღებელი თვალითაც კარგად ჩანს (სურათი№---).

სუფთა კულტურის გამოყოფა ერთი უჯრედიდან ლინდნერის წვეთოვანი მეთოდი.

ამ მეთოდს იყენებენ ძირითადად დიდი ზომის მიკროოგანიზმებთან მუშაობისას- საფუვრები, მიცელიალური სოკოები, წყლმცენარეები. დაგროვებით კულტურას აზავებენ თხევად საკვებ არეში, გადაანგარიშება კეთდება ერთეული უჯრედების გამოცალკევებაზე. შემდეგ სტერილურ სასაგნე მინაზე დააქვთ განზავებების წვეთები, ამზადებენ რა პრეპარატს "ჩაკიდული წვეთი". მიკროსკოპში დათვალიერებისას არჩევენ იმ წვეთს, რომელშიც ერთი უჯრედია, პრეპარატს ათავსებენ თერმოსტატში, ტენიან კამერაში, რომლის ფუნქციასაც ასრულებს ტენიანი ფილტრის ქაღალდით ამოფენილი პეტრის ჯამი. 12-24სთ შემდეგ კვლავ ხდება მიკროსკოპირება. იმ წვეთებს, რომლებშიც შეინიშნება მიკროკოლონიების წარმოქმნა ფრთხილად მოხსნიან სტერილური ფილტრის ქაღალდით და გადააქვთ სტერილურ საკვებ არიან სინჯარებში.

სუფთა კულტურების გამოყოფა მიკრომანიპულატორის გამოყენებით.

მიკრომანიპულატორი არის ხელსაწყო, რომელიც სპეციალური მიკროპიპეტით ან მიკრომარყუჟით იძლევა საშუალებას სუსპენზიიდან ერთი უჯრედის გამოცალკებისა. ამისათვის ამზადებენ პრეპარატს "ჩაკიდული წვეთი", სპეციალისტი მიკროსკოპში დაკვირვებით არჩევს იზოლირებულ უჯრედს ჩაკიდულ წვეთში და მიკროპიპეტით ფრთხილად გადააქვს ის თხევად საკვებ არიან სინჯარაში.

კულტურის სისუფთავის განსაზღვრა

კულტურის სისუფთავე დგინდება ვიზუალურად, მიკროსკოპირებით და რიგ საკვებ არეებზე განთესვით. ვიზუალური დაკვირვებისას მოწმდება შტრიხით განთესილი კულტურის თავისებურებები, თუ კულტურის ზრდა არაერთგვაროვანია შტრიხის მთელ სიგძეზე, მაშინ კულტურა დაბინძურებულია.

მიკროსკოპირებისას იყენებენ ფაზ-კონტრასტულ მიკროსკოპიას და ათვალიერებენ, როგორც ცოცხალ ასევე ფიქსირებულ, შეღებილ პრეპარატებს. სუფთა კულტურა როგორც წესი მორფოლოგიურად ერთგვაროვანია, დასაშვებია მხოლოდ ზომების უმნიშვნელო ვარირება. შესაბამის საკვებ არეებზე განთესვით ამოწმებენ გაზრდილი კოლონიების ერთგვაროვნებას. ამ დროს გამოყენებული საკვები არეების შემადგენლობა განისაზღვრება საკვლევი მიკროორგანიზმების მეტაბოლიზმის თავისებურებებით.

თავი 11. სტერილიზაციის მეთოდები

ფლამბირება ანუ გამოწვა; მშრალი ჰაერო სტერილიზაცია; სტერილიზაცია გამდინარე ორთქლით. ტინდალიზაცია; კოხის მადუღარა; წნევის ქვეშ ნაჯერი ორთქლით სტერილიზაცია; პასტერიზაცია; ცივი სტერილიზაცია-გაფილტვრა წვრილფოროვანი ფილტრებით.

სტერილიზაცია (ლათ. Sterilis - უნაყოფო), - ყოველივე ცოცხალისაგან განთავისუფლება ჭურჭლის, საკვები არეების და სხვა ნებისმიერი სუბსტრატის.

ცნობილია სტერილიზაციის სხვადასხვა ფორმა.

ფლამბირება ანუ გამოწვა

გამოწვა ხდება უშუალოდ გამოყენების წინ ისეთი მიკრობიოლოგიური იარაღების, როგორიცაა მარყუჟები, ნემსები, მეტალის საგნები (მაკრატელი, პინცეტი, ლანცეტი), ასევე მინის ჯოხები, სასაგნე და საფარი მინები.

მშრალი ჰაერით სტერილიზაცია

ამ მეთოდს იყენებენ ჭურჭლის და მშრალი მასალების დასამუშავებლად. მაგ.; ცარცის ან სახამებლის. სასტერილიზაციო ობიექტი უძლებს 170°C 2სთ (ათვლა იწყება ტემპერატურის მოცემულ ნიშნულამდე ასვლის შემდეგ). მშრალი სტერილიზაციისათვის გამოიყენება პასტერის ღუმელი ან ელექტროსაშრობი კარადები (სურათი). 170°C მაღლა ტემპერატურის აწევა არ არის რეკომენდირებული, რადგან ბამბის საცობები და გადასახვევი ქაღალდი იწყებს დაშლას-მუქდება და იფშვნება.

სტერილიზაციის წინ მინის ჭურჭელს უკეთებენ ბამბის საცობებს და გადაახვევენ ქაღალდში. პეტრის ჯამები, პიპეტები, ბამბა, დოლბანდი უნდა გადაიხვეს ქაღალდში ან მოთავსდეს მათთვის განკუთვნილ შესაბამის ფუტლიარში და პენალებში, რომელშიც სტერილური ჭურჭელი ინახება სტერილიზაციის შემდეგ.

სტერილიზაციის დასრულების შემდეგ კარადას აღებენ მხოლოდ მას შემდეგ რაც ტემპერატურის მაჩვენებელი დაიწევს ოთახის ტემპერატურამდე, წინააღმდეგ შემთხვევაში მინები დასკდება.

სტერილიზაცია გამდინარე ორთქლით. ტინდალიზაცია

სტერილიზაციის ეს მეთოდი (100°C) ოპტიმალურია ნივთებისათვის, რომელიც ფუჭდება მშრალი ჰაერით ზემოქმედებისას და ზოგიერთი საკვები არისათვის, რომელიც ვერ უძლებს მაღალ ტემპერატურას (ნახშირწყლების შემცველი საკვები). სტერილიზაციას აწარმოებენ კოხის მადუღარაში (სურ.), 30-30 წთ 3 დღე-ღამის განმავლობაში ყოველდღიურად. ასეთ სტერილიზაციას ეწოდება **წილადური სტერილიზაცია (ტინდალიზაცია)**.

კოხის მადუღარა - მეტალის მაღალი ცილინდრი, რომელსაც აქვს ორმაგი ფსკერი, იხურება კონუსისებური სახურავით, ამ უკანასკნელს გააჩნია არე თერმოსტატისათვის. გარედან ცილინდრი შემოფარგლულია ასბესტით ან ლინოლეუმით. მადუღარას ფსკერზე ისხმება წყალი, ფსკერის ზედა დასადგამს ასწევენ, რათა აამაღლონ სიმაღლე ორთქლის უკეთესი გამტარობისათვის და მასზე ათავსებენ

სასტერილიზაციო მასალას. სტერილიზაციის დროს ინიშნავენ სახურავიდან ორთქლის ინტენსიური გამოსვლის დაწყებიდან და 100°C ტემპერატურის ასვლის მომენტიდან.

100°C ერთჯერადი შეთბობით 30წთ განმავლობაში იღუპება მიკროორგანიზმთა ვეგეტატიური უჯრედები, მაგრამ არა სპორები. ამის შემდგომ საკვებ არეს ათავსებენ თერმოსტატში 28-30°C 24სთ, პირველი სტერილიზაციის პირობებში გადარჩენილი სპორები განვითარდება ვეგეტატიურ ფორმებად, ისინი კი იღუპება მეორე სტერილიზაციისას, ასევე 30წთ 100 °C, ეს პროცესი მეორდება სამჯერადად.

ნაჯერი ორთქლით სტერილიზაცია წნევის ქვეშ. ეს არის სტერილიზაციის ყველაზე სწრაფი და სანდო მეთოდი. მისი საშუალებით ხდება საკვები არეების და ჭურჭლის სტერილიზაცია.

ნაჯერი ორთქლით სტერილიზაცია წარმოებს ორმაგ კედლიან ქვაბში, რომელიც ჰერმეტულად იხურება-ავტოკლავში. (სურათი №---). ქვაბის მასიურ სახურავზე ან გვერდზე არის ორთქლის გამოსასვლელი ონკანი, მანომეტრი და დამცავი სარქველი. მანომეტრი აჩვენებს ქვაბის შიგნით არსებულ წნევას. იმ შემთხვევაში, როცა წნევა ადის მანომეტრზე მითითებულ ნიშნულზე მაღლა, იხსნება სარქველი და ორთქლი გამოიდევნება გარეთ.

მანომეტრის მაჩვენებლებს ატმოსფეროებში შეესაბამება შემდეგი ტემპერატურა:

წნევა, ატმ	ტემპერატურა, °C
0.5	115
1.0	120
1.5	127
2.0	133

სტერილიზაცია წარმოებს შემდეგი პრინციპით.

1. *მანომეტრზე აყენებენ სასურველ წნევის მაჩვენებელს შესაბამისი გასაღებით;*
2. *ავტოკლავში ასხამენ წყალს (გამოხდილს) გვერდით არსებული ძაბრიდან (№--), ამ დროს ავტოკლავის ზედა ონკანი (№--) უნდა იყოს ღია და ქვედა (№--) დაკეტილი; წყლის ჩასხმის დასრულების შემდეგ (წყლის დონე მოწმდება ძაბრის გაყოლებაზე არსებული მილით, ოპტიმალურია წყლის დონე ნაჭდევების შუაში) ქვედა ონკანს (№--) ხსნიან და ზედა ონკანს (№--) კეტავენ.*
3. *ალაგებენ ავტოკლავში სასტერილიზაციო მასალას და ახურავენ თავს.*
4. *როცა წნევა ქვედა მანომეტრში (№--) აიწევს შესაბამის ნიშნულამდე ზედა ონკანს (№--) ოდნავ აუშვებენ ჰაერის გამოსადევნად, მას შემდეგ რაც ორთქლი გამოჩნდება, ქვედა ონკანს (№--) კეტავენ და ხსნიან ბოლომდე ზედა ონკანს (№--).*
5. *სტერილიზაციის დროს ინიშნავენ, მას შემდეგ რაც ზედა მანომეტრში (№--) წნევა აიწევს შესაბამის ნიშნულამდე, სტერილიზაციის დროის გასვლის შემდეგ:*
6. *ზედა ონკანს (№--) კეტავენ და ფრთხილად ხსნიან ქვედა ონკანს (№--), აკვირდებიან ქვედა მანომეტრში (№--) წნევის დაკლებას.*
7. *მას შემდეგ რაც ქვედა მანომეტრში (№--) წნევა დავა ნულამდე და ორთქლის გამოსვლის პროცესი დასრულდება, ფრთხილად გვერდიდან ხსნიან ავტოკლავის თავს და ამოალაგებენ სტერილურ მასალას.*
8. *სტერილიზაცია დასრულებულია.*
9. *ავტოკლავთან მუშაობის წესები მოითხოვს აუჩქარებელ და ფრთხილ მიდგომას, თუ ორთქლის გამოშვებისას ან ონკანების გადაკეტვისას, ან ავტოკლავის თავის ახსნისას აჩქარდებით, ეს გამოიწვევს სტერილური საკვები არეების ამოღვრას ჭურჭლიდან, ან უსაფრთხოების წესების დაუცველობის შემთხვევაში დამწვრობას.*

ავტოკლავის გამოყენება შესაძლებელია ასევე წილადური სტერილიზაციისათვის, ამ დროს ავტოკლავის ჰერმეტული თავის ხრახნები არ იკეტება, რათა ორთქლს ჰქონდეს თავისუფლად გამოსვლის საშუალება.

საკვები არის ავტოკლავირებისათვის მოსამზადებლად, აუცილებელია შესაბამის ჭურჭელში (კოლბა, სინჯარა) ესხას სასტერილიზაციო არის მხოლოდ მესამედი, რათა თავიდან ავიცილოთ საცობების დასველება, კოლბებს და სინჯარებს უკეთდება ბამბის საცობები და გარედან ეკვრის ქაღალდი. ჭურჭელი ავტოკლავირებისას უნდა მოთავსდეს შესაბამის პენალებში ან გადაიხვეს ქაღალდით. სტერილიზაციის ხანგრძლივობა და ტემპერატურული რეჟიმის შერჩევა დამოკიდებულია სამუშაოს მიზანზე. ჭურჭელი, როგორც წესი სტერილდება 1ატმ 30-40წთ, საკვები არის სტერილიზაციის პირობები კი მითითებულია მის რეცეპტურაში და დამოკიდებულია შემადგენელი კომპონენტების თავისებურებებზე.

პასტერიზაცია

პასტერიზაცია არის არასრული ანუ ნაწილობრივი სტერილიზაცია, რაც გულისხმობს შეთბობას 65-80°C 10-30წთ შემდგომი სწრაფი გაცივებით 10-11 ^{o}C. ეს მეთოდი შემოთავაზებულ იქნა ლ. პასტერის მიერ უსპორო ბაქტერიების გასანადგურებლად ისეთ პროდუქტებში, რომლებიც ვერ უძლებს მაღალ ტემპაერატურაზე დამუშავებას (რძე, ლუდი, ღვინო).

ცივი სტერილიზაცია - გაფილტვრა წვრილფოროვანი ფილტრებით

ეს მეთოდი გამოიყენება საკვები არეების გასასტერილებლად, რომელთა კომპონენტები ადვილად მოდიფიცირდება მაღალი ტემპერატურის ზემოქმედებით.

ყველაზე ხშირად იყენებენ კაოლინისაგან დამზადებულ ფილტრებს. იმისათვის, რომ სითხემ გაიაროს ამ ფილტრში აუცილებელია ცილინდრის ორივე მხარეს შეიქმნას წნევის სხვაობა. ეს მიიღწევა ტუმბოების გამოყენებით, რომელთა საშუალებით გამოიდევნება ჰაერი (სურათი №--).

ცივი სტერილიზაციისათვის შეიძლება ასევე გამოყენებულ იქნეს მინის ფილტრი (სურათი №--) და კვარცის ქვიშისა და კაოლინის ნარევისაგან დამზადებული "შამბერლანის" სანთელი (სურათი №--). სანთელი უერთდება ბუნზენის კოლბას, ეს უკანასკნელი კი ვაკუუმის შემქმნელ ტუმბოს. ფილტრები და სანთლები გამოყენებამდე თავის სამაგრებთან ერთად სტერილდება ავტოკლავში.

ამ მეთოდის უარყოფითი მხარეა ძალიან ნელი ფილტრაცია და ფილტრის ხშირი გამოცვლის აუცილებლობა.

თავი 12. მიკროორგანიზმთა რაოდენობრივი აღრიცხვა

უჯრედების რაოდენობის განსაზღვრა; მიკროორგანიზმთა უჯრედების გადათვლა მიკროსკოპის ქვეშ; უჯრედების დათვლა სათვლელ კამერებში; უჯრედების დათვლა პერფილევის კაპილარებში; უჯრედების დათვლა ფიქსირებულ-შეღებილ ნაცხზე (ვინოგრადსკი-ბრიდის მეთოდი); უჯრედების დათვლა მემბრანულ ფილტრებზე; მიკროორგანიზმთა რაოდენობის განსაზღვრა საკვებ არეებზე განთესვით; კოხის მეთოდი (მყარ საკვებ არეებზე მიკროორგანიზმთა რაოდენობის განსაზრვრა); განზავებების მომზადება; დათესვა; მიკროორგანიზმთა უჯრედების რადოენობრივი აღრიცხვა თხევად საკვებ არეებში; განზავების მომზადება; დათესვა და შედეგების რეგისტრაცია; ბიომასის განსაზღვრა წონითი მეთოდით; უჯრედების რაოდენობის განსაზღვრა ნეფელომეტრული მეთოდით.

მიკროორგანიზმების ზრდის ინტენსივობაზე ბუნებრივ სუბსტრატში ან საკვებ არეში მსჯელობენ მათი უჯრედების რაოდენობის ან მოცულობის ერთეულში ბიომასის წონის განსაზღვრით. ეს მეთოდები შეიძლება იყოს პირდაპირი (მიკროსკოპის ქვეშ დათვლა) ან არაპირდაპირი (აწონვა). არაპირდაპირი მეთოდი ეყრდნობა იმ პარამეტრების განსაზღვრას, რომელთა მაჩვენებელი დამოკიდებულია მიკროორგანიზმების ბიომასაზე (კოლონიების რაოდენობა საკვებ არეზე სუსპენზიის განთესვის შემდეგ, უჯრედების სუსპენზიის მიერ სინათლის შთანთქმა, მათში ცილების რაოდენობის დადგენა და ა. შ.). მეთოდის არჩევა დამოკიდებულია კვლევის მიზანზე, საკვები არის ან სუბსტრატის ბუნებაზე.

მიკროორგანიზმთა რაოდენობის განსაზღვრისას, განსაკუთრებით ბუნებრივ სუბსტრატში, გასათვალისწინებელია ის ფაქტი, რომ უჯრედები უმეტეს შემთხვევაში იმყოფება ადჰეზირებულ (მიმაგრებულ) მდგომარეობაში ან მიკროკოლონიების სახით. ამიტომ დათვლის წინ აუცილებელია მათი დესორბირება (გამოცალკევება) სუბსტრატიდან და ერთმანეთისაგან. დესორბციის მეთოდის შერჩევა დამოკიდებულია საკვლევი სუბსტრატის თავისებურებებზე – უჯრედის სუსპენზიის მექანიკური მორევა, გასრესა, ულტრახმოვანი დეზინტეგრატორით ან ზედაპირულად აქტიური ნივთიერებებით დამუშავება და ა. შ.

უჯრედების რაოდენობის განსაზღვრა

მიკროორგანიზმთა უჯრედების გადათვლა მიკროსკოპის ქვეშ

მიკროსკოპის ქვეშ მიკროორგანიზმთა უჯრედების დასათვლელად გამოიყენება მათი ფიქსირებული და შეღებილი პრეპარატები სასაგნე მინებსა ან მემბრანულ

ფილტრებზე, სათვლელი კამერა, პერფილევის კაპილარები. დაანგარიშება ხდება სუბსტრატის გარკვეულ მოცულობაში, აუცილებელია როგორც ცოცხალი ასევე მკვდარი უჯრედების დათვლა. ამ მეთოდის წარმატების აუცილებელი პირობაა საკვლევი სუბტრატის გარკვეულ ერთეულში უჯრედების ძალიან მაღალი კონცენტრაცია.

უჯრედების დათვლა სათვლელ კამერებში. ეს მეთოდი რეკომენდებულია დიდი ზომის ობიექტების – საფუვრები, ერთუჯრედიანი წყალმცენარეები, სოკოს კონიდიები – დასათვლელად. ძირითადად იყენებენ გორაევი-ტომის კამერას (სურათი №--). ეს არის დანაყოფებიანი, მსხვილი სასაგნე მინა, მის ცენტრალურ ნაწილზე არის ერთგვარი "ბადე" – მისი თითოეული უჯრის ფართობი მინიშნებულია სასაგნე მინის უკანა მხარეს და შეადგენს 1/25მმ^2 (დიდი უჯრა), 1/400მმ^2 (პატარა უჯრა). სასაგნე მინის ერთი ნაწილი, რომელზეც განლაგებულია "ბადე" ჩაღრმავებულია და 0.1მმ (კამერის სიღრმრე, რომელიც ყოველთვის მინიშნებულია კამერაზე). უფრო ღრმად მდებარეობს, ვიდრე სასაგნე მინის ორი გვერდითი ნაწილი.

კამერასთან მუშაობისას აუცილებელია სამუშაოს თანმიმდევრობების მკაცრი დაცვა. საწყის ეტაპზე "ბადის" ჩაღრმავებას აფარებენ შლიფიან საფარ მინას და ოდნავი დაჭერით გადააადგილებენ მას საწინააღმდეგო მიმართულებით, ნიუტონის რგოლების გამოჩენამდე, ეს მიუთითებს, რომ სასაგნე მინა კარგად არის მიკრული კამერის გვერდებზე, მხოლოდ ამ პირობებში მიკროორგანიზმთა კამერაში დათვლილი მიკროორგანიზმების რაოდენობა იქნება ზუსტი. საკვლევი მიკროორგანიზმების სუსპენზია შეაქვთ კამერის გვერდიდან კაპილარების საშუალებით. უჯრედების დათვლის პროცესის დაწყება რეკომენდებულია კამერის შევსებიდან 3-5წთ-ის შემდეგ, რათა უჯრედები გადანაწილდეს კამერის ფსკერზე ისე რომ მათი ხილვა შესაძლებელი იყოს ერთ სიბრტყეში. მოძრავი უჯრედების დათვლამდე აუცილებელია მათი სითბური ან 0.5% ფორმალინის წყალხსნარით დამუშავება.

უჯრედების დასათვლელად გამოიყენება ×8 ან ×40 ობიექტივები. იმერსიული სისტემის გამოყენება არ შეიძლება, რადგან მისი ფოკუსური მანძილი ნაკლებია კამერის სისქეზე. ითვლიან უჯრედების რაოდენობას ბადის 10 დიდ ან 20 მცირე უჯრაში. დათვლისას დიდ უჯრებში უჯრედების რაოდენობა არ უნდა აღემატებოდეს 20, პატარა უჯრებში კი -10. წინააღმდეგ შემთხვევაში აუცილებელია საწყისი სუსპენზიის გაზავება ონკანის წყლით. დათვლილი უჯრედების რადოენობა არანაკლებ 600 უნდა იყოს.

დათვლის სიზუტე დამოკიდებულია იმაზე, თუ რამდენად მჭიდროდ არის მიყჯილი შლიფიანი საფარი მინა კამერის ზედაპირზე. დათვლის სიზუსტისათვის მიკროორგანიზმებს ითვლიან 2-3-ჯერ, და ყოველ ჯერზე დაიტანენ ახალ სუსპენზიას და კამერას აყენებენ თავიდან. 1მლ საკვლევ სუსპენზიაში უჯრედების რაოდენობას ითვლიან ფორმულით

$$M=a\times10^3/hS\times n,$$

სადაც, M – უჯრედების რაოდენობა 1მლ სუსპენზიაში,

a – უჯრედების საშუალო რაოდენობა ბადის უჯრაში,

h – კამერის სიმაღლე მმ,

S – ბადის უჯრის ფართობი მმ^2,
10^3 –სმ^3 მმ^3-ში გადაყვანის კოეფიციენტი
n – საკვლევი სუსპენზიის განზავება.

უჯრედების დათვლა პერფილევის კაპილარებში.

ბუნებრივ სუბსტრატში მიკროორგანიზმთა დასათვლელად ხშირად იყენებენ პერფილევის კაპილარებს. სუსბტრატში მათი ჩაძირვისას ის თავისი კაპილარული თვისებებიდან გამომდინარე ივსება ამ სუბსტრატით (მაგ. ნიადაგი), ამის შემდეგ კაპილარს ათავსებენ სასაგნე მინაზე, მის ბოლოზე ასხამენ გამლღვალ პარაფინს და ითვლიან უჯრედებს მიკროსკოპის ქვეშ, ×40 ან ×90 გადიდების ობიექტივის ან ფაზ-კონტრასტული მოწყობილობის გამოყენებით.

კაპილარის სიგრძე უნდა შეესაბამებოდეს მიკროსკოპის მოცემულ გადიდებაზე თვალთახედვის არის დიამეტრს. 1 მლ საკვლევ სუბსტრატში უჯრედების რაოდენობას გამოიანგარიშებენ ფორმულით:

$$M=a\times10^3/hld\times n,$$

სადაც, M – უჯრედების რაოდენობა 1მლ სუსპენზიაში,
a – უჯრედების საშუალო რაოდენობა კაპილარში,
h – კაპილარის სიმაღლე მმ,
l– კაპილარის სიფართე მმ,
d – თვალთახედვის არის დიამეტრი მოცემულ გადიდებაზე მმ.
10^3 –სმ^3 მმ^3-ში გადაყვანის კოეფიციენტი,
n – საკვლევი სუბსტრატის განზავება.

უჯრედების დათვლა ფიქსირებულ-შეღებილ ნაცხზე (ვინოგრადსკი-ბრიდის მეთოდი)

ამ მეთოდის უპირატესობა მდგომარეობს იმაში, რომ ფიქსირებული პრეპარატები დიდხანს ინახება და დათვლა შეიძლება განხორციელდეს მკვლევარისათვის ხელსაყრელ ნებისმიერ დროს.

სასაგნე მინა თავსდება მილიმეტრულ ქაღალდზე, რომელზეც მონიშნულია 4-6სმ^3 ფართობის კვადრატი. მიკროპიპეტით მინაზე დააქვთ საკვლევი სუსპენზიის 0.01, 0.02, ან 0.03მლ. და ამატებენ 0.0.3-0.1% წყლიან აგარს. სუსპენზიას თანაბრად ანაწილებენ სასაგნე მინის ზედაპირზე მილიმეტრულ ქაღალდზე მონიშნული ფართობის გასწვრივ. პრეპარატს აშრობენ ჰაერზე და აფიქსირებენ 10-20წთ 90% ეთილის სპირტში, შემდეგ ღებავენ ცილის ფუქსინით (1-2წთ) ან სხვა ნებისმიერი საღებავით. პრეპარატს გარეცხავენ წყლით (პრეპარატი არ უნდა გაირეცხოს გამდინარ წყალში) და აშრობენ ჰაერზე.

მიკროსკოპირება ხდება იმერსიული ობიექტივის გამოყენებით, სასურველია თვალის ლინზასა და შემგროვებელ ლინზას შორის მოთავსდეს "ბადიანი" ოკულარი, რომლის უჯრებშიც დაითვლება მიკროორგანიზმები, თუმცა იგივეს გაკეთება შესაძლებელია პირდაპირ თვალთახედვის არეში უჯრედების დათვლით. დათვლილი უჯრედების რაოდენობა უნდა იყოს არანაკლებ 600. 1 მლ საკვლევ სუბსტრატში მიკროორგანიზმების რაოდენობა გამოიანგარიშება შემდეგი ფორმულით:

$$M=aS/sV\times n,$$

სადაც

M – უჯრედების რაოდენობა 1მლ საკვლევ სუბსტრატში;

a –უჯრედების საშუალო რადოენობა “ბადიანი“ ოკულარის ერთ უჯრაში (თვალთახედვის არეში);

s - ოკულარული “ბადის” უჯრის (თვალთახედვის არის) ფართობი მკმ^3;

V - სასაგნე მინაზე დატანილი საკვლევი სუსპენზიის მოცულობა მლ;

S – მომზადებული ნაცხის ფართობი მკმ^2;

n – საკვლევი სუბსტრატის განზავება.

თვალთახედვის არის ან ოკულარის ბადის უჯრის ფართობს საზღვრავენ ობიექტ-მიკრომეტრის საშუალებით. თვალთახედვის არის ფართობი ანგარიშდება ფორმულით $S=\pi r^2$.

უჯრედების დათვლა მემბრანულ ფილტრებზე

ეს მეთოდები გამოიყენება ისეთი სუბსტრატების საკვლევად, რომლებშიც მიკროორგანიზმთა უჯრედების სიმჭიდროვე დაბალია. გამოყენებამდე ფილტრები იხარშება დისტილირებულ წყალში, იღებება კარბოლური ერითროზინით და ხდება მათი მიკროსკოპირება ბაქტერიალური დაბინძურების თავიდან ასაცილებლად. გადარჩეულ ფილტრებს კვლავ ხარშავენ დისტილირებულ წყალში ჰაერის და გამხსნელების მოსაცილებლად, დუღილისას აუცილებელია წყალი 2-3 გამოიცვალოს. შემდეგ ფილტრს ამაგრებენ სპეციალური დამჭერით ფორებიან სამაგრზე და მასში ატარებენ საკვლევი სუბსტრატის განსაზღვრულ მოცულობას. ფილტრზე დალექილი მიკროორგანიზმთა უჯრედებს ღებავენ კარბოლის ერითროზინით, ამისათვის ფილტრს თავდაღმა ათავსებენ პეტრის ჯამზე, რომელშიც ჩაფენილია შესაბამისი საღებავით გაჟღენთილი ფილტრის ქაღალდი, ახურავენ თავსახურს და აჩერებენ 3-24სთ. შემდეგ ფილტრს აშრობენ ჰაერზე და ამზადებენ პრეპარატს მიკროსკოპირებისათვის. სასაგნე მინაზე აწვეთებენ იმერსიულ ზეთს და მასში ჩაძირავენ მემბრანულ ფილტრს, ისე რომ მიკროორგანიზმთა უჯრედები იყოს ზევით. მათზე აწვეთებენ იმერსიულ ზეთს და აფარებენ საფარ მინას.

უჯრედების დათვლა ხდება იმერსიული ობიექტივის ×90 გამოყენებით. შემდეგი ფორმულით

$$M=aF\times10^6/sV,$$

სადაც

M – უჯრედების რაოდენობა 1მლ საკვლევ სუბსტრატში;

a –უჯრედების საშუალო რაოდენობა “ბადიანი“ ოკულარის ერთ უჯრაში (თვალთახედვის არეში);

s - ოკულარული “ბადის” უჯრის (თვალთახედვის არის) ფართობი მკმ^3;

V - გაფილტრული სითხის რაოდენობა მლ;

F – მემბრანული ფილტრის ფართობი მკმ^2;

n – საკვლევი სუბსტრატის განზავება.

10^6 –მმ^2 მკმ^2-ში გადაყვანის კოეფიციენტი.

მიკროორგანიზმთა უჯრედების დათვლა შესაძლებელია ასევე ფლუორესცენტული მიკროსკოპიით.

მიკროორგანიზმთა რაოდენობის განსაზღვრა საკვებ არეებზე განთესვით

მიკროსკოპის ქვეშ მიკროორგანიზმთა დათვლასთან შედარებით ამ შემთხვევაში ხდება მხოლოდ მოცემულ საკვებ არეზე სიცოცხლისუნარიანი კოლონიების დათვლა და შეუძლებელია სუსტად ზრდადი ან საერთოდ ზრდის უუნარო მიკროორგანიზმების რაოდენობის გათვალისწინება.

კოხის მეთოდი (მყარ საკვებ არეებზე მიკროორგანიზმთა რაოდენობის განსაზრვრა) – მეთოდის საფუძველს წარმოადგენს კოხის პრინციპი, რომლის თანახმად თითოეული კოლონია წარმოადგენს ერთი უჯრედის შთამომავლობას. ამ დროს მიღებულ შედეგებს მიიჩნევენ არა როგორც უჯრედების რაოდენობას არამედ როგორც პირობით ერთეულს-კოლონიაწარმომქმნელ ერთეულს (კოე). ეს მეთოდი სამ თანმიმდევრულ ეტაპს მოიცავს: განზავებების მომზადება, დათესვა პეტრის ჯამებზე და დათვლა.

განზავებების მომზადება

განზავებები მზადდება სტერილურ ონკანის წყალში ან 0.85% NaCl (ფიზიოხსნარი). სტერილური ონკანის წყალი ისხმევა სინჯარებში 9-9მლ, ან ჩასხმის მერე სტერილდება სინჯარებიანად. შემდეგ ემატება 1მლ საკვლევი მიკროორანიზმების სუსპენზია და ეს არის პირველი განზავება -10^{-1}, კარგად მორევის შემდეგ ამ სინჯარიდან 1მლ ხსნარი გადააქვთ მომდევნო სინჯარაში – 10^{-2} (მეორე განზავება) და ა. შ. განზავებების რაოდენობა დამოკიდებულია საწყის სუსპენზიაში მიკროორგანიზმთა პოპულაციის სიმჭიდროვეზე. აუცილებელი პირობა ჩატარებული სამუშაოების წარმატებისა არის თითოეული განზავებისათვის ახალი სტერილური პიპეტის გამოყენება.

დათესვა

დათესვა შესაძლებელია ზედაპირული ან სიღრმული მეთოდით. ზედაპირული დათესვისას საწყის ეტაპზე სტერილურ პეტრის ჯამებზე ჩამოასხამენ აგარიზებულ საკვებ არეს 10-15მლ, აყოვნებენ გასაცივებლად და გასამყარებლად, შემდეგ სასურველია ისინი შესლგდეს 2-3წთ თერმოსტატში თავდაღმა კონდენსატის მოსაცილებლად. ამის შემდეგ შესაბამისი განზავებიდან იღებენ სითხის გარკვეულ რაოდენობას (0.05, 0.1მლ) და აწვეთებენ პეტრის ჯამზე, განთესავენ მინის შპადელით, უკეთებენ წარწერას, როგორც წესი თითოეული განზავებისათვის კეთდება 2-4 პარალელი, ცდომილების თავიდან ასაცილებლად. თითოეული განზავებისათვის აუცილებელია ახალი მინის შპადელის გამოყენება, მაშინ როცა პიპეტი შეიძლება იყოს ერთი, თუმცა განთესვა უნდა დავიწყოთ ყველაზე დიდი განზავებიდან. პეტრის ჯამები ლაგდება თერმოსტატში თავდაღმა.

სიღრმული კულტივირებისას, საკვები არის ჩამოსხმა ხდება სინჯარებში, სადაც მისი 45-50°C გაცივების შემდეგ შეაქვთ მიკროორგანიზმთა სუსენზიის შესაბამისი განზავების ხსნარი, კარგად ურევენ და ჩამოასხამენ სტერილურ პეტრის ჯამებზე, გამყარების შემდეგ ალაგებენ თერმოსტატში. ასევე შესაძლებელია მიკროორგანიზმთა სუსპენზიის პირდაპირი შეტანა სტერილურ პეტრის ჯამზე და მერე მასზე 45-50°C გაცივებული აგარიანი საკვები არის დასხმა, სუსპენზიას პეტრის ჯამის ფრთხილი, ბრუნვითი მოძრაობებით გადაანაწილებენ თანაბრად და გამყარების შემდეგ შეალაგებენ

თერმოსტატში. ანაერობული მიკროორგანიზმების კულტივირებისათვის აუცილებელია ანაეოსტატის გამოყენება.

მიკროორგანიზმების გადათვლა ხდება როგორც წესი თავდახურულ პეტრის ჯამებზე, ქვედა მხრიდან, პეტრის ჯამს (ფუძეს) ყოფენ მარკერით სექტორებად, და ასევე თითოეულ გადათვლილ კოლონიას მარკერით აღნიშნავენ, რაც აადვილებს დათვლის პროცესს. საუკეთესო განზავებად ითვლება, ის რომლის განთესვის შემდეგაც პეტრის ჯამზე გაიზარდა 30-100 კოლონია. უჯრედების რადოენბას 1მლ სუბსტრატში ითვლიან შემდეგი ფორმულით:

$M= a\times10^n/V$,

სადაც

M – არის 1 მლ სუბსტრატში მიკროორგანიზმთა უჯრედების როდენობა;

10^n –განზავების კოეფიციენტი

a – კოლონიების საშუალო რაოდენობა განზავებაში, რომლიდანაც მოხდა ამოთესვა;

V – დასათესად აღებული სუსპენზიის მოცულობა.

მიკროორგანიზმთა უჯრედების რადოენობრივი აღრიცხვა თხევად საკვებ არეებში

მეთოდი გამოიყენება მიკროორგანიზმებისათვის, რომლებიც ძალიან ცუდად ან საერთოდ არ იზრდება მყარ საკვებ არეებზე.

განზავების მომზადება

განზავება მზადდება ისევე როგორც მყარის საკვები არეებისათვის.

დათესვა და შედეგების რეგისტრაცია

სინჯარებში ჩამოახამენ შესაბამის საკვებ არეს (თხევადს) და ასტერილებენ ან შეიძლება საკვები ჯერ გასტერილდეს და მერე ჩამოისხას სტერილურ სინჯარებში, აუცილებელია საკვები არეების ერთნაირი რაოდენობის ჩამოსხმა. ასეთ საკვებ არეებში, პიპეტით შეაქვთ ყოველი განზავებიდან სუსპენზიის გარკვეული რაოდენობა, პარალელების რაოდენობა არანაკლებ სამისა. სათესი მასალის მოცულობა როგორც წესი 1 მლ. დათესილ სინჯარებს ათავსებენ თერმოსტატში, ინკუბაციის პერიოდი სპეციფიურია თითოეული საკვლევი ობიექტისათვის. შედეგების რეგისტრაცია შესაძლებელია საკვები არის შემღვრევის ხარისხით, ფერადი რეაქციებით, საკვები არის ზედაპირზე აპკის წარმოქმნით, თუმცა ყველაზე ზუსტი არის რეგისტრაცია მაკ-კრედის ცხრილით. ამ დროს უნდა გამოითვალოს ციფრული მახასიათებელი ანუ- მარცხნიდან მარჯვნივ იწერება სინჯარების რაოდენობა, რომელშიც აღინიშნა მიკროორგანიზმთა ზრდა ყველა ჩათესილ პარალელში, შემდეგი ორი ციფრი კი არის წინა ორი განზავების სინჯარების რაოდენობა გაზრდილი მიკროორგანიზმებით, საბოლოო ჯამში მიიღება სამნიშნა ციფრი-ე.წ. ციფრული მახასიათებელი. ამის შემდეგ ცხრილში პოულობენ შესაბამის გრაფაში მიღებულ ციფრს და მის გაყოლებაზე დაფიქსირებულ ციფრულ მონაცემს, რომელიც შეესაბამება 1 მლ სუსპენზიაში მიკროორგანიზმების რაოდენობას მოცემულ განზავებაში.

მაგ.:

საწყისი სუსპენზიის განზავება: 0 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}

ჩათესილი სინჯარების

(პარალელების) რაოდენობა: 4 4 4 4 4

სინჯარების რაოდენობა,

რომელშიც შეინიშნება

მიკროორგანიზმთა ზრდა 4 4 3 1 0

ციფრული მახასიათებელი 431

უჯრედების რაოდენობა 1 მლ სუსპენზიაში -165

ბიომასის განსაზღვრა წონითი მეთოდით

ამ მეთოდს ხშირად იყენებენ თხევად საკვებ არეში მიკროორგანიზმთა როდენობრივი განსაზღვრისთვის. ის მოიცავს რამოდენიმე თანმიმდევრულ ეტაპს.

1. *ცენტრიფუგის სინჯარების ან ფილტრების დაყვანა მუდმივ წონამდე-ამისათვის ცენტრიფუგის ჭიქებს და პეტრის ჯამზე თავღიად განლაგებულ მემბრანულ ფილტრებს ათავსებენ საშრობ კარადაში - 80-85°C (ფილტრი) და 90-100 °C (ცენტრიფუგის ჭიქები) 1-2სთ. შემდეგ ჭურჭელს გადაიტანენ ექსიკატორში, რომელშიც მოთავსებულია უწყლო კალციუმის ქლორიდი ან კონცენტრირებული გოგირდმჟავა. 1 საათის გასვლის შემდეგ ფილტრებს და ცენტრიფუგის ჭიქებს წონიან ანალიზურ სასწორზე 0.0001გ სიზუსტემდე. ამ პროცესს იმეორებენ მანამ, სანამ ჭურჭლის წონა არ დავა მუდმივ სიდიდემდე. ცთომილება არ უნდა აღემატებოდეს 0.0001გრ.*
2. *მიკროორგანიზმების ბიომასის გამოცალკევება საკვები არისგან შესაძლებელია ცენტრიფუგირებით ან გაფილტვრით. ცენტრიფუგირების ხანგრძლივობა და ბრუნების რიცხვი დამოკიდებულია საკვლევი მიკროორგანიზმების ზომებზე. უფრო ხშირად ეს არის 5-10ათასი ბრ/წთ, 10-15წთ (ბაქტერიებისათვის). ცენტრიფუგირების მერე სუპერნატანტს (ზედა სითხეს) გადაღვრიან და დალექილ ბიომასას რეცხავენ ფიზიოლოგიური ხსნარით, ანუ ამატებენ ხსნარს, აცენტრიფუგირებენ იგივე სიჩქარეზე და კვლავ აცილებენ სუპერნატანტს.*
3. *სოკოებისა და აქტინომიცეტების უჯრედების დასალექად ძირითადად გამოიყენება მემბრანული ფილტრი. ფილტრს ათავსებენ სპეციალურ დამჭერში და მიკროორგანიზმთა ბიომასას გაფილტვრის მერე რეცხავენ ოდნავ შემჟავებული წყლით საკვები არის ნარჩენების მოსაცილებლად.*
4. *ბიომასის აწონვა-ამისათვის ცენტრიფუგის ჭიქებს ან ფილტრს დალექილი ბიომასით ათავსებენ საშრობ კარადაში და აშრობენ მუდმივი წონის მიღებამდე. ტემპერატურული რეჟიმი იგივეა, რაც იყო ცენტრიფუგის ჭიქებისა და ფილტრისათვის, მშრალ ბომასას ანგარიშობენ ფორმულით:*

$$M=(A-B)1000/V$$

სადაც

M – მშრალი ბიომასა გ/ლ;

A - ცენტრიფუგის ჭიქის ან ფილტრის მასა დალექილ ბიომასასთან ერთად;

B - ცენტრიფუგის ჭიქის ან ფილტრის მასა ბიომასის გარეშე;

V – კულტურალური სითხის რაოდენობა, რომელიც აღებულ იქნა გაფილტვრისა ან ცენტრიფუგირებისათვის (მლ).

უჯრედების რაოდენობის განსაზღვრა ნეფელომეტრული მეთოდით

ოპტიკურმა (ნეფელომეტრული, ტურბიდომეტრული) მეთოდმა ფართო გამოყენება პოვა მიკრობიოლოგიაში, რადგან საშუალებას იძლევა სწრაფად და ზუსტად განისაზღვროს მიკროორგანიზმთა უჯრედების რაოდენობა საკვლევ სუბსტრატში.

მეთოდის საფუძველს წარმოადგენს სინათლის რაოდენობის შემცირება მისი გატარებისას საკვლევი მიკროორგანიზმების უჯრედების სუსპენზიაში. გარკვეულ საზღვრებში ეს განპირობებულია უჯრედების მიერ სინათლის განბნევით და პროპორციულია მათი კონცენტრაციისა. ამ მაჩვენებლის სიდიდე დამოკიდებულია უჯრედების ფორმასა და ზომაზე, კულტურალური სითხის ოპტიკურ მახასიათებლებზე, სინათლის სხივის ტალღის სიგრძეზე და ა. შ. ამიტომაც ნეფელომეტრული მეთოდის გამოყენება უჯრედების დასათვლელად მიზანშეწონილია მხოლოდ იმ მიკროორგანიზმებისათვის, რომლებიც თხევად საკვებ არეში ზრდისას იწვევენ საკვები არის თანაბარ შემღვრევას და არ ხასიათდებიან ზრდა-განვითარების პროცესში უჯრედების ფორმისა და ზომის მკვეთრი ცვლილებით, მიცელიუმის ან აპკების წარმოქმნით. საკვები არე უნდა შეირჩეს აუცილებლად ოპტიკურად გამჭვირვალე.

სინათლის ინტენსივობის ცვლილებას მისი გატარებისას მიკროორგანიზმთა სუსპენზიაში ზომავენ ფოტოელექტროკალორიმეტრით (ფეკ) ან სპექტროფოტომეტრით. სასურველია შეირჩეს ოპტიმალური სინათლის ტალღის სიგრე 540-650ნმ და წითელი შუქფილტრი.

ზოგჯერ უჯრედული სუსპენზიის სიმჭიდროვეს გამოსახავენ ნეფელომეტრის მაჩვენებლებით, თუმცა უფრო უპრიანია კალიბრული მრუდის აგება, რომელზეც მოცემულია სინათლის სხივის განბნევისა და უჯრედების რაოდენობის ან ბიომასის ცვლილების ურთიერთდამოკიდებულება. ამისათვის, სხვადასხვა სიმჭიდროვის უჯრედულ სუსპენზიებს ფეკ-ზე ატარებენ და აბსცისთა ღერძზე აღნიშნავენ უჯრედების რაოდენობას საკვლევ სუსპენზიაში, ორდინატთა ღერძზე კი – ფეკ-ის მაჩვენებელს, ყოველი მიკროორგანიზმისათვის კალიბრული მრუდი არის ინდივიდუალური.

თავი 13. მიკროორგანიზმების უჯრედის ფორმა

ბაქტერიები; ჩხირისებრი ბაქტერიები; ძაფისებრი ფორმები; ხვეული ფორმები; სპიროქეტები; რიკეციები, ქლამიდიები, მიკოპლაზმები; მიქსობაქტერიები ანუ მოსრიალე ფორმები; აქტინომიცეტები; ნოკარდიები; მიკობაქტერიები; სოკოები; ზიგომიცეტები; ასკომიცეტები-ჩანთიანი სოკოები; დეიტერომიცეტები - უსრული სოკოები; საფუვრები.

აქტერიები. თანამედროვე პერიოდში აღწერილია ბაქტერიების 1600 მეტი სახეობა. მათი უმრავლესობა მორფო-ფიზიოლოგიური თავისებურებებით ერთმანეთისაგან განსხვავებული ერთუჯრედიანი ორგანიზმებია, ბაქტერიების ძირითადი ფორმების გაცნობა შესაძლებელია შემდეგი სახეობების მაგალითზე (სურათი №---):

სფეროსებრი ფორმის ბაქტერიები-კოკები (ლათ. ***kokkos***-მარცვალი, სფერო). ისინი იყოფა შემდეგ ჯგუფებად:

მიკროკოკი (ლათ. ***Micro***-მცირე). ბუნებაში გვხვდება ცალკეული სფეროსებრი უჯრედების სახით. წარმომადგენელი-***Micrococcus agilis***.

დიპლოკოკი (ლათ. ***Diplos***-ორმაგი)-ორ-ორად შეერთებული სფეროსებრი ბაქტერია. წარმომადგენელი-***Azotobacter chroococcum.***

სტრეპტოკოკები (ბერძნ. ***Streptos***-ჯაჭვი)-სფეროსებრი ბაქტერიები, რომლებიც, უჯრედის ერთ სიბრტყეში დაყოფის შედეგად წამოქმნიან ჯაჭვს. ამ გვარს მიეკუთვნება ძირითადად პათოგენური ბაქტერიები. ასევე რძემჟავა ბაქტერიები. წარმომადგენელი ***Lactococcus lactis***.

სარცინები (ლათ.-***sarceo***-შეერთებული)-სფეროსებრი ბაქტერიები, გაერთიანებული 8-8 უჯრედად. განლაგებულია კუბის სახით, თითოეული მხრიდან 4-4 უჯრედი. უჯრედის ასეთი ფორმა წარმოიქმნება მისი სამ ურთიერთპერპენდიკულარულ სიბრტყეში დაყოფის შედეგად. წარმომადგენელი-***Sarcina flava*** ჰაერის მიკროფლორის ფართოდ გავრცელებული წარმომადგენელი.

ყველა სფერული ფორმის ბაქტერიის დათვალიერება შესაძლებელია ფიქსირებულ და ფუქსინით შეღებულ პრეპარატებზე. გამონაკლისია ***Lactococcus lactis***

ჩხირისებრი ბაქტერიები.

მათ მიეკუთვნება გვარები-***Bacillus, Clostridium*** (სპორაწარმომქმნელი ბაქტერიები), ***Pseudomonas, Achromobacter. Lactobacillus*** და სხვა (არ წარმოქმნიან სპორას).

Pseudomonas stutzeri-ს ციტოპლაზმა იღებება თანაბრად რადგან ეს ორგანიზმი არ წარმოქმნის სპორებს, პრეპარატში უჯრედებს აქვს კარგად გამოკვეთილი ჩხირის ფორმა.

სპორაწარმომქმნელი ჩხირისებური ბაქტერიების გაცნობა შეიძლება ***Bacillus mycoides*** მაგალითზე, მისი ციტოპლაზმა იღებება, თუმცა არა სპოროგენული ზონა. ამიტომ მიკროსკოპის ქვეშ ბაცილა გამოიყურება არათანაბრად შეღებილი ჩხირის სახით. ეს უჯრედები მიეკუთვნება სტრეპტობაცილების ჯგუფს, რადგან განლაგებულია ჯაჭვის სახით.

ჩხირისებრი ბაქტერიების მორფოლოგიის შესწავლა ასევე ხდება ფიქსირებულ და შეღებილ პრეპარატებზე.

ძაფისებრი ფორმები

ეს არის ცილინდრული უჯრედების ჯაჭვები ხშირად გარშემორტყმული საერთო შალითით. ამ ფორმის ბაქტერიები გავრცელებულია ნიადაგში, წყალსატევებში, განსაკუთრებით რკინის მაღალი შემცველობის გარემოში.

ყველაზე ფართოდ გავრცელებული გვარია ***Leptothrix***, წლის მიკროორგანიზმი, მისი უჯრედები და გონიდიები იღებება წითლად, ხოლო შალითა რჩება უფერული. *გონიდიები*- ოვალური ან სფეროსებრი ფორმის წარმონაქმნები, ზოგ შემთხვევაში ივითარებენ შოლტებს. ამ სტრუქტურას წარმოქმნის ის ძაფისები ბაქტერიები, რომლებსაც ახასიათებს ძაფის დიფერენცირება.

ხვეული ფორმები –ამ ჯგუფის ბაქტერიებში გვხვდება შემდეგი ფორმები:

ვიბრიონი (ლათ***. vibrare***-დახვევა)-ოდნავ მოღუნული უჯრედები.

სპირილები (ლათ. ***Spiro***-შტოპორი). გრძელი, მსხვილი და ხვეული უჯრედები

სპიროქეტები – გრძელი, წვრილი ძლიერ დახვეული უჯრედები, მათი სიგრძე 5-200 აღემატება მათ სისქეს.

სპიროქეტები

მოძრავი ბაქტერიები, ძირითადად პათოგენური ფორმებია ***(Borellia, Leptospira, Treponema).*** უჯრედები ხვეული ცილინდრის ფორმისაა, სიგრძე მერყეობს 3-20მკმ, სიგანე 0.5-1.0მკმ. გრამუარყოფითი მიკროორგანიზმებია, მათ მორფოლოგიას სწავლობენ ცოცხალი პრეპარატების მომზადებით ბნელი და ფაზ-კონტრასტული მიკროსკოპიის მეთოდების გამოყენებით

რიკეტციები, ქლამიდიები, მიკოპლაზმები

რიკეტციები არის გრამუარყოფითი პოლიმორფული მიკროორგანიზმები-კოკები, ჩხირები, ძაფები, ზომით 0.5-3-4მკმ, ძაფების სიგრძე 10-40მკმ აღწევს. სპორებსა და კაფსულებს არ წარმოქმნიან.

ქლამიდიებს გააჩნიათ სფეროსებრი ან ჩხირისებრი ფორმა. ზომები მერყეობს 0.2-15.მკმ. ქლამიდიების მორფოლოგია და ზომა დამოკიდებულია მათ შიდაუჯრედული განვითარების სტადიაზე. რიკეტციები და ქლამიდიები შიდაუჯრედული პარაზიტებია.

მიკოპლაზმები განსხვავდება ბაქტერიებისაგან იმით, რომ არ გააჩნიათ უჯრედის კედელი, მის ნაცვლად ივითარებენ სამშრიან ლიპოპროტეიდულ ციტოპლაზმატურ მემბრანას, თუმცა იღებებიან გრამუარყოფითად და გააჩნიათ სხვადასხვა ფორმის უჯრედები-სფეროსებრი, ჩხირისებრი, ძაფისებრი.

მიქსობაქტერიები ანუ მოსრიალე ფორმები

ბაქტერიების ეს ჯგუფი ევოლუციური განვითარების უფრო მაღალ საფეხურზე დგას ვიდრე ზემოთ აღწერილი ფორმები. მიქსობაქტერიების ცალკეული წარმომადგენლების უჯრედში (***Sorangium, Polyangium***), სინათლის მიკროსკოპშიც კი გამოკვეთილად ჩანს დიფერენცირებული ბირთვი. ვეგეტატიურ უჯრედებს ჩხირის ფორმა აქვს, დაბერებასთან ერთად ისინი მოკლდება და გარდაიქმენა მიქსოსპორებად, რომლებიც ერთიადნება ლორწოთი და წარმოქმნის პირველად და მეორად ცისტას, ამ უკანასკნელისგან შემდგომში ვითარდება ნაყოფსხეულები.

მიქსობაქტერიები ფართოდ არის გავრცელებული ნიადაგში.

აქტინომიცეტები

აქტინომიცეტები (ბერძნ. ***Actis***-სხივი, ***mykes*** – სოკო)-სხივური სოკოები. მიკროორგანიზმების ამ ჯგუფს უკავია შუალედური მდგომარეობა ბაქტერიებსა და სოკოებს შორის. ისინი ერთუჯრედიანი ორგანიზმებია, ბაქტერიების მსგავსად, მაგრამ წარმოქმნიან მიცელიუმს, რითაც ემსგავსებიან სოკოებს. აქტინომიცეტებში მიცელიუმის ძაფების სიგრძე რამოდენიმე მმ აღწევს.

მყარ საკვებ არეებზე აქტინომიცეტები წარმოქმნის ფუმფულა, ხავერდოვან, მყარი კონსისტენციის კოლონიებს, რომელიც შეზრდილია სუბსტრატთან და აქვს მიწის სუნი. მიცელიუმი დიფერენცირებულია: სუბსტრატულ (ჩაძირულია სუბსტრატში) და საჰაერო (მდებარეობს სუბსტრატს ზევით) მიცელიუმად.

აქტინომიცეტების მრავალი წარმომადგენელი აპროდუცირებს პიგმენტებს, ამიტომ მათი მიცელიუმი ხშირად სხვადასხვა ფერისაა. აქტინომიცეტების მორფოლოგიის შესასწავლად, საწყის ეტაპზე ათვალიერებენ პეტრის ჯამზე გაზრდილ კოლონიებს მიკროსკოპის მცირე გადიდებაზე, აკვირდებიან სპორებისა და სპორამატარებლების ფორმასა და ზომას და ამის შემდეგ ამზადებენ ფიქსირებულ, შეღებილ პრეპარატებს. ამისათვის სასაგნე მინაზე დააქვთ აქტინომიცეტის მთლიანი კოლონია სუბსტრატული და საჰაერო მიცელიუმით. მეორე სასაგნე მინით ზევიდან აჭერენ რათა თანაბრად გაანაწილონ პრეპარატი, შემდეგ აშრობენ და აფიქსირებენ.

აქტინომიცეტებთან ძალიან ბევრი საერთო თავისებურება გააჩნია ნოკარდიებს ანუ პროაქტინომიცეტებს.

ნოკარდიები

ეს არის აქტინომიცეტების მცირედდიფერენცირებული ფორმები. მათ აქვთ სუსტად განვითარებული ან განუვითარებელი საჰაერო მიცელიუმი. მყარ საკვებ არეებზე კოლონიები პასტისებური კონსისტენციისაა, სახასიათო მიცელიალური არშიით. შეფერილობა აქტინომიცეტების მსგავსად განსხვავებულია. ახალგაზრდა ასაკში ნოკარდიები წარმოქმნიან მიცელიუმს, რომელიც მალევე იწყებს სეპტირებას (ძაფებში წარმოიქმნება ტიხრები) და ფრაგმენტაციას ჩხირისებურ ფორმებად, საბოლოოდ მოკლე ჩხირებისა ან კოკების წარმოქმნით.

პროაქტინომიცეტების ერთ-ერთი ფართოდ გავრცელებული წარმომადგენელია ***Nocardia rubra***.

მიკობაქტერიები

ჩხირისებური, დატოტვილი ბაქტერიები. ნამდვილი მიცელიუმი არ გააჩნიათ. კოლონიები პასტისებურია, აპროდუცირებენ პიგმენტებს. ახალგაზრდა კულტურებში წარმოიქმნება არასწორხაზოვანი ჩხირისებური ფორმის უჯრედები, ხშირად გვერდითი გამონაზარდებით. გადაბერებულ კულტურებში ისინი იშლება ჩხირებად ან კოკებად.

სოკოები

მიკრობიოლოგიის ობიექტს წარმოადგენს ასევე მიკროსკოპული სოკოები. ეს ეუკარიოტული ორგანიზმებია, მათი სხეული შედგება მიცელიუმისაგან- წვრილი ძაფების (ჰიფების) ერთობლიობა.

ზიგომიცეტები

უმდაბლეს სოკოებს გააჩნია კარგად დატოტვილი ერთუჯრედიანი მიცელიუმი. მრავლდებიან, როგორც უსქესო (სპორებით) ასვევე სქესობრივი გზით. მუკორის კლასის წარმომადგენელი (***Mucor mucedo***) ვითარდება თეთრი ან ნაცრისფერი ნაფიფქის სახით მცენარეული წარმოშობის პროდუქტებზე.

მათი მიცელიუმი ჩაზრდილია სუბსტრატში და ზევიდან ეფინება მას. ზედაპირზე კი წარმოიქმენა საჰაერო ჰიფები-სპორამატარებლები, რომელთა ბოლოებზეც არის სპორანგიები, შემდგომში ისინი სცილდება სპარანგიომატარებელს ტიხრით. მასში უსქესო გზით ვითარდება საპორანგიოსპორები-ენდოსპორები (ბერძნ. ***Endon***-შიგნით). სპორანგიის სპორანგიომატარებელთან გამყოფი ტიხარი თაღოვანი ფორმისაა და მას "თაღი" ეწოდება. მუკორის სოკოების მიკროსკოპირებისათვის პრეპარატორული ნემსით ფრთხილად იღებენ მიცელიუმის მცირე რაოდენობას და ათვალიერებენ შესაბამის გადიდებაზე.

ასკომიცეტები-ჩანთიანი სოკოები

უმაღლეს სოკოებს ახასიათებს მრავალუჯრედიანი მიცელიუმი და ჩანთებში – ასკებში განვითარებული სპორები. გამოყოფენ ორ ჯგუფს:

ეუასკომიცეტები - (ჭეშმარიტი ასკომიცეტები)-მათი ჩანთები სპორებთან ერთად წარმოიქმნება სქესობრივი გზით, ასევე შესაძელებელია უსქესო გამრავლება-კონიდიებით.

ჰემიასკომიცეტები-არ გაანიათ ნაყოფსხეულები.

ეუასკომიცეტების წარმომადგენლებია ***Penicillium*** და ***Aspergillus*** გვარის ნიადაგის სოკოები, რომელთაც ხშირად ობის სოკოებად მოიხსენებენ. მათ გააჩნიათ კარგად განვითარებული მრავალუჯრედიანი მიცელუმი. მრავლდებიან უმეტესად კონიდიალური სპიორამატარებლებით (სურათები№----).

Penicillium გვარის სოკოებს ზრდიან მყარ საკვებ არეებზე, მათი კონიდიომატარებლების დასათვალიერებლად ახალგაზრდა კულტურიდან ამზადებენ პრეპარატს, ამისათვის პრეპარატორული ნემსით პეტრის ჯამზე გაზრდილი სოკოს მწვანე და თეთრი მიცელიუმის საზღვარზე იღებენ თხელ ბლოკს (0.5მმ^2) და ათავსებენ სასაგნე მინაზე, რომელზეც წინასწარ დაწვეთებულია წყლის წვეთი. ზევიდან მიცელიუმზე აფარებენ საფარ მინას. ათვალიერებენ მიკროსკოპის შესაბამის გადიდებაზე. აქ მნიშვნელოვანია განათების დარეგულირება რათა მოხდეს სინათლის სხივების თანაბრად გატარება და პრეპარატის სრული ფიქსირება თავლთახედვის არეში. ათვალიერებენ ჰიფებს და კონიდიომატარებლებს (ისინი ხშირად სახატავი ფუნჯის ფორმისაა), აფიქსირებენ მათ ფორმასა და ზომას.

ასპერგილუსის პრეპარატი მზადდება მიკროსკოპირებისათვის ზემოთ აღწერილის მსგავსად, მგრამ აქ განსხვავებული სურათი გვხვდება, კერძოდ ერთუჯრედიანი სფეროსებრი კონიდიომატარებლები. მათზე პარალელურად განლაგებულია მოკლე სტერიგმები (სურათი№---). განვითარების ადრეულ სტადიაზე ასპერგილუსი გავს მუკორს და მხოლოდ ასაკთან ერთად მისი სპორამატარებლების თავები იფარება

სტერიგმებით და მიიღება ე. წ. ხვეული თავები. მუკორის სპორები ენდოგენური წარმოშობისაა, ხოლო ასპერგილუსისა და პენიცილიუმის-ეგზოგენური.

დეიტერომიცეტები-უსრული სოკოები

მათ გააჩნიათ მრავალუჯრედიანი მიცელიუმი, მაგრამ არ ახასიათებთ სქესობრივი პროცესი და სპორამატარებლების სრული სტადია. მრავლდებიან უსქესოდ კონიდიების საშუალებით ან ვეგეტატიურად ჰიფების მონაკვეთებით. ბუნებაში ფართოდ არის გავრცელებული გვარები-***Fusarium, Trichoderma, Alternaria***, ისინი გვხვდება მცენარეულ ნარჩენებზე, ნაყოფებზე, თესლებზე და ნიადაგში.

Fusarium გვარის წარმომადგენლებში გვხვდება ნიადაგსა და მცენარეულ ნარჩენებზე მცხოვრები საპროტროფები და პარაზიტები, რომლებიც იწვევენ მცენარეთა სხვადასხვა დაავადებებს.

ლაბორატორიულ პირობებში კულტივირებისას მყარ საკვებ არეებზე მათი კოლონიები სხვადახვა სტრუქტურისა და ფერისაა და განსხვავდება სახეობების მიხედვით. ისინი ინვითარებენ მაკრო და მიკროკონიდიებს, რომელთა დანახვა შესაძლებელია მიკროსკოპში შესაბამის გადიდებაზე.

Trichoderma-ს გვარის წარმომადგენლების აღმოჩენა შესაძლებელია ხეებზე, ჩამოცვენილ ფოთლებზე, ბალახოვანი და ბუჩქოვანი მცენარეების თესლებზე.

სუსლო-აგარზე მათი კულტივირებისას (23-25°C) 2-3 დღეში ჩნდება თეთრი, მოყვითალო-მომწვანო ელფერის მიცელიუმი, რომელიც ასაკთან ერთად მუქ მწვანე ფერში გადადის. მიკროსკოპის დიდ გადიდებაზე ჩანს დატოტვილი კონიდიები, კონიდიომატარებლების ბოლოებზე განლაგებული სფეროსებრი თავები, თითოეული შედგება 10-20 ერთუჯრედიანი უფერო კონიდიისაგან. ამ გვარის წარმომადგენლები აქტიურად შლიან ცილოვანი და ნახშირწყლოვანი ბუნების ორგანულ ნაერთებს, გააჩნიათ ანტიბიოტიკური თავისებურებები და აქედან გამომდინარე არიან გამაჯანსაღებელი ფუნქციის მატარებლები.

Alternaria-ს სხვადასხვა სახეობების გამოყოფა შეიძლება კარტოფილის ან ტომატის ფოთლებიდან, კომბოსტოს თესლიდან და ა. შ. გააჩნიათ მსხლისებური მრავალუჯრედიანი კონიდიები, რომლებიც ჯაჭვისებურად არის დაკავშირებული ერთმანეთთან. სუსლო-აგარზე განვითარებული კოლონიები საწყისად ღია, ჰაეროვანია, შემდეგ მუქდება და ხდება უფრო უხეში კონსისტენციის, ხშირ შემთხვევაში მუქი ფერის პიგმენტი დიფუნდირებს გარემოში.

შაფუვრები. თანამედროვე წარმოდგენით საფუვრები არის სოკოები, რომლებიც ასკომიცეტების კლასს მიეკუთვნება.

მათი უჯრედის დიამეტრი მერყეობს 8-15მკმ. ფორმა მრავალფეროვანია-ელიფსური, მსხლისებური, მრგვალი, ცილინდრული. მრავლდება ვეგეტატიური (დაკვირტვა, დაყოფა) ან სქესობრივი (სპორების წარმოქმნა) გზით.

დაკვირტვით გამრავლებად ფორმებს მიეკუთვნება "კულტურული" სოკოები – ***Sacharomyces*** გვარის წარმომადგენლები, დაყოფით მრავლდება გვარი-***Schizosacharomyces.*** სქესობრივი პროცესის დროს წარმოიქმნება სპორები, რომლებიც შემდგომ კოპულირებენ ერთმანეთთან. თითოეულ ჩანთაში წარმოიქმნება 2-8-12 სპორა. საფუვრებს შორის არის ასევე ასპოროგენული, ცრუ საფუვრები, რომლებსაც არ შესწევთ უნარი სქესობრივი გამრავლებისა, მათ უსრულ სოკოებს მიაკუთვნებენ.

Schizosacharomyces წარმომადგენლებიდან აღსანიშნავია ***Schizosacharomyces pombe*** (***Schizo***-დაყოფა, ***sacharomyces***-შაქრის სოკო, ***pombe***-აფრიკული სასმელის სახელწოდება, რომლისგანაც მოხდა ამ სოკოს გამოყოფა). საფუვრების უმრავლესობას დაყოფით გამრავლება არ ახასიაათებს, ამიტომ ეს სოკო წარმოადგენს ამ მხრივ გამონაკლისს. თუმცა მათ ახასიათებთ ასევე სპორაწარმოქმნის პროცესი ანუ სქესობრივი გამრავლება. დაყოფით მრავლდება ასევე ***Endomyces*** გვარის წარმომადგენლები.

დაკვირტვით გამრავლებად საფუვრებში "მოშინაურებულია" ***Sacharomyces cerevisiae.*** საცხობი საფუარი, რომელიც მრავლდება დაკვირტვით ან ასკოსპორებით.

ლაბორატორიული კვლევებისათვის შესაძლებელია გამოყენებულ იქნეს საცხობი საფუვრის მასა, მის მცირე ნაწილს იღებენ და დაშაქრულ წყალში ათავსებენ მეცადინეობამდე რამოდენიმე საათით ადრე, მიიღება მღვრიე მასა, რომლის წვეთს აწვეთებეს სასაგნე მინაზე, აფარებენ საფარ მინას და იმერსიით ახდენენ მიკროსკოპირებას. საცხობ საფუარში როგორც წესი ორი რასაა: ელიფსოიდური ფორმის სწრაფად კვირტვადი უჯრედები, და ცილინდრული ფორმის უჯრედები, რომლებიც დაკვირტისას წამოქმნიან ფსევდომიცელიუმს.

დაკვირტვით მამრავლი ასპოროგენული სოკოების ტიპიური წარმომადგენელია ***Candida cefiri***, მათი უჯრედები მცირე ზომისაა-5მკმ.

საფუვრების მსგავსი ორგანიზმების გამრავლება შეიძლება მოხდეს ასევე ჰიფების დაშლით ცალკეულ უჯრედებად-ოიდიუმებად ან ართროსპორებად. (***Geotrichum candida, Oidium lactis).***

თავი 14. მიკროორგანიზმთა უჯრედის ბიოქიმმიური შესწავლის მეთოდები

უჯრედების დაშლის მეთოდები; ჰომოგენიზაცია; უჯრედების გასრესა; უჯრედის გასრესა მინის ბურთულებით; ულტრახმოვანი დეზინტეგრატორით დამუშავება; ფრენჩ-პრესი; X-პრესი; უჯრედების ლიზისი ფერმენტების გამოყენებით; უჯრედების ლიზისი დეტერგენტების გამოყენებით; უჯრედების ლიზისი ორგანული გამხსნელებით; ლიზისი ოსმოსური შოკით; ლიზისი გაყინვა-გალღობის მონაცვლეობით; ცილის განსაზღვრა; ცილის განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით; ცილის განსაზღვრა ლოურის მიხედვით; ნუკლეინის მჟავების(ნმ) განსაზღვრა; დნმ-ის გამოყოფა-გასუფთავება და განსაზღვრა; დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების განსაზღვრა; ნმ-ის ჰიბრიდიზაცია; 5 S და 16S რნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების კატალოგიზაცია; პოლი- ß-ოქსიერბომჟავას განსაზღვრა; პოლისაქარიდების გამოყოფა და ანალიზი; მიკროორგანიზმების უჯრედის კედლის შემადგენლობა; უჯრედის კედლის ფრაქციების კვლევა; პეპტიდოგლიკანის შედგენილობის კვლევა.

უჯრედების დაშლის მეთოდები. შიდაუჯრედული კომპონენტების საკვლევად უმეტეს შემთხვევაში იყენებენ უჯრედების დაშლის სხვადასხვა მეთოდს. ეს შეიძლება იყოს ხელის ან მექანიკური ჰომოგენიზატორები, გაყინული უჯრედების გასრესა, ბიომასის მორევა მინის ბურთულებთან ერთად. უჯრედების სრული დაშლა მიიღწევა დეკომპრესიული მეთოდების (X-პრესი, ფრენჩ-პრესი) და ულტრახმოვანი დეზინტეგრატორის გმოყენებისას.

საკვები არიდან უჯრედების გამოცალკევების მეთოდები დამოკიდებულია მიკროორგანიზმების თავისებურებებზე. დიდი ზომის უჯრედებისათვის საკმარისია გაფილვრა ან ცენტრიფუგირება 2-3ათას g, მცირე ზომის უჯრედების ცენტრიფუგირების

ხანგრძლივობა და ბრუნების რაოდენობა გაცილებით მეტია -15-20ათასი g. საკვები არისაგან გამოლექილ ბიომასას რამოდენიმეჯერ რეცხავენ შესაბამისი საკვები არით (ნახშირბადის წყაროს გარეშე) ან ბუფერული ხსნარით მეტაბოლიზმის პროდუქტების მინარევებისაგან გასაწმენდად. უჯრედების დაშლის შემდეგ მიღებულ ექსტრაქტს გამოაცალკევებენ მთლიანი უჯრედებისაგან ცენტრიფუგირების შესაბამისი რეჟიმის შერჩევით (გამოიყენება მაცივრიანი ცენტრიფუგა) 15-40 ათასი g 1 სთ-ის განმავლობაში. ამის შემდგომ თუ ექტსრაქტში მაინც დარჩა ზედაპირზე მოტივტივე მცირე ზომის ნაწილაკები, მათი მოცილება შეიძლება გაფილტვრით.

ჰომოგენიზაცია

ჰომოგენიზაცია შეიძლება გამოყენებულ იქნეს მიკროორგანიზმებისათვის, რომელთაც გააჩნიათ თხელი უჯრედის კედელი ან საერთოდ არ აქვთ იგი, ასევე ცხოველური და მცენარეული წარმოშობის უჯრედებისათვის. ბუფერულ ხსნარში სუსპენდირებულ ბიომასას გადაიტანენ ხელის ჰომოგენიზატორში და გაატარებენ მასში 10-20-ჯერ. მექანიკური ჰომოგენიზატორების გამოყენებისას, რომელთაც გააჩნიათ სწრაფად მოძრავი "ფეხები" დამუშავების ხანგრძლივობა არ აღემატება 1-2წთ 20წთ ინტერვალებით, ყინულში ბიომასის გაცივების პირობებში. უჯრედების დაშლის ხარისხი მოწმდება ფაზ-კონტრასტული მიკროსკოპით ან გარემოში უჯრედის მიერ გამოთავისუფლებული ცილების რაოდენობით.

უჯრედების გასრესა

ერთერთი მარტივი, მაგრამ სანდო მეთოდი უჯრედების დაშლისა არის გასრესა. ამ მიზნისათვის გამოიყენებენ გარეცხილ კვარცის ქვიშას, ალუმინის ოქსიდის ფხვნილს ან სხვა მყარ ნივთიერებებს. დასაშლელად ბიომასას უმატებენ ამ ნაერთებს 1/2 თანაფარდობით და სრესენ ფაიფურის როდინში, ტეხვადი ხმების გაგონებამდე, ეტაპობრივად უმატებენ კვარცის ქვიშას ან სხვა მყარ ნივთიერებას. დამუშავების ხანგრძლივობა დამოკიდებულია უჯრედის სისქესე, თიითოეულ ჯერზე შეიძლება 30 გრ სველი ბიომასის დამუშავება. გასრესის შემდეგ უმატებენ თანაბარი რაოდენობით ბუფერულ ხსნარს და აცენტრიფუგირებენ დაშლილი უჯრედების გამოსაცალკევებლად მსხვილი ნაწილაკებისა და მყარი ნივთიერებებისაგან.

გასრესა მინის ბურთულებით

ამ მეთოდით მცირე რაოდენობის ბიომასა პირდაპირ სინჯარებში იშლება, მექანიკური "მომრევის" გამოყენებით ან დიდი რაოდენობით ბიომასისათვის გამოიყენება სპეციალური "წისქვილი".

გარეცხილი ბიომასა თავსდება ბუფერში და გადაიტანება ცენტრიფუგის ჭიქებში, რომელთაც კარგად ეხურებათ თავი, ცენტრიფუგის ჭიქაში ასევე შეაქვთ მინის ცივი ბურთულები 1-3გ ყოველ ერთ გრამ ბიომასაზე და ამაგრებენ მექანიკურ მომრევზე. ანჯღრევენ მაქსიმალურ სიჩქარეზე 3-5 ჯერ 1 წთ-ის განმავლბაში, პერიოდულად სუსპენზიას აცივებენ ყინულით.

ცდის დაწყებამდე მინის ბურთულები ირეცხება კონცენტრირებული მარილმჟავათი, ონკანის და დისტილირებული წყლით ნეიტრალური რეაქციის მიღებამდე, შემდეგ შრება საშრობ კარადაში. ამ მეთოის უარყოფითი მხარეა სინჯის ძლიერი გახურება ნჯღრევის პირობებში.

ულტრახმოვანი დეზინტეგრატორით დამუშავება

ულტრახმოვანი დეზინტეგრატორი შლის უჯრედებს ვიბრაციის მაღალი ხარისხის ხარჯზე, რის გამოც უჯრედები სკდება. მაქსიმალური ეფექტის მისაღებად აუცილებელია გამოსხივების სიმძლავრის შერჩევა და საკვლევ სინჯთან რეზონანსში მოყვანა. ასევე აუცილებელია ქაფის წარმოქმნის რეგულირება, რადგან ინტენსიური ქაფის წარმოქმნა იწვევს ცილების დენატურაციას.

დამასხივებელის ბოლოს ათავსებენ უჯრედების სუსპენზიაში 1-2სმ სიღრმეზე. მისი სიმძლავრე უნდა იყოს დარეგულირებული და სუსპენზიის რაოდენობასთან რეზონანსში მოყვანილი. დამუშავებისას გამოიყენება ცენტრიფუგის მინის ან პოლიეთილენის ჭიქები. ამ დროს მნიშვნელოვანია ყურადღება მიექცეს დამასხივებლის გადახურებას და მასალის ტემპერატურას, ინტერვალებში მათი გაცივება შესაძლებელია ონკანის გამდინარე წყლით და ყინულიანი კოლბით შესაბამისად.

დასაშლელი უჯრედების სუსპენდირება ხდება ბუფერის გაორმაგებულ მოცულობაში. დასხივების დრო ვარირებს 2-15წთ, თუმცა მუშაობის ინტერვალი არ უნდა აღემატებოდიეს 30წმ.

ამ მეთოდს იყენებენ გრამუარყოფითი და გრამდადებითი მიკროორგანიზების, ასევე აქტინომიცეტებისა და სოკოების უჯრედის დასაშლელად. ულტრახმოვანი ეფექტის გასაძლიერებლად დასაშლელი უჯრედების სუსპენზიას შეიძლება დაემატოს კვარცის ქვიშა ან მინის ბურთულები.

ფრენჩ-პრესი

ეს მეთოდი ეყრდნობა უჯრედების დაშლას წნევის სხვაობის ხარჯზე. ამ მაჩვენებლის სწრაფი ცვლილება ხეთქავს უჯრედებს შიგნიდან. მეთოდი გამოიყენება უჯრედების 10-30მლ მოცულობის სუსპენზიისათვის, უფრო მცირე მოცულობის შემთხვევაში მეთოდიკის გამართვა ტექნიკურად შეუძლებელია.

საკვლევი მიკროორგანიზმების უჯრედების მასას უმატებენ ბუფერს 1/1 ან 1/4 თანაფარდობით. სუსპენზიას ათავსებენ შესაბამის უჯრაში და დგამენ ჰიდრავლიკურ პრესში წნევის ქვეშ. სარქველის ნელი გაღებით არეგულირებენ ჰომოგენატის გამოსვლის სიჩქარეს, უფრო ხშირად ეს არის 1წვეთი/1წამში. ზოგიერტ მიკროორგანიზმს ესაჭიროება პრესით ორმაგი ან სამმაგი დამუშავება.

X-პრესი

მეთოდის ძირითად არსი იგივეა რაც ფრენჩ-პრესის შემთხვევაში, გამონაკლისი გახლავთ ის რომ ბუფერში სუსპენდირებულ უჯრედებს წინასწარ ყინავენს 70°C და მხოლოდ ამის შემდეგ ატარებენ პრესში. მიკროორგანიზმები ამ დროს ექვემდებარება წნევის ცვლილებას 500-100ატმ-მდე და დამატებით ყინულის ნაწილაკების ზემოქმედებას. უჯრედების დაშლის პროცესის ხანგრძლივობა ამ მეთოდით არ აღემატება 15-20წთ.

უჯრედების ლიზისი ფერმენტების გამოყენებით

მეთოდი შეიძლება განვიხილოთ ***E. Coli*** მაგალითზე. ლიზისისათვის უჯრედების სუსპენდირებას ახდენენ TE-ბუფერში (50mM ტრის HCL , Ph-8, 10mM EDTA), 3მლ ბუფერი ემატება 1 გრ სველ ბიომასას. ნარევს ათბობენ 37°C –მდე და უმატებენ 1მლ ლიზოციმის ხსნარს (ლიზოციმის ხსნარი TE ბუფერში 10მგ/მლ) 5მლ უჯრედების სუსპენზიაზე გათვლით. ინკუბაცია მიმდინარეობს 10-20წთ 37°C მსუბუქი შენჯღრევის პირობებში. თუ ლიზოციმის კონცენტრაციას გავზრდით უჯრედების ლიზისისათვის აუცილებელი დროის ხანგრძლივობა შემცირდება.

უჯრედების ლიზისი დეტერგენტების გამოყენებით.

სხვა მეთოდებთან შედარებით ეს არის უფრო მარტივი და რბილი მეთოდი უჯრედების დაშლისა, მაგრამ მისაღებია მხოლოდ იმ მიკროორგანიზმებისათვის , რომელთაც არ გააჩნიათ უჯრედის კედელი. ლიზისამდე უჯრედებს რეცხავენ რამოდენიმეჯერ ბუფერის მარილხსნარით (10mM ტრის HCl, Ph-7.5, 150mM NACl). ბოლო ცენტრიფუგირების შემდეგ უჯრედების სუსპენდირებას ახდენენ იგივე ბუფერში (3-4მგ/1მლ), უმატებენ 0.1-0.3% ტრიტონ X-100. ნარევს აინკუბირებენ 10-90წთ ყინულზე. ცილების სტაბილიზაციისათვის ექტრაქტს უმატებენ 50% გლიცეროლს (მოცულობის 0.2%). ტრიტონ X-100 ნაცვლად შეიძლება გამოყენებულ იქნეს სხვა არაიონური დეტერგენტები.

უჯრედების ლიზისი ორგანული გამხსნელებით

ამ მეთოდს მიმართავენ ფილტრზე დალექილი უჯრედების დასაშლელად ანტისხეულებთან რეაქციის ან ნმ ჰიბრიდიზაციის ჩასატარებლად. ამ მიზნით იყენებენ 0.1-1.0% ტოლუოლის ხსნარს შესაბამისი ბუფერში.

ლიზისი ოსმოსური შოკით

ეს მეთოდი გამოიყენება მიკროორგანიზმებისათვის, რომელთაც გააჩნიათ თხელი უჯრდის კედელი, ან საერთოდ არ აქვთ იგი, ასევე მიკროორგანიზმების სფეროპლასტების და პროტოპლასტების ლიზისისათვის. მარილების ან ნახშირწყლების მაღალი კონცენტრაციებით "დატვირთულ" უჯრედებს უქვემდებარებენ ფერმენტულ ლიზისს ლიზოციმის თანაობისას, შემდეგ აზავებენ დისტილირებული წყლით თანაფარდობით 1/10-50. მოქმედი კონცენტრაციები მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული საკვლევი შიდაუჯრედული ფერმენტის თავისებურებებზე, მიკროორგანიზმის სახეობაზე, ნაერთზე, რომელიც გამოიყენება მაღალი ოსმოსური წნევის შესაქმნელად და სხვა ფაქტორებზე.

ლიზისი გაყინვა-გალღობის მონაცვლეობით

ეს მეთოდი ძალიან მარტივი, სწრაფი და ხელმისაწვდომია. მრავალჯერადი გაყინვა უჯრედებისა ხდება თხევად აზოტიან აბაზანაში, გალღობა - თბილ წყალში, თუმცა მას აქვს გარკვეული შეზღუდვები: ასეთი მეთოდით დაშლილ უჯრედებს არ უნდა ქონდეთ ძალიან მყარი უჯრედის კედელი ან საერთოდ არ გააჩნდეთ იგი, ხოლო შიდაუჯრედული კომპონენტები ასეთი დამუშავების მიმართ შედარებით სტაბილური უნდა იყოს, არ უნდა განიცადოს დენატურაცია და დაცული უნდა იყოს პროტეოლიზისაგან.

ცილის განსაზღვრა

ცილის განსაზღვრა შესაძლებელია, როგორც ჭეშმარიტ ხსნარებში ასევე ჰიდროლიზებულ უჯრედებში. მეთოდის შერჩევა დამოკიდებულია ესქპერიმენტის მიზანზე. ამ დროს აუცილებელია კალიბრული მრუდის აგება ექსპერიმენტის მიმდინარეობის ანალოგიურ პირობებში ცილის ცნობილი რაოდენობების მიხედვით, ამ მრუდების ასაგებად ძირითადად გამოიყენება ხარის ან ადამიანის შრატი.

ცილის განსაზღვრა ბრედფორდის მიხევით

ეს არის სწრაფი და მარტივი მეთოდი ცილების განსაზღვრისა, რომელიც ეყრდნობა შესაბამის საღებავთან შეერთებული ცილების რაოდენობის განსაზღვრას, მისი დადებითი მხარეა სისწრაფე და მაღალი მგრძნობელობა, უარყოფითი-განსაზღვრაზე გამოყენებული ცილის შეუქცევადი დენატურაცია.

ამ მეთოდით ცილის განსაზღვრისათვის საჭიროა სპექტროფოტომეტრი ან ფოტოელექტროკალორიმეტრი (ფეკ) –სინათლის ტალღის შთანთქმის მაქსიმუმი 595ნმ. სტანდარტად იღებენ ხარის ან კვერცხის შრატის ალბუმინს (1მგ/1მლ).

სტანდარტული საწყისი ხსნარი შეიცავს 350მგ საღებავს (Serva Blue G ან Brilliant Blue R (sigma)), 100მლ 95% ეთანოლს, 200მლ 85% ორთოფოსფორმჟავას. ეს ხსნარი სტაბილურია ოთახის ტემპერატურაზე. სამუშაო ხსნარი შეიცავს 30მლ სტანდარტულ საწყის ხსნარს, 15მლ 95% ეთანოლს, 30მლ 85% ორთოფოსფორმჟავას, 425მლ დისტილირებულ წყალს. სამუშაო ხნსარი უნდა გაიფილტროს (№1, Whatman), მისი შენახვა შეიძლება ოთახის ტემპერატურაზე რამოდენიმე კვირის განმავლობაში პერიოდული გაფილტვრის პირობებში.

ცილის სინჯს (100მკლ) უმატებენ 100 მკლ ბუფერს და 1მლ სამუშაო ხსნარს, ურევენ და 2წთ ინკუბაციის შემდეგ განსაზღვრავენ ხსნარის ოპტიკურ სიმკვრივეს 595ნმ.

სტანდარტულ მრუდს აგებენ კვერცხის ან ხარის შრატის ალბუმინის გამოყენებით (2-20მკგ/100მკლ), ოპტიკური მაჩვენებელი 595ნმ უნდა მერყეობდეს 0.1-0.7 ფარგლებში.

ცილის განსაზღვრა ლოურის მიხედვით

მეთოდის უპირატესობაა სიზუსტე და უნივერსალობა, თუმცა აქვს უარყოფითი მხარეც, კერძოდ ფერადი რეაქციის ნელი მიმდინარეობა, ზოგიერთი რეაქტივის არასტაბილობა, და განსაზღვრაზე გაშვებული ცილის შეუქცევადი დენატურაცია.

ამ მეთოდით ცილის განსაზღვრისათვის საჭიროა სპექტროფოტომეტრი ან ფოტოელექტროკალორიმეტრი (ფეკ) –სინათლის ტალღის შტანთქმის მაქსიმუმი 750ნმ. სტანდარტად იღებენ ხარის ან კვერცხის შრატის ალბუმინს (1მგ/1მლ).

მზადდება ოთხი ტიპის ხსნარი:

A-0.5გრ $CuSO_4 \times 5H_2O$, 1გრ $Na_3C_6H_5O_7 \times 2H_2O$, 100მლ დისტილირებული H_2O;

B-20გრ Na_2CO_3, 4გრ NaOH, 1ლ დისტილირებული H_2O; (ხსნარები A და B მდგრადია ოთახის ტემპერატურის მიმართ)

C-50მლ ხსნარი B და 1მლ ხსნარი A (მზადდება უშუალოდ გამოყენების წინ);

D-ფოლინის რეაქტივი გაზავებული დისტილირებული წყლის ორმაგ მოცულობაში (მზადდება გამოყენების წინ, რეცეპტი იხ. დანართი).

0.5მლ საკვლევი ცილის სინჯს უმატებენ 2.5მლ ხსნარ C. შერევისა და5-10 წთ ოთახის ტეპერატურაზე ინკუბაციის შემდეგ უმატებენ 0.25მლ ხსნარ D. აჩერებენ ოთახის ტემპერატურაზე 20-30წთ და საზღვრავენ ხსნარის ოპტიკურ სიმკვრივეს 750ნმ.

ცილის ნიმუში შეიძლება გამოვაცალკევოთ განსაზღვრაში ხელის შემშლელი ნაერთებისაგან (აუცილებლობის შემთხვევაში) ტრიქლორძმარმჟავას დამატებით ან იგივე მიზნისათვის 1მლ ცილის ნიმუშს უმატებენ 0.1მლ 0.15% ნატრიუმის დეზოქსიქოლატის ხსნარს. ურევენ და აჩერებენ ოთახის ტემპერატურაზე 10წთ, შემდეგ ხსნარს უმატებენ 0.1მლ 72% ტრიქლორძმარმჟავას, მორევის შემდეგ წარმოქმნილ ნალექს აცილებენ ცენტრიფუგირებით- 1-3ათას g 5-30წთ.

თუ მეთოდის გამოყენება აუცილებლია ჰიდროლიზებულ უჯრედებში ცილის განსაზღვრისათვის, მაშინ უჯრედების ჰიდროლიზს აწარმოებენ 2M KOH $37^{o}C$ 2სთ, ან 10 წთ მდუღარე აბაზანაზე.

D ხსნარის დამატების შემდეგ, ფერადი რეაქციის მიმდინარეობის დრო 20-30წთ არ აღემატება.

ნუკლეინის მჟავების (ნმ) განსაზღვრა

ნმ კვლევას ერთერთი მნიშვნელოვანი ადგილი უკავია პროკარიოტების სისტემატიკასა და იდენტიფიკაციაში, ვინაიდან მათი სრული გენეტიკური ინფორმაცია მოცემულია დნმ-ის ერთ მოლეკულაში ეს აადვილებს საქმეს.

სხვადასხვა ბაქტერიების გენომებს ადარებენ მათი ზომები მიხედვით, ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობით, აზიტოვანი ფუძეების შემცველობით, დნმ-ის ჰიბრიდიზაციის ხარისხით. სხვადასხვა პროკარიოტებისათვის დადგენილია დნმ-ში გც მოლარული შემცველობა 23-75%. ეს მაჩვენებელი მუდმივია. თუ მოცემული პარამეტრით მიკროორგანიზმები განსხვავდება ერთმანეთისაგან (განსხვავება უნდა იყოს >10%) ეს ნიშნავს რომ ისინი სხვავდასხვა გვარს მიეკუთვნება. ამათანავე გც მოლარული შემცველობის მსგავსება ჯერ კიდევ არ არის ამ მიკროორგანიზმების ფილოგენეტიკური ნათესაობის მაჩვენებელი, რადგად ისინი შეიძლება განსხვავდებოდეს ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობით. ამიტომ მნიშვნლოვანია დნმ ან რნმ მონაკვეთების ჰომოლოგიის დადგენა, ასევე მარტივი და ხელმისაწვდომია შესადარებელი ობიექტების დნმ-დნმ ან დნმ რრნმ ჰიბრიდიზაციის მეთოდები.

დნმ გამოყოფა-გასუფთავება და განსაზღვრა

დნმ კვლევის საწყისი ეტაპი არის მათი გამოყოფა, ამისათვის მიმართავენ უჯრედების დაშლის მეთოდებს. მეთოდის შერჩევა დამოკიდებულია საკვლევი მიკროორგანიზმის თავისებურებებზე. ამის შემდგომ ხდება დნმ გაწმენდა უჯრედული კომპონენტებისა და სხვა მინარევებისაგან. ამისათვის ძირითადად იყენებენ ქლოროფორმ-იზოამილის სპირტის ან ფენოლ-ქლოროფორმის ხსნარებს, დნმ-ის შემდგომი დალექვით ეთანოლის საშუალებით. რნმ კვალისაგან დნმ მოლეკულები სუფთავდება რნ-კაზების დახმარებით, ცილებისაგან კი –პროტეაზებით. დნმ აშრობენ ვაკუუმით და ინახავენ $4^{o}C$.

დნმ ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის განსაზღვრა

ნმ გც მოლარული (%) თანაფარდობის დასადგენად გამოიყენება ორი მეთოდი: ერთი ეყრდნობა სიმკვრივის განსაზღვრას, ხოლო მეორე დნობის ტემპერატურის მრუდების ანალიზს (T_m). ორივე შემთხვევაში სტანდარტად გამოიყენება ცნობილი შემადგენლობის დნმ, გამოყოფილი იმავე მეთოდით, როგორითაც საკვლევი დნმ.

დნმ სითბური დენატურაცია ეყრდნობა ნატიური დნმ ნუკლეოტიდებს შორის წყალბადური ბმების გახლეჩას და მათ დაშორიშორებას ხსნარის ტემპერატურის მატებისას. ერთძაფიანი დნმ შთანთქმის სპექტრი 260ნმ 40%-ით მეტია, ვიდრე ორძაფიანისა. დნმ-ის ხსნარის გაცხელებისას ერთძაფიანი დნმ პროცენტული რაოდენობა მატულობს და ადგილი აქვს შთანთქმის სპქტრის მატებას 260ნმ (ჰიპერქრომიზმი). დნმ მოლეკულაში წყალბადური ბმების სიმყარე გც შორის მეტია, ვიდრე ათ წყვილში. ამიტომ, რაც მეტია დნმ მოლეკულაში გც რაოდენობა, მით მეტი ენერგია არის საჭირო ძაფების განცალკევებისათვის. ლღობის ტემპერატურის მაჩვენებელი (T_m) შეესაბამება ტემპეატურას, რომლის დროსაც ხსნარი შეიცავს 50% დნმ-ის დაშლილ ძაფებს (50% ჰიპერქრომიზმის ტემპერატურა). ეს მაჩვენებელი სწორხაზოვნად შეესაბამება დნმ გც თანაფარდობას 30-70% ფარგლებში.

დნმ ხსნარი მიჰყავთ 25მკგ/მლ სიმკვრივემდე (A_{260}=0.50), 1სმ კვარცის კიუვეტებში, რომელთაც აქვთ ჰერმეტული სახურავი და ტემპერატურის ფიქსატორი. კიუვეტებს ათავსებეს სპექტროფოტომეტრში, რომელიც აღჭურვილია თერმოსტატის მოწყობილობით. ტემპერატურას აყენებენ 25°C, არეგისტრირებენ 260ნმ საკვლევ კიუვეტაში არსებული ხსნარის შთანთქმის სპექტრს საკონტროლო ხსნართან მიმართებაში. ტემპერატურას ეტაპობრივად უწევენ (0.5^{o}C/წთ) და მუდმივად არეგისტრირებენ შთანთქმის სპექტრს. ტემპერატურის ის მაჩვენებელი, რომელიც იძლევა შთანთქმის 50%-იან მატებას შეესაბამება მოცემული დნმ T_m მნიშვნელობას.

ამის შემდეგ აწარმოებენ გადაანგარიშებებს, მასზე ზეგავლენას ახდენს ბუფერის კონცენტრაცია, რომელშიც ხდება შთანთქმის სპექტრის განსაზღვრა. რადგან T_m მნიშვნელობა ლოგარითმულად არის დამოკიდებული ხსნარში ნატრიუმის იონების კონცენტრაციაზე. სითბური დენატურაციისას ყველაზე ხშირად იყენებენ ციტრატულ ბუფერს (1×SSC, 0.015 სამჩანაცვლებული ნატრიუმის ციტრატი 0.15M NACl, PH 7.0) ამ ბუფერული ხსნარისათვის დადგენილია შემდეგი თანაფარდობა:

გც მოლარული შემცველობა (%) =2.44T_m-169.00

თუ დნმ მოლეკულაში გც თანაფარდობა მაღალია, მაშინ გამოიყენება გაზავებული ბუფერები 0.33 ან 0.1 ჯერადი SSC ბუფერის ხსნარი. მათთვის ტოლობა გამოიყურება შემდეგი სახით:

0.33×SSC:გც მოლარული შემცველობა (%)=2.47T_m-135.14;

0.1×SSC: გც მოლარული შემცველობა (%)=2.08T_m-106.40.

დნმ სიმკვრივის განსაზღვრის მეთოდი ეყრდნობა იმ ფაქტს, რომ თუ დნმ დავაცენტრიფუგირებთ CsCl სიმკვრივის გრადიენტში, გარკვეული დროის შემდეგ ის დაიკავებს თავისი სიმკვრივის შესაბამის ადგილს მოცემულ გრადიენტში. დნმ სიმკვრივის მაჩვენებელს, რომელიც წამოიქმნება ცენტრიფუგის ჭიქის პიკის შუაში ე. წ. **ტივტივის სიმკვრივე ქვია**. ის სწორხაზოვნად არის დამოკიდებული დნმ გც მოლარულ თანაფარდობაზე. ამ მეთოდის განსახორციელებლად მშრალ CsCl ხსნიან ბუფერში (50მ Tris-HCl, Ph 7.3)1.7გ/სმ^3 სიმკვრივემდე და შეაქვთ 2-3მკგ საკვლევი და საკონტროლო (ცნობილი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების) დნმ. ხსნარი გადააქვთ ცენტრიფუგის ჭიქებში და აცენტრიფუგირებენ 150 20წთ 25°C. ამის შემდეგ დნმ სიმკვრივის გრადიენტი განისაზღვრება საკვლევი დნმ შუა პიკსა და საკონტროლო დნმ შუა პიკს შორის მანძილის აზომვით. აქ მნიშვნელოვანია მარკერული (საკონტროლო) დნმ სწორი შერჩევა, რათა მისმა პიკმა არ გადაფაროს საკვლევი დნმ პიკი. დნმ ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობასა და მის სიმკვრივეს შორის აღინიშნება შემდეგი დამოკიდებულება:

P=1.660+0.098(გ+ც)

ნმ ჰიბრიდიზაცია. ეს მეთოდები ძირითადად გამოიყენება მიკროორგანიზმთა იდენტიფიკაციისას. მათი საშუალებით შესაძლებელია მოცემულ ორგანიზმებს შორის გენეტიკური კავშირების დადგენა. მეთოდის პრინციპი მდგომარეობს საკვლევი ორგანიზმებიდან გამოყოფილი დნმ დენატურაციაში სითბური მეთოდით და თითოეული

ჯაჭვის ფილტრზე ფიქსაციაში. ტემპერატურის დაკლებისას ხდება განცალკევებული ჯაჭვების რენატურაცია კომპლემეტარობის პინციპის შესაბამისად. რენატურირებული ორსპირალიანი დნმ რაოდენობა არის შესადარებელი მიკროორგანიზმების გენომების მსგავსების მაჩვენებელი.

ჰიბრიდიზაციისას ფილტრზე ამაგრებენ ერთჯაჭვიანი დნმ-ის ფრაგმენტს (დნმ-რეპერი, მარკერი, კონტროლი) ცნობილი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობით და ამატებენ რადიოაქტიურად მონიშნულ ფრაგმენტებს საკვლევი შტამის ერთჯაჭვიანი დნმ-ისა. ნიშნული დნმ (ზონდი) უნდა შეადგენდეს 1/300, 1/500 ნაწილს ფილტრზე მიმაგრებული არანიშნული დნმ - რეპერისა. თუ ზონდის შეკავშირების ხარისხი რეპერთან არის 100-70% ფარგლებში, საუბარია შტამებს შორის არსებულ სხვაობაზე, 70-50% გვარის დონეზე, ხოლო 50% ნაკლები სახეობის დონეზე.

ჰიბრიდიზაციისათვის საწყის ეტაპზე ხდება დნმ გამოყოფა და ულტრახმოვანი დეზინტაგრატორით მისი ფრაგმენტაცია 300-350 წყვილ ნუკლეოტიდის შემცველ მონაკვეთებად (განისაზღვრება ელექტროფორეზით 1% აგაროზაში). შემდეგ ხდება ამ ფრაგმენტების დენატურაცია შეთბობით და მიმაგრება ნიტრაცელულოზურ ფილტრზე. საკვლევი შტამის დნმ მზადდება ანალოგიური მეთოდით მხლოდ მასში შეჰყავთ რეაქტიული ნიშნული ნიკ-ტრანსლაციის გზით ნიშნული ნუკლეოზიდ-5-ტრიფოსფატის საშუალებით დნკაზა 1 და დნმ პოლიმერაზა 1 (E.Coli) ერთდროული მოქმედების თანაობისას. ჰიბრიდიზაციას აწარმოებენ გერხარდტის მეთოდით 20% ფორმამიდში 62°C 18-24სთ (რბილი რენატურაცია), შემდეგ რეცხავენ შეუკავშირებელი ნიშნული დნმ ფრაგმენტების მოსაცილებლად. ჰომოლოგიური დნმ ჰიბრიდიზაციას მიიჩნევენ 100% და ანგარიშობენ რეპერი და საკვლევი დნმ შეკავშირებული ფრაგმენტების პროცენტულ მაჩვენებელს. ეს მაჩვენებელი დნმ ჰომოლოგიას შეესაბამება და ადასტურებს საკვლევი ორგანიზმების გენეტიკურ კავშირს, ანალოგიურად ხდება დნმ-რნმ ჰიბრიდიზაცია.

5S და 16S რრნმ ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების კატალოგიზაცია

ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების განსაზღვრით შეიძლება ორგანიზმებს შორის ფილოგენეტიკური ანალიზის ჩატარება. მათი შედარება ხდება მსგავსების კოეფიციენტის (S_{AB}) დადგენით და მის საფუძველზე დენდროგრამის-ფილოგენეტიკური ხის აგებით.

პოლი-ß - ოქსიერბომჟავის განსაზღვრა

მრავალი ბაქტერია წარმოქმნის პოლი-ß – ოქსიერბომჟავას სამარაგო ნივთიერებების სახით და ზოჯერ ამ ნივთიერების სინთეზის უნარი დიაგნოსტიკურ ნიშნად გამოიყენება. პოლი-ß–ოქსიერბომჟავას ექსტრაქციისათვის ცენტრიფუგირებით დალექილ ბიომასას აშრობენ დიეთილის ეთერითა და მეთანოლის (1/1) ხსნარით. მშრალ ბიომასას ათავსებენ საშრობ კარადაში გამხსნელების მინარევებისაგან გასანთავისუფლებლად. ასეთი სახით გამშრალ ბიომასას კვლავ ხსნიან დიეთილისა ეთერისა და მეთანოლის ხსნარში (2/1), ექსტრაქციისათვის იღებენ 5 მლ გამხსნელის ხსნარს და 0.5გრ მშრალი უჯრედების ბიომასას, ათავსებენ შლიფიან კოლბაში ან სინჯარაში და აცხელებენ წყლის აბაზანაზე 60°C. ექსტრაქცია წარმოებს 20 წთ პერიოდული შენჯღრევით. დროის გასვლის შემდეგ ექსტრაქტს აცილებენ ნალექს, ექსტრაქციის პროცედურას კვლავ იმეორებენ. გაერთიანებულ ექსტრაქტებს ფილტრავენ მინის ფილტრში და აშრობენ ვაკუუმით ან საშრობ კარადაში ფაიფურის ჯამით, რომელიც მოთავსებულია მდუღარე აბაზანაზე. მშრალ საკვლევ მასას ხსნიან 1N H_2SO_4

(5მლ /1გრ) და ახდენენ ჰიდროლიზს 2 სთ 100-105°C. ჰიდროლიზატი იფილტრება მინის ფილტრში ვაკუუმის დახმარებით, მის მოცულობას დაიყვანენ 5მლ-მდე 1N H_2SO_4 და სპექტროფოტომეტრზე საზღვრავენ მის ექსტინქციას 235ნმ გოგირდმჟავას მიმართ. ამ ცდის პარალელურად იგივე მეთოდით მუშავდება 3-ჰიდროქსიერბომჟავა, რათა აიგოს კალიბრული მრუდი.

პოლისაქარიდების გამოყოფა და ანალიზი

მიკროორგანიზმების მიერ სინთეზირებული პოლისაქარიდები (პს) შედის უჯრედის სხვადასხვა სტრუქტურების შემადგენლობაში, კერძოდ უჯრედის კედელში, ასევე ინახება სამარაგო ნივთიერებების სახით და გროვდება უჯრედგარეთაც. უჯრედგარეთა პს შეიძლება იყოს კაფსულური ან თავისუფალი ანუ ეგზოპოლისაქარიდები (ეპს). ძალიან ხშირად პს ანტიგენური ფუნქციის მატარებელია, ასრულებს რა დამცველობით ფუნქციას-ბარიერული როლით სხვადახვა მოლეკულებისა და იონების შეღწევისათვის.

კულტურალური სითხიდან პს ლექავენ 3-5 მოცულობა ეთანოლის ან იზოპროპანოლის გამოყენებით, ნალექს აცილებენ ცენტრიფუგირებით (3-5 ათასი g, 15 წთ) და აშრობენ ოთახის ტემპერატურაზე.

მონოსაქარიდული შემადგენლობის დასადგენად ახდენენ პს ჰიდროლიზს 1N HCl 100°C 3სთ, შემდგომ ნარევის რეაქცია მიყავთ ნეიტრალურამდე მშრალი ნატრიუმის ბიკარბონატით. ჰიდროლიზებული პს ხნსარი ინახება მაცივარში.

რედუცირებადი შაქრების რაოდენობას პს ჰიდროლიზატში საზღვრავენ 2.3.5-ტრიფენილტეტრაზოლის აღდგენით, სტანდარტად იყენებენ D-გლუკოზის ხსნარს. პს მონოსაქარიდული შედგენილობა დგინდება ქაღალდის ქრომატოგრაფიით.

შიდაუჯრედული პს განსაზღვრისათვის აუცილებელია მთლიანი უჯრედული ბიომასის მჟავური ჰიდროლიზი და ჰიდროლიზატში რედუცირებადი შაქრების რაოდენობის კვლევა.

მიკროორგანიზმების უჯრედის კედლის შედგენილობა

ბაქტერიების უმრავლესობის უჯრედის კელდის მთავარი პოლიმერი არის პეპტიდოგლიკანი. პეპტიდოგლიკანის შედგენილობა არის დიაგნოსტიკური ნიშანი მხოლოდ გრამდადებითი მიკროორგანიზმებისათვის, რადგან სწორედ ისინი გამოირჩევიან მისი შედგენილობის მრავალფეროვნებით, რაც შეეხება გრამ უარყოფით მიკროორგანიზმებს, მათში მხოლოდ ერთი სახის პეპტიდოგლიკანია აღმოჩენილი და დიაგნოსტიკურ ნიშანს ის არ წარმოადგენს.

უჯრედის კელდის ფრაქციების კვლევა

პეპტიდოგლიკანის კვლევის საქწყისი ეტაპი არის უჯრედების მექანიკური დაშლა შემდგომი ცენტრიფუგირებით 15ათას g, 20წთ. ამ დროს ნალექი განიცდის განშრევებას და მიიღება ორი შრე: ქვედა - დაუშლელი უჯრედები და ზედა-უჯრედის კედელი. სწორედ მას აცილებენ, რეცხავენ წყლით, მანამ სანამ ნალექის განშრევება არ შეჩერდება (ქვედა შრეს ყოველთვის აგდებენ), საბოლოოდ გარეცხილი უჯრედის კედელი უნდა ლიოფილიზდეს ან გაშრეს სპირტით (სამჯერადად) ან ეთერით (ორჯერადად) დამუშავებით, შემდეგ გაშრეს ჰაერზე ან ვაკუუმ-ექსიკატორში. ასეთი სახით მიღებული გრამდადებითი მიკროორგანიზმების ურჯედის კედლის პრეპარატს უმატებენ ტრიქლორძმარმჟავას თეიხოის მჟავის მოსაცილებლად, ამისათვის 100-200მგ მშრალი უჯრედის კედლის პრეპარატს ემატება 10-20მლ 5% ტრიქლორძმარმჟავა,

სუსპენზიას შეათბობენ 100°C 20 წთ. გაცივების შემდეგ უჯრედის კედლის ნალექს რეცხავენ წყლით ცენტრიფუგირების პირობებში სანამ არ მიიღებენ ნეიტრალურთან ახლო მაჩვენებელს, რომელიც უნდა იხრებოდეს მჟავიანობისაკენ, ნალექს ასუსპენდირებენ 50 Mm ტრის–HCl-ბუფერში(Ph-7.8), შემდეგ ამუშავებენ ტრიპსინით (2.5მგ მშრალი ფერმენტი 2.5მლ ბუფერში 10მგ უჯრედის კედელზე). უჯრედის კედლის ნალექს რეცხავენ ბუფერით და ამუშავებენ 2% ნატრიუმის დეზოქსიქოლატით იმავე ბუფერში ცილების მოსაცილებლად. დამუშავება მიმდინარეობს 5წთ 100°C. შემდეგ დეტერგენტს აცილებენ 1N NaCl და 3-5 ჯერ დისტილირებული წყლით გარეცხვით. პეპტიდოგლიკანის მიღებულ პრეპარატს აშრობენ სპირტით (სამჯერ), ეთერით (ორჯერ) დამუშავებით და ვაკუუმექსიკატორით.

პეპტიდოგლიკანის შედგენილობის ანალიზი

პეპტიდოგლიკანის ჰიდროლიზისათვის პრეპარატის 2-3მგ ათავსებენ ამპულაში, უმატებენ 0.5მლ 4N HCl, აჩრჩილავენ თავს და 16სთ 100°C აინკუბირებენ. იშვიათად არის შემთხვევები როცა აუცილებელია ჰიდროლიზისათვის გამოვიყენოთ 6N HCl (18სთ, 120°C) ან 3N ტრიფტორძმარმჟავა (4სთ, 100°C). ჰიდროლიზის დასრულების შემდეგ HCl აცილებენ ვაკუუმ-ექსიკატორით, მრავალჯერადად უმატებენ რა პრეპარატს 0.5მლ დისტილირებულ წყალს და აშრობენ ექსიკატორში. ასეთი სახით დამუშავებულ ჰიდროლიზატს გადაიტანენ სინჯარაში და მოცულობა მიჰყავთ ბიდისტილირებული წყლით 1მლ-მდე. ჰიდროლიზატის ანალიზს ახდენენ ამინომჟავების ანალიზატორზე, რის შემდეგაც ანგარიშობენ ამინომჟავების, მურამის მჟავის და გლუკოზამინის მოლურ თანაფარდობას. თუ პეპტიდოგლიკანში აღმოჩნდება დიამინოპიმელინის მჟავა, საზღვრავენ მისი სტერეოიზომერის ფორმას. ამისათვის პეპტიდოგლიკანის ჰიდროლიზატს უშვებენ ქრომატოგრაფიაზე შემდეგი გამხსნელთა სისტემის გამოყენებით:

მეთანოლი-წყალი-HCl-პირიდინი (თანაფარდობა 40/13/2/5). ქრომატოგრამას აშრობენ, ასხურებენ 0.5% ნინჰიდრინს და აცხელებენ საშრობ კარადაში 100-110 ^{o}C. დიამინოპიმელინის მჟავა ვლინდება თეთრ ფონზე ყვითელი ლაქების სახით. მათ Rf ადარებენ სტანდარტულ დიამინოპიმელინის მეზო და L-ფორმების Rf. რომელიც დატანილია იმავე ქრომატოგრამაზე.

ჰიდროლიზატში ასევე საზღვრავენ ამინოშაქრებისა და ამინომჟავების შედგენილობას. ძირითადად ტაქსონომიური თავლსაზრისით საკმარისია ამ კომპონენტების მოლარული თანაფარდობის დადგენა.

თავი 15. დუღილი

სპირტული დუღილი; CO_2 განსაზღვრა; დუღილის ინტენსივობის განსაზღვრა; ეთანოლის განსაზღვრა; რძემჟავა დუღილი; რძემჟავა ბაქტიერების მიკროსკოპირება; თვისებრივი და რაოდენობრივი რეაქციები რძემჟავაზე; ერბომჟავა დუღილი; ერბომჟავა ბაქტერიების მიკროსკოპირება; თვისობრივი რეაქცია ერბომჟავაზე; პექტინური ნაერთების დუღილი; მიკროსკოპირება; ცელულოზის დუღილი.

მიკროორგანიზმები ენერგიას ძირითადად ღებულობენ ორგანული ნივთიერებებისგან. მხოლოდ მცირე ნაწილს შეუძლია მზის ენერგიისა და მინერალური ნაერთების დაჟანგვის ენერგიის გამოყენება. იმის მიხედვით თუ რა გზით მიმდინარეობს ორგანული ნივთიერებების დაშლა არჩევენ: დუღილს-რომლის დროსაც ენერგიის გამოთავისუფლება ხორციელდება ჟანგბადის გარეშე, და დაჟანგვას, როცა ენერგიის გამოყოფა მიმდინარეობს აერობულ პირობებში. უკანასკნელ შემთხვევაში ენერგია გამოთავისუფლდება მთლიანად და დაჟანგვის საბოლოო პროდუქტებად გვევლინება CO_2 და H_2O.

დუღილს თან ახლავს ენერგიის ნაწილობრივი გამოყოფა, ამიტომ ამ პროცესის საბოლოო პროდუქტებს შორის ყოველთვის არის არასრულად დაჟანგული ნაერთები, რომლებიც შეიცავენ ქიმიური ენერგიის მარაგს –სპირტი, რძემჟავა და სხვა. იმის

მიხედვით თუ რომელი ძირითადი პროდუქტი მიიღება ამ პროცესების მიმდინარეობისას არჩევენ სპირტულ, რძემჟავა, ერბომჟავა და სხვა ტიპის დუღილს.

მიკროორგანიზმების მიერ წარმოებული დუღილის პროცესს ძალიან დიდი მნიშვნელობა აქვს ბუნებაში და ფართოდ გამოიყენება პრაქტიკაში. ეს პროცესები საფუძვლად უდევს ლუდის, ღვინოს წარმოებას, ბოსტნეულის დამწნილების პროცესებს, რძის გადამუშავებას და სხვა.

სპირტული დუღილი.

სპირტული დუღილი-საფუვრებისა და ბაქტერიების მიერ მიერ გამოწვეული ნახშირწყლების გარდაქმნა, ასევე ამ პროცესში მონაწილეობს მუკორის სოკოები, თუმცა მნიშვნელობის თვალსაზრისით უნდა გამოიყოს საფუვრების მიერ წარმოებული დუღილი, რომელიც პრაქტიკაში გაოიყენება.

საფუვრები-ერთუჯრედიანი, 8-15მკმ სიდიდის ოვალური ან მრგვალი ფორმის ორგანიზმები, რომლებიც მრავლდებიან უსქესოდ, ძირითად დაკვირტვით ან დაყოფით, იშვიათად სპორებით. საფუვრების მიერ მონო და დისაქარიდების დუღილისას მიიღება ეთილის სპირტი:

$$C_6H_{12}O_6=2CH_3CH_2OH+2CO_2$$

აზოტის წყაროს ფუნქციას ასრულებს პეპტონი, ამინომჟავები ან ამიაკი. საფუვრები ახდენენ ამინომჟავების დეზამინირებას, გამოიყენებენ რა ამ დროს გამოთავისუფლებულ აზოტს. ამ პროცესში წამოქმნილი მაღალმოლეკულური სპირტები შეადგენს **რახის** ზეთების ძირითად ნაწილს. საფუვრები კარგად იზრდება Ph-4-6, და მდგრადია შაქრებისა (70%) და სპირტების (14%) მაღალი კონცენტრაციების მიმართ.

სპირტული დუღილი საფუძვლად უდევს ღვინისა და ლუდის წარმოებას, პურ-ფუნთუშეულის წარმოებას. საფუვრების უმრავლესობა, რომელიც გამოიყენება ამ მიზნებისათვის არის ***Sacharomyces*** გვარის წარმომადგენელი. ცხობის პროცესში მნიშვნელოვანია საფუვრების მიერ წარმოებული დუღილისას წარმოქმნილი CO_2, რომელიც ზრდის ცომის მოცულობას და პურს ხდის ფორებიანს, ლუდის წარმოებაში ყურადღება ექცევა მალტოზის დუღილის სისრულეს. ღვინის წარმოებაში კი ფასეულია გვერდითი პროდუტები, რომლებიც ქმნის ღვინის "თაიგულს".

ცდის დაყენება სპირტული დუღილის შესასწავლად იყენებენ სინთეტურ არეს (%): საქაროზა-15.0; პეპტონი-0.5; KH_2PO_4-0.3; $MgSO_4$ -0.1.

ცდას აყენებენ არასტერილურ პირობებში, მაგრამ ელექტიური პირობების შექმნის გამო საკვებ არეძე უპირატესად საფუვრების გაიზრდება. ამ დროს სხვა მიკროორგანიზმების ცხოველქმედება დაითრგუნება.

100 მლ საკვებ არეს ასხამენ ერლენმეიერის ან ბრტყელძირიან კოლბაში და ამატებენ 0.5გრ დაპრესილ ან ფხვიერ საფუარს. კოლბას თავზე ახურავენ მეისელის ჩამკეტს, რომელზეც დამაგრებულია ბუნზენის რეზინის სარქველი (სურათი№---). მეისელის ჩამკეტი წარმოდგენილია მინის სამი დეტალით: შიდა მინის მილი, რომლის ერთი ბოლო შედის კოლბაში მეორე კი –შიდა მინის რეზერვუარში, ამ უკანასკნელს გააჩნია არე, რომელიც მას აკავშირებს გარე რეზერვუარს. გარეთა გამოსავალი დაკეტილია რეზინის სარქველით. ჩამკეტი ადვილად უშვებს დუღილის დროს გამოყოფილ CO_2 და ეწინააღმდეგება გარედან ნახშირორჟანგის შესვლას, ამავე დროს ინკუბაციისას თერმოსტატში წარმოქმნილი ტენი შეიწოვება ჩამკეტში ჩასხმული H_2SO_4.

კოლბას წონიან ტექნიკურ სასწორზე და დგამენ თერმოსტატში 25°C.

იქმნება პირობები, რომელიც ხელს უწყობს სხვა მიკროორგანიზმებთან შედარებით საფუვრების ზრდა-განვითარებას. ეს არის: შაქრების მაღალი კონცენტრაცია, ოდნავ მჟავე რეაქცია, ანაერობული პირობები, სპირტის დიდი რაოდენობის დაგროვება. ამ ფაქტორების ერთიანობა ქმნის საფუვრებისათვის ელექტიურ გარემოს.

CO_2 განსაზღვრა დუღილის დროს წარმოქმნილი დიოქსიდის განსაზღვრა ხდება კოლბის მასის სხვაობის დადგენით ცდის დაყენებისას და დასრულების შემდეგ. დუღილის პროცესის დასრულებას ადგენენ აირის წარმოქმნის შეწყვეტით, როგორ ცესი პროცესი 2-3 დღე გრძელდება. მიუხედავად იმისა რომ კოლბას წონიან ტექნიკურ სასწორზე, CO_2 განსაზღვრის სიზუსტე საკმაოდ მაღალია, რადგან დუღილისას ის დიდი რაოდენობით გამოიყოფა. თითქმის 50% შაქრისა გარდაიქმნება ნახშირბადის დიოქსიდად:

$$C_6H_{12}O_6=2CH_3CH_2OH+2CO_2$$

მოლეკულური მასა 180 92(2×46) 88 (2×44)

ცდის პროცესში წარმოქმნილი სპირტის რაოდენობისა და ადუღებული შაქრის განსაზღვრა ხორციელდება გამოყოფილი ნახშირბადის დიოქსიდის რაოდენობაზე დაყრდნობით, სპირტული დუღილის ტოლობასთან მიმართებაში.

გამოთვლის ნიმუში.

დუღილის პროცესში გამოიყო 6 გრ CO_2 ვსაზღვრავთ გამოყოფილის სპირტისა (x) და ადუღებული შაქრის (y) რაოდენობას:

88გრ CO_2 შეესაბამება 92 გრ CH_3CH_2OH

6 გრ CO_2 ---------- x გრ CH_3CH_2OH

x = 6×92/88=6.3გრ

88გრ CO_2 შეესაბამება 180 გრ CH_3CH_2OH

6 გრ CO_2 ---------- x გრ CH_3CH_2OH

x = 6×180/88=12.3გრ

დუღილის ინტენსივობის განსაზღვრა

დუღილის ინტენსივობის ქვეშ იგულისხმება ადუღებული შაქრის პროცენტული თანაფარდობა მის საწყის რაოდენობასთან მიმართებაში.

გამოთვლის ნიმუში

თუ ინკუბაციისას ადუღდა 15 გრ შაქარი, მაშინ დუღილის ინტენსივობა იქნება 100%, მაგრამ ცდის მიხედვით მხოლოდ 16.3გრ შაქარი ადუღდა:

15 გრ შაქარი შეესაბამება 100% დუღილის ინტენსივობისა

12.3 შაქარი---------- x დუღილის ინტენსივობისა

x = 12.3×100/15=82 (%)

საფუვრების მორფოლოგიის გასაცნობად შეიძლება დუღილის პროცესში მყოფი სითხის მიკროსკოპირება. ამისათვის მის ერთ წვეთს დაიტანენ სასაგნე მინაზე და დააფარებენ საფარ მინას, ათვალიერებენ იმერსიული სისტემის გამოყენებით.

პრეპარატზე შესაძლებელია დაკვირტვის პროცესში მყოფი საფუვრის უჯრედების ნახვა.

ეთანოლის განსაზღვრა. იმ კოლბების აწონვის შემდეგ, რომელშიც მიმდინარეობს დუღილი და CO_2 განსაზღვრის დასრულებისთანავე კოლბების შიგთავსი გადააქვთ 700-800 მლ ბრტყელძირიან კოლბაში სპირტის გადასადენად. ანალიზისათვის აუცილებელია სამი-ოთხი თამნმიმდევრული დადგმა გადასადენი მასალისა, თითოეულში 10-15მლ გადადენილი სპირტი რომ შეგროვდეს. სხვადახვა ნიმუშებიდან იღებენ მასალას (სპირტს) და ფაიფურის ჯამზე ცეცხლს უკიდებენ, პირველი ორი გადადენილი ულუფა იწვის ინტენსიურად, რადგან შეიცავს უფრო დიდი რაოდენობით სპირტს, შემდეგ ყოველ მომდევნო გადადენილ ულუფაში სპირტის რაოდენობა და შესაბამისად წვის ინტენსივობა კლებულობს. პირველ 2-3 ფრაქციას გადადენილი სპირტისა იყენებენ ეთანოლზე თვისობრივი რეაქციის ჩასატარებლად.

ერთ-ერთი თვისობრივი რეაქცია არის ეთილის სპირტის კრისტალურ იოდთან რეაქცია 60-70 ^{o}C როცა წარმოიქმნება იოდოფორმი (CH_3I).

3-5მლ გადადენილ მასალას იმავე რაოდენობის 20% Na_2CO_3 და 0.1გრ კრისტალური იოდი. ნარევს შეანჯღრევენ და აცხელებენ წყლის აბაზანაზე 60-70 ^{o}C სრულ გახსნამდე და გაუფერულებამდე. გაცივების შემდეგ გამოილექება იოდოფორმის ყვითელი კრისტალები. პროცესი მიმდინარეობს შემდეგი სქემით:

$CH_3CH_2OH+I_2=CH_3CHO+2HI$

$CH_3CHO+3I_2=ClCHO+3HI$

$Cl_3CHO+NaOH=CHI_3+HCOONa$

აქროლადი ორგანული ნაერთებიდან იოდოფორმთან დადებით რეაქციას იძლევა ძმარმჟავა ალდეჰიდი და აცეტონი. გადადენილ მასალაში მათ არარსებობაში რწმუნდებიან ფუქსინგოგირდმჟავას ან ვერცხლის ამიაკის ხსნარის მოქმედებით. ალდეჰიდების არსებობისას ფუქსინ გოგირდმჟავა წითლდება, ხოლო ვერცხლის ამიაკური ხსნარი შავდება.

მეორე თვისობრივი რეაქცია სპირტზე ხორციელდება კალიუმის ბიქრომატის გამოყენებით. 5 მლ გადადენილ სპირტს ემატება რამოდენიმე წვეთი 10% H_2SO_4 10% ხსნარი და $2Qr_2O_7$ (გადაამოწმე) მცირე კრისტალი. მცირე შეთბობისას წარმოიქმნება ძმარმჟავა ალდეჰიდი, რომლის დუღილის ტემპერატურა 21°C. მის აღმოსაჩენად კოლბას აფარებენ ვერცხლის ნიტრატის ამიაკური ხსნარით გაჟღენთილ ქაღალდს. ძმარჟავა ალდეჰიდის არსებობისას ანუ სპირტის არსებობისას ქაღალდი შავდება.

რძემჟავა დუღილი

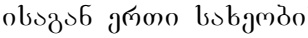
რძემჟავა დუღილი საფუძვლად უდევს სილოსირების პროცესს, ბოსტნეულის დამწნილებას, რძის გადამუშავებას და ა. შ. ამ პროცესებში მონაწილეობს რძემჟავა ბაქტერიები, რომლებიც გამოირჩევა დიდი მრავალფეროვნებით და ბუნებაში ფართოდ არის გავრცელებული. ისინი ბინადრობენ მცენარეების ზედაპირზე, რძეში და სხვადასხვა საკვებ პროდუქტებში, ადამიანისა და ცხოველის საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში. მიუხედავად ასეთი მრავალფეროვნებისა მათ გააჩნიათ რიგი საერთო ნიშან-თვისებებისა:

- რძემჟავას სინთეზის უნარი;

- გრამდადებითობა;
- სპორების არარსებობა;
- უძრაობა;
- უჯრედის ფორმა (კოკები ან ჩხირები);
- აზოტის წყაროს მიმართ მოთხოვნილება;
- კატალაზის ფერმენტის არარსებობა;
- წყალბადის ზეჟანგის დაშლის უნარი წყლამდე და ჟანგბადამდე.

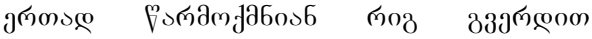
რძემჟავა დუღილის ბაქტერიები იყოფა ორ ჯგუფად:

ჰომოფერმენტატული-წარმოქმნიან შაქრისაგან ერთი სახეობის რძემჟავას

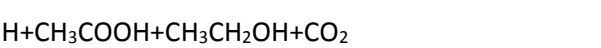


$$C_6H_{12}O_6=2CH_3CHOHCOOH$$

ჰეტეროფერმენტატული-რძემჟავასთან ერთად წარმოქმნიან რიგ გვერდით პროდუქტებს.



$$C_6H_{12}O_6=2CH_3CHOHCOOH+CH_3COOH+CH_3CH_2OH+CO_2$$



$$C_6H_{12}O_6=2CH_3CHOHCOOH+3CH_3COOH$$ (ბიფიდოდუღილი)

რძემჟავა ბაქტერიები ადუღებენ მონო და დისაქარიდებს. რძეში არსებული ბაქტერიები ადუღებენ ლაქტოზას, მაგრამ არ მოქმედებენ საქაროზაზე. ლაქტოზა ამ დროს განიცდის ჰიდროლიზს გლუკოზისა და გალაქტოზის წარმოქმნით და მერე ხდება დუღილი. აზოტის წყაროდ ამ ჯგუფის ბაქტერიებისათვის გვევლინება პეპტონები, მრავალი მათგანი საჭიროებს ვიტამინებს.

რძემჟავა ბაქტერიების შესასწავლად საუკეთესო საკვები არე არის-რძე.

საკვები არის მჟავიანობის კრიტიკული მაჩვენებელი

- რძემჟავაბაქტერიებისათვის-4.0-3.5
- ერბომჟავა ბაქტერიებისათვის-5.0-4.7
- ლპობის ბაქტერიებისათვის-5.5-5.0/

ცდის დაყენება.

რძის საწყის მჟავიანობას საზღვრავენ NaOH 0.1N ხსნარის გამოყენებით ტიტრირებით, ჩამოასხამენ ერლენმეიერის 100მლ კოლბებში 40-50მლ და ახურავენ ბამბის საცობს.

პარალელურად აყენებენ ცდის მეორე ვარიანტს: რძეს ასხამენ კოლბებში, ახურავენ ბამბის საცობს და მიყავთ ადუღებამდე.

ორივე კოლბას ადუღებული და აუდუღებელი რძით დგამენ თერმოსტატში 30°C. 10-12 სთ შემდეგ აუდუღებელი რძე ამჟავდება. კოლბაში წარმოიქმნება სქელი მასა, რაც არის შედეგი რძემჟავის რეაქციისა კალციუმის კაზეინატთან და კაზეინის მჟავის ნალექში გადასვლისა.

რძის ადუღებისას რძემჟავა ბაქტერიები, ვინაიდან არ წარმოქმნიან სპორებს იღუპება, ხოლო ერბომჟავა ბაქტერიები კი ნარჩუნდება. თერმოსტატში ინკუბაციისას ისინი ვითარდება და აწარმოებს ლაქტოზის ერბომჟავა დუღილს, ერბომჟავას კალციუმის კაზეინატთან რეაქციის შედეგად კაზეინის მჟავა წარმოქმნისთანავე ილექება. შემდგომ ის განიცდის პეპტონიზაციას, რის შედეგადაც შრატი ღებულობს კრემის ფერს და ერბომჟავას არასასიამოვნო სუნს.

რძემჟავა ბაქტერიების მიკროსკოპირება

თუ რძის პროდუქტებს ან მწნილს გავაჩერებთ ოთახის ტემპერატურაზე, გარკვეული პერიოდის შემდეგ მათ ზედაპირზე წრმოიქმნება თეთრი მოკრემისფრო

შეფერილობის ხავერდოვანი აპკი, ეს არის რძის ობი-***Geotrichum candidum (Oidium lactis)*** ის ყოველთვის თანა ახლავს რძემჟავა დუღილს და იწვევს რძემჟავის დაჟანგვას CO_2 და H_2O წარმოქმნით, ამით გარემოს მჟავიანობა ქვეითდება და პროდუქტი ფუჭდება.

რძის ობი-აერობული ფორმაა და ვითარდება მხოლოდ ზედაპირზე. გააჩნია მრავალუჯრედიანი მიცელიუმი, რომელიც იშლება ცალკეულ უჯრედებად-ოიდიებად.

რძემჟავა ბაქტერიების მიკროსკოპირებისათვის პრეპარატს ამზადებენ შემჟავებული რძისაგან. ბაქტერიოლოგიური მარყუჟით იღებენ შემჟავებული რძის მცირე რაოდენობას და თანაბრად ანაწილებენ მშრალი სასაგნე მინის ზედაპირზე, აშრობენ ჰაერზე, აფიქსირებენ სპირტისა და ეთერის ნარევით (1:1), ამ ნარევს რამოდენიმეჯერ დააწვეთებენ ნაცხზე, პერიოდულად გადაღვრიან მას. საბოლოოდ ფიქსირებულ პრეპარატს ღებავენ 2-3წთ მეთილენის ლურჯით, რეცხავენ წყლით და ახდენენ მიკროსკოპირებას იმერსიის გამოყენებით. პრეპარატზე ჭარბობს მრგვალი ფორმის ***Lactococcus lactis*** უჯრედები, ის ხელს უწყობს დაახლოებით 1% რძემჟავას წამოქმნას, მისი განვითარების ოპტიმალური ტემერატურა 30°C. ასევე პრეპარატზე ჩანს წვრილი სწორი ფორმის ბაქტერიები ***Lactobacillus bulgaris*** ან ამ გვარის სხვა წარმომადგენლები. მისი განვითარების ოპტიმალური ტემპერატურა 40 ^{o}C, ის მჟავამედეგია და დაახლოებით 3.5% რძემჟავას წარმოქმნის, ასევე შეიძლება აღმოვაჩინოთ რძის ობის სწორკუთხოვანი ან მრგვალი დიდი ზომის უჯრედები.

თვისობრივი და რაოდენობრივი რეაქციები რძემჟავაზე.

რძემჟავის რაოდენობას განსაზღვრავენ NAOH 0.1N ხსნარის მოცულობების სხვაობის აღრიცხვით, რომელიც წავიდა ცდის ბოლო ეტაპზე გატიტვრაზე და მისი დაყენებისას.

ტიტრირებისათვის იღებენ 5-10მლ შემჟავებულ რძეს, ათავსებენ ერლენმეიერის კოლბაში, ამატებენ 20მლ დისტილირებულ წყალს, 1-2წვეთ ფენოლფტალეინს და ტიტრავენ 0.1N NAOH, მუდმივი შენჯღრევის პირობებში ღია ვარდისფერი შეფერილობის მიღებამდე. თუ შემჟავებული რძის ზედაპირზე წარმოიქმნა აპკი საჭიროა მისი ფრთხილი გადახსნა და მხოლოდ ამის შემდეგ სიღმიდან სინჯის აღება.

რძის მჟავიანობა გამოისახება ტერნერის გრადუსებში (^{o}T) ან რძემჟავის პროცენტებში. ასე, 1°T შეესაბამება 1მლ 0.1 ტუტის ხსნარს, რომელიც დაიხარჯა 100მლ რძის გასატიტრად. შესაბამისად, თუ 10მლ რძის გასატიტრად დაიხარჯა 3მლ ტუტე, რძის მჟავიანობის ტერნერის გრადუსებში გამოსახატავად საჭიროა X გავამრავლოთ 10. იმისათვის რომ მჟ ვიანობა გამოვხატოთ რძემჟ ვის პროცენტებში, 10მლ რძის გასატიტრად დახარჯული 0.1N NAOH ხსნარი (მლ), უნდა გამრავლდეს 0.009, რადგან 1მლ 0.1N NAOH ანეიტრალებს რძემჟავის ექვივალენტურ რაოდენობას.

რძემჟავის მოლეკულური მასა შეადგენს 90. 1ლ 1N ხსნარის დასამზადებლად 90გრ მჟავა არის საჭირო. 1ლ 0.1 ხსნარი შეიცავს 9გრ, ხოლო 1მლ-0.009გრ რძემჟავა.

ტიტრირებული მჟავიანობის განსაზღვრის შემდეგ დარჩენილ რძეს გაფილტრავენ ქაღალდის ფილტრში და იყენებენ თვისობრივი რეაქციისათვის.

“ვერცხლის სარკის” რეაქციის განსახორციელებლად რძემჟავას გარდაქმნიან ძმარმჟავის ალდეჰიდად. რეაქცია მიმდინარეობს მჟავე გარემოში, დუღილის ტემპერატურის პირობებში MnO_4 თანაობისას. ძმარმჟავას ალდეჰიდის ვერცხლის

ამიაკურ ხსნართან ურთიერთქმედების შედეგად მიიღება მეტალური ვერცხლი (ვერცხლისფერი შეფერილობა).

ეს თვისობრივი რეაქცია შემდეგი თანმიმდევრობით მიმდინარეობს: 100მლ კოლბაში ათავსებენ 5მლ ფილტრატს, უმატებენ 23 მლ კონცენტრირებულ გოგირდმჟავას და აცხელებენ ადუღებამდე, პერიოდული შენჯღრევით. აგრძელებენ დუღილსა და მორევას და წვეთებით უმატებენ 5მლ 5% $KMnO_4$, რომელიც ამ დროს უფერულდება. შედეგად რძემჟავა გარდაიქმნება ძმრის ალდეჰიდად.

ამ დროს მიმდინარეობს შემდეგი ქიმიური რეაქციები:

$2KMnO_4+3H_2SO_4=K_2SO_4+MnSO_4+3H_2O+5O$

$5CH_3CHOHCOOH+5O=5CH_3CHO+5CO_2+5H_2O$

ძმრის ალდეჰიდის აღმოსაჩენად კოლბას თავზე ახურავენ $AgNO_3$ - ით გაჟღენთილ ფილტრის ქაღალდს.

ვერცხლის ნიტრატის ამიაკურ ხსნარს ამზადებენ შემდეგნაირად: 1-2მლ 10% $AgNO_3$ და უმატებენ ამიაკს წვეთებით, თავიდან წარმოიქმნება Ag_2O ნალექი რომელიც შემდეგ ამიაკში იხსნება.

ამ ხსნარით გაჟღენთილი ფილტრის ქაღალდი ეფარება კოლბას, ძმრის ალდეჰიდი აორთქლებისას აშავებს ქაღალდს, რეაგირებს რა $AgNO_3$-თან, ეს გამოიყოფა-ვერცხლი.

მეორე თვისობრივი რეაქცია რძემჟავის აღმოსაჩენად არის რეაქცია თიოფენთან. ამისათვის სინჯარაში თავსდება 1-2მლ ფილტრატი, ემატება 5მლ კონცენტრირებული გოგირდმჟავა და 0.5მლ $CuSO_4$ ნაჯერი ხსნარი. ნარევს ურევენ, აცხელებენ 5წთ წყლის აბაზანაზე 100^oC და გაცივების შემდეგ უმატებენ რამოდენიმე წვეთ 0.2% თიოფენის სპირტხსნარს. რძემჟავის არსებობის შემთხვევაში სითხე იღებება შინდისფრად.

ერბომჟავა დუღილი

ერბომჟავა დუღილის გამომწვევი მიკროორგანიზმები მკაცრი ანაერობები არიან, მოძრავი ჩხირები სპორაწარმოქმნის კლოსტრიდიალური ან პლეკტრიდიალური ტიპით.

საბოლოო პროდუქტების მიხედვით ერბომჟავა დუღილი იყოფა: ჭეშმარიტ ერბომჟავა (სახამებლის, გლუკოზის დუღილი), აცეტონო ბუთილის ტიპის და პექტინური ნაერთების დუღილად.

ერბომჟავა ბაქტერიები ფართოდ არის გავრცელებული ნიადაგში, ნაკელში, დაბინძურებულ წყალსატევებში და მცენარეთა ზედაპირზე.

ერბომჟავა დუღილის პროცესი მიმდინარეობს შემდეგი სქემით:

$4C_6H_{12}O_6=3CH_3CH_2CH_2COOH+2CH_3COOH+8CO_2+8H_2$

ერბომჟავას გარდა პროცესის მიმდინარეობისას წარმოიქმნება ძმარმჟავა, და საკვები არის შემჟვებისას (Ph-5.5)-მნიშვნელოვანი რაოდენობით ბუთანოლი და აცეტონი.

ერბომჟავა ბაქტერიებისათვის ენერგეტიკული მასალის ფუნქციას ასრულებს სახამებელი, წყალში ხსნადი ნახშირწყლები (დექსტრინები, მონო-, დისაქარიდები), ორგანული მჟავები(რძემჟავა, პიროყურძნის მჟავა) და სპირტები (მანიტი, გლიცერინი). აზოტის წყაროდ ბაქტერიები გამოიყენებს პეპტონს, ამინომჟავებს, ამიაკურ მარილებს, ზოგიერთი კი – ატმოსფერულ აზოტს.

ერბომჟავა ბაქტერიების დამახიასიათებელი თვისებაა-სპორების წარმოქმნის წინ გრანულოზის დაგროვება უჯრედში.

ცდის დაყენება ერბომჟავა დუღილის შესასწავლად იყენებენ ხპბ, რომელსაც ამატებენ 3-5% გლუკოზას. იმისათვის რომ ამ საკვებ არეში უპირატესად ერბომჟავა ბაქტერიები განვითარდეს უნდა შეიქმნას მკაცრად ანაერობული პირობები. ნიადაგის შეტანის მერე საკვები არე უნდა გაცხელდეს, ამ დროს ერბომჟავა ბაქტერიების სპორები ცოცხალი რჩება, ხოლო არასპოროვანი ფორმები სხვა მიკროორგანიზმებისა იღუპება.

200-250მლ ვიურცის კოლბაში შეაქვთ 30-50მლ საკვები არე, 0.5გრ ნიადაგი და 1/4 ჩაის კოვზი ერბომჟავა. კოლბას აცხელებენ ადუღებამდე თავდაუხურავად., აცივებენ წყლის ჭავლის ქვეშ, შემდეგ ახურავენ საცობს, რომელზეც შესაძლებელია ტუმბოს მიერთება ჰაერის გამოსადევნად და ათავსებენ თერმოსტატში 30-35°C.

სახამებლის ერბომჟავა დუღილის შესწავლა შესაძლებელია კარტოფილიან საკვებ არეზე. ნედლი, გაუთლელი კარტოფილი იჭრება წვრილად, თავსდება სინჯარებში, ემატება მცირე რაოდენობის ცარცი და ონკანის წყალი, პასტერიზდება 80°C 10 წთ, საკვებ არეში არ შეაქვთ ნიადაგი, რადგან კარტოფილის კანზე ყოველთვის არის ერბომჟავა დუღილის ბაქტერიების სპორები.

ქმნიან ელექტიურ პირობებს:

- სახამებლის არსებობა;
- პასტერიზაცია;
- ანაერობული პირობები.

2-3დღის ინკუბაციის შემდეგ კარტოფილი ამოტივტივდება დიდი რაოდენობით აირის წარმოქმნის გამო, დუღილის დასრულების შემდეგ კულტურლურ სითხეს იყენებენ ერბომჟავა დუღილის ბაქტერიების მორფოლოგიის შესასწავლად.

ერბომჟავა ბაქტერიების მიკროსკოპირება ვიურცის კოლბიდან ან კარტოფილიანი სინჯარიდან ამოიღებენ პიპეტით საკვებ არეს სასურველია შიდა შრიდან ნიმუშის აღება), აწვეთებენ სასაგნე მინაზე და ღებავენ ლუგოლის ხსნარით, მიკროსკოპირებისათვის იყენებენ იმერსიულ სისტემას.

მიკროსკოპირებისას პრეპარატში შესაძლებელია აღმოჩნდეს ***Clostridium*** (ლათ. ***Close***-დაკეტვა, ***clostrum***-საკეტი, ***tridium***-დიდიხნით) ***butyricum*** (ბერძნ. ***Butyrum***-კარაქი). ***C. butylicum. C. pasteurianum*** და სხვა (სურათი№----). პრეპარატზე ასევე შეინიშნება სინათლის გარდამტეხი ოვალური ფორმის სხეულაკები-სპორები.

თვისობრივი რეაქცია ერბომჟავაზე სინჯარებში ათავსებენ 3-5მლ ადუღებულ სითხეს, უმატებენ 5% რკინის ქლორიდის 1-2მლ და აცხელებენ. რეაქციის მიმდინარეობა გამოისახება შემდეგნაირად:

$3Ca(CH_3CH_2CH_2COO)_2+2FeCl_3=2Fe(CH_3CH_2CH_2COO)_3+3CaCl_2$

ერბომჟავა რკინის ხსნარს აქვს მოყავისფრო შეფერილობა.

ერბომჟავაეთილის ეთერი (ანანასის ესენცია) 3-5მლ კულტურალურ სითხეს სინჯარაში უმატებენ 0.5მლ 96%ეთილის სპირტს და 1-2მლ კონცენტრირებულ გოგირდმჟავას. შენჯღრევისას და გაცხელებისას წარმოიქმნება ეთერის დამახასიათებელი სუნი:

$Ca(CH_3CH_2CH_2COO)_2+2CH_3CH_2OH=2CH_3CH_2COOCH_2CH_3+Ca(OH)_2$

პექტინური ნაერთების დუღილი

პექტინური ნაერთები წყალში უხსნადია, მაგრამ აქვთ გაჯირჯვების უნარი. ისინი დიდი რაოდენობით მოიპოვება მცენარეულ მასალაში.

პექტინი იშლება იმ მიკროორგანიზმების მიერ რომელიც შეიცავს ფერმენტ პექტინაზას. პექტინური ნაერთების დუღილის პროცესი შედგება ორი თანმიმდევრული ეტაპისაგან: პირველ ეტაპზე ისინი ჰიდროლიზდება შაქრებამდე, ხოლო მეორეზე კი წარმოიქმნება ერბომჟავა, CO_2, H_2 ან H_2O.

პექტინური ნაერთების ერბომჟავა დუღილის გამომწვევი მიკროორგანიზმები ობლიგატური ანაერობებია. ისინი მოძრავია, წარმოქმნიან სპორებს, შესწევთ პექტინის, გლუკოზის, არაბინოზის, სახამებლის დუღილის უნარი, მცირე მოთხოვნები აქვთ აზოტის წყაროს მიმართ და პექტინთან ერთად კარგად ითვისებენ აზოტის მინერალურ ფორმებს.

ცდის დაყენება. სელის 6-7სმ სიგრძის ღეროებს ორ ადგილზე გადაკრავენ ძაფით და შეაქვთ დიდი ზომის სინჯარებში, რომელშიც ჩასხმულია 2/3 ონკანის წყალი. ადუღებენ 2-3წთ. წყალი ღებულობს მოყვითალო-მომწვანო ფერს, მას გადაღვრიან, კვლავ ავსებენ სინჯარებს იგივე რაოდენობის ონკანის წყლით, ადუღებენ და გადაღვრიან, პროცედურას იმეორებენ 5-6ჯერ. ბოლო ადუღების შემდეგ სინჯარის შიგთავსს აცივებენ, და შეაქვთ ახალი სელის ღერები, რომელიც არ არის თერმულად დამუშავებული.

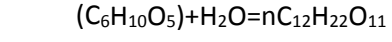
სინჯარას ათავსებენ თერმოსტატში 30-35°C 2-3 დღის შემდეგ იწყება დუღილის პროცესი, რომელიც 5-8დღის შემდეგ წყდება. ერბომჟავას დაგროვება კულტურალურ სითხეში შეიძლება შემოწმდეს სპეციფიური თვისობრივი რეაქციით, რომელზეც ზემოთ იყო საუბარი (თავი---). ამ დროს ასევე წარმოიქმნება ძმარმჟავა.

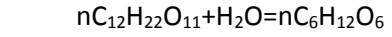
მიკროსკოპირება სელის ღერები ამოაქვთ სინჯარიდან და მათი შუა ნაწილიდან გამოწვლილავენ რამოდენიმე წვეთ კულტურალურ სითხეს სასაგნე მინაზე, ამატებენ ლუგოლის ხსნარის წვეთს, აფარებენ საფარ მინას, მიკროსკოპირებას აწარმოებენ იმერსიული ობიექტივით.

პრეპარატზე გამოჩნდება დიდი ზომის ჩხირები, სპორების პლექტრიდიალური ტიპით და გრანულოზის წყვეტილი განლაგებით, რომელიც იღებება ლურჯად. ეს არის ***Clostridium plectonovorum*** (სურ.№---), ასევე შეიძლება იქნეს ***C. felsineum*** (სურ. №---)- შედარებიით მცირე ზომის ჩხირები, ბოლოებში განლაგებული სპორებით, ამ შემთხვევაში გრანულოზა იკავებს მთელ ვეგეტატიურ უჯრედს.

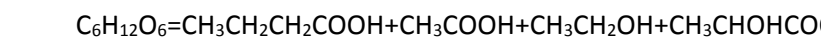
ცელულოზის დუღილი ცელულოზა იშლება ანაერობულ პირობებში სპორაწარმომქმნელი ბაქტერიების მიერ, რომლებიც ძირითადად ნიადაგის ბინადრები არიან.

პირველი ეტაპი-ცელულაზის მიერ ცელულოზის ჰიდროლიზი, დისაქარიდ ცელობიოზის წარმოქმნა, ცელობიაზის მიერ ამ უკანასკნელის ჰიდროლიზი და გლუკოზის წარმოქმნა:


$(C_6H_{10}O_5)+H_2O=nC_{12}H_{22}O_{11}$


$nC_{12}H_{22}O_{11}+H_2O=nC_6H_{12}O_6$

მეორე ეტაპი-გლუკოზის დუღილი:


$C_6H_{12}O_6=CH_3CH_2CH_2COOH+CH_3COOH+CH_3CH_2OH+CH_3CHOHCOOH+HCOOH+CO_2+H_2$

ცდის დაყენება ცელულოზადამშლელი ბაქტერიების დაგროვებითი კულტურის მისაღებად მრგვალძირიან კოლბაში შეაქვთ 1-2 გრ ფილტრის ქაღალდი ან ბამბა და

შემდეგი შედგენილობის საკვები არე (%): KNH_4HPO_4-0.2; KH_2PO_4-0.1; $CaCl_2$-0.03; პეპტონი-0.1; $MgSO_4$-0.05; $CaCO_3$-0.5.

ასტერილებენ და შეაქვთ მცირე რაოდენობის ნიადაგი, კოლბას ახურავენ საცობს, რომელსაც გააჩნია მცირე არე აირის გამოსასვლელად, რომელიც კულტივირების პირობებში წარმოიქმნება. ათავსებენ თერმოსტატში 30-35°C.

7-10დღის შემდეგ იწყება ცელულოზის დუღილი, პროცესის ხანგრძლივობა 2-3კვირაა. ფილტრის ქაღალდი დუღილის პროცესში იფარება ლორწოთი, ყვითლდება და ბოლოს იშლება.

თერმოფილური ცელულოზოდამშლელი მიკროორგანიზმების დაგროვებითი კულტურის მისაღებად იყენებენ შემდეგი შედგენილობის საკვებ არეს (გრ/ლ): $NaNH_4HPO_4$-1.0; KH_2PO_4-0.5; K_2HPO_4-0.5; $MgSO_4$-0.4; NaCl-0.1; $MnSO_4$ და $FeSO_4$-კვალი, პეპტონი-0.5; $CaCO_3$-0.5.

წვრილად დაჭრილ ფილტრის ქაღალდის ზოლებს ათავსებენ სინჯარაში, ასხამენ მომზადებულ საკვებ არეს და ასტერილებენ, შემდეგ შეაქვთ ცხენის ნაკელი მცირე რაოდენობით, ინკუბირება ხდება 60°C. 5-7 დღის შემდეგ იწყება დუღილის პროცესი, ქაღალდი ყვითლდება და გარდაიქმნება ამორფულ მასად.

მიკროსკოპირებისათვის დაშლის პროცესში მყოფ ფილტრის ქაღალდს პინცეტით იღებენ და სასაგნე მინაზე აკეთებენ ნაცხს, აფიქსირებენ და ღებავენ ფუქსინით. უმეტეს შემთხვევაში მირკოსკოპში ჩნდება ჩხირისებური დიდი ზომის ბაქტერიები ბოლოში მომრგვალებული თავით-სპორით – ***Clotridium omelianski***, ან მსხლისებური ფორმის უჯრედები - ***C. dissolvens***. (სურათი).

თავი 16. აზოტშემცველი ორგანული ნაერთების მინერალიზაცია

ცილოვანი ნაერთების ამონიფიკაცია; მიკროსკოპირება; თვისობრივი რეაქცია ცილების ლპობად დაშლაზე; შარდოვანას ამონიფიკაცია; ნიტრიფიკაცია; ნიტრიფიკატორი ბაქტერიების გამოვლენა მყარ საკვებ არეებზე; ნიტრიფიკაციის პირველი ფაზა; ნიტრიფიკაციის მეორე ფაზა; ნიტრიფიკაციის პროცესი თხევად საკვებ არეებზე; დენიტრიფიკაცია; აზოტფიქსაცია;სიმბიოტური აზოტფიქსატორები; თავისუფლად მცხოვრები აზოტფიქსატორები; ასოციაციაცური ბაქტერიები.

ცილოვანი ნაერთების ამონიფიკაცია. ამონიფიკაცია-ორგანული აზოტის გარდაქმნა ამიაკურ ფორმად. მას იწვევს სხვადასხვა სახის მიკროორგანიზმები, რომლებიც გარემოში გამოყოფს პროტეოლითიურ ფერმენტებს (პროტეაზები და პეპტიდაზები), რომელთა ზემოქმედების ქვეშ ცილები ჰიდროლიზდება ამინომჟავებამდე, ეს უკანასკნელი, უჯრედში შესვლის შემდეგ დეზამინირდება და წარმოქმნის ამიაკს, ორგანულ მჟავებს და სხვა პროდუქტებს. ანაერობულ პირობებში ცილების დაშლისას გამოიყოფა ასევე H_2S, მერკაპტანი, სკატოლი და ინდოლი, რომელთაც გააჩნია არასასიამოვნო სუნი, კადავერინი და პუტრესცინი. აერობულ პირობებში საბოლოო პროდუქტი არის NH_3, CO_2, H_2O და სულფატები.

ცდის დაყენება: ცილოვანი ნართების ამონიფიკაციის შესასწავლად ლაბორატორიულ პირობებში საკვებ არედ გამოიყენება ხპბ, რომელსაც უმატებენ 3% პეპტონს.

30-30მლ საკვებ არეს ანაწილებენ ერლენმეიერის კოლბებში და უმატებენ 1/3ჩაის კოვზ ნიადაგს. კოლბას ახურავენ ბამბის საცობს. საკვების ზევით ათავსებენ ლაკმუსის ქაღალდს ან უნივერსალურ ინდიკატორს, რომელიც დასველებულია დისტილირებული წყლით-ამიაკის აღმოსაჩენად და ტყვიის აცეტატის ტუტე ხსნარში დასველებულ ფილტრის ქაღალადს-გოგირდწყალბადის და მერკაპტანის აღმოსაჩენად. ქაღალდების ზოლებს ათავსებენ საცობსა და კოლბის ყელს შორის ისე რომ არ მიეკაროს საკვებ არეს. 28-30°C კულტივირების 3-5 დღის შემდეგ ხდება კოლბის შიგთავსის ანალიზი და ამონიფიკაციის პროცესში მონაწილე მიკროორგანიზმების იდენტიფიკაცია, ასევე მათი ცხოველმყოფელობის პროდუქტების კვლევა.

მიკროსკოპირება ცილების ამონიფიკაციაში მონაწილე მიკროორგანიზმების აღმოსაჩენად ამზადებენ ცოცხალი ბაქტერიების პრეპარატს გაჭყლეტილ წვეთში, ასევე ფიქსირებულ და შეღებილ პრეპარატებს.

ხშირად პრეპარატში შეიძლება აღმოვაჩინოთ ***Proteus vulgaris***-ის მოძრავი უჯრედები. ეს სხვადასხვა ზომის ჩხირისებური უჯრედებია, რომლებიც არ წარმოქმნიან სპორებს (სურათი№----), ასევე პრეპარატზე შეიძლება აღმოჩნდეს ***Bacillus mycoides*** (სურათი№---) და ***Clostridium perfingens*** (სურათი№---).

Bac. Mycoides აერობია ხოლო ***C. perfingens***-ანაერობი, თუმცა შეუძლია აერობულ პირობებში განვითარება.

თვისობრივი რეაქცია ცილების ლპობად დაშლაზე. ატმოსფეროში გამყოფილის NH_3 ლურჯად ღებავს დაკიდებულ ლაკმუსის ქაღალდს.

კულტურალურ სითხეში ამიაკის დაგროვებას ადგენენ ნესლერის რეაქტივით. ფაიფურის ჯამზე თავსდება საკვლევი კულტურალური სითხე და ემატება რეაქტივის წვეთი. დიდი რაოდენობით ამიაკის არსებობისას წარმოიქმნება ყავისფერი ნალექი, ხოლო მცირე რაოდენობის შემთხვევაში-ნარინჯისფერი ან ყვითელი ფერი.

გოგირდწყალბადის აღმოსაჩენად გამოიყენება $Pb(CH_3COO)_2$-ით გაჟღენთილი ფილტრის ქაღალდი, რომელიც შავდება გოგირდწყალბადის თანაობისას, თუ მასზე წარმოიქმნება ვერცხლისფერი ნაფიფქი, ეს ნიშნავს, რომ H_2S ერთად იქ არის მერკაპტანი (მაგ. მეთილმერკაპტანი CH_3SH).

ინდოლის აღმოსაჩენად იყენებენ სალსკოვსკის რეაქციას ან რეაქციას პარადიმეთილამიდობენზალდეჰიდთან. პირველ შემთხვევაში 10მლ სუბსტრატს უმატებენ 1მლ 0.2% KNO_2 ხსნარს და რამოდენიმე წვეთ კონცენტრირბულ გოგირდმჟავას. ამ ნაერთების ურთიერთქმედებისას ინდოლთან მიიღება მოწითალო-მოიისფრო შეფერილობა. ამ რეაქციას ინდოლძმარმჟავას რეაქციას უწოდებენ.

მეორე რეაქცია უფრო სპეციფიურია. 10მლ ერთდღიანი კულტურის სუბსტრატს ემატება 5მლ პარადიმეთილამიდობენზალდეჰიდი და 5 მლ კალიუმის სულფატის ნაჯერი ხსნარი. ინდოლის თანაობისას მიიღება ინტენსიური წითელი შეფერილობა.

შარდოვანას ამონიფიკაცია

შარდოვანა-ადამიანისა და ცხოველის ორგანიზმში აზოტის ნაერთების გარდაქმნის საბოლოო პროდუქტი.

შარდოვანას ამონიფიკაციაში მონაწილე ბაქტერიები გამოიმუშავებს ფერმენტ ურეაზას, რომელიც ახდენს მის ჰიროლიზს ამიაკამდე:

$CO(NH_2)_2+2H_2O=2NH_3+CO_2+H_2O$

ნხშირბადის წყაროდ ისინი იყენებენ ნახშირწყლებს და ორგანული მჟავების მარილებს.

შარდოვანას ამონიფიკაციის პროცესზე დასაკვირვებლად ლაბორატორიულ პირობებში გამოიყენება შემდეგი შედგენილობის საკვები არე (გრ/ლ დისტილირებულ წყალში): K ან Na ტარტრატი-5.0; შარდოვანა-50.0; K_2HPO_4-0.5; $MgSO_4\times7H_2O$-0.2.

30მლ საკვებ არეს ჩამოასხამენ ერლენმეიერის კოლბებში და აინფიცირებენ ნიადაგით, შედგამენ თერმოსტატში 25-30°C. ამიაკის აღმოსაჩენად ბამბის საცობის ქვეშ ჩამოკიდებენ ლაკმუსის ქაღალდს, დასველებულს დისტილირებულ წყალში.

კულტივაციის 3-5 დღის შემდეგ ატარებენ ანალიზს. ამიაკის გამოყოფა დგინდება ლაკმუსის ქაღალდის სილურჯით ან ნესლერის რეაქტივით. კულტურალურ სითხეს ამატებენ ნესლერის რეაქტივს, ამიაკის არსებობის შემთხვევაში წარმოიქმნება ნალექი.

შარდოვანას ამონიფიკაციაში მონაწილე მიკროორგანიზმების იდენტიფიცირებისათვის ამზადებენ ფიქსირებულ პრეპარატს, რომელსაც ღებავენ ფუქსინით. მიკროსკოპის ქვეშ ძირითადად აღმოაჩენენ ***Urobacillus pasteurii***, ან ***Planosarcina ureae.***

ნიტრიფიკაცია

ნიტრიფიკატორი ბაქტერიების გამოვლენა მყარ საკვებ არეებზე

ნიტრიფიკაცია-ამიაკის დაჟანგვა ნიტრიტამდე და ნიტრატამდე. ამ პროცესში მონაწილეობს ნიტრიფიკატორი მიკროორგანიზმები, ძირითადად ორი გვარი:

Nitrosomonas $NH_4^+ + 1^1/_2O_2 = NO_2^- + 2H + H_2O$

Nitrobacter $NO_2^- + {}^1/_2O_2 = NO_3^-$

ამიაკის და ნიტრიტის დაჟანგვის ენერგიას ნიტრიფიკატორები იყენებენ ნახშირბადის დიოქსიდის ასიმილაციისათვის. ნიტრიფიკატორი ბაქტერიები ქემოლითოავტოტროფები არიან და ობლიგატურ აერობებს წარმოადგენენ.

ნიტრიფიკაციის პირველი ფაზა.

ნიტრიფიკაციის პირველი ფაზის მიკროორგანიზმების გამოსავლენად იყენებენ ვინოგრადსკის მეთოდს.

გარეცხილ და გადადუღებულ **სილიციუმმჟავა** ფირფიტებს გაუღენთავენ 3-5მლ ვინოგრადსკის საკვები არით, რომლის მინერალური საფუძველი არის შემდეგი (გრ/200მლ): $(NH_4)_2SO_4$-2.0; K_2HPO_4-1.0; $MgSO_4$-0.5; NaCl-0.4; $FeSO_4\times7H_2O$-0.4; $MgCO_3$ ან $CaCO_3$-5.0. საუკეთესო შედეგები მიიღება $(NH_4)_2SO_4$ ჩანაცვლებით $NH_4MgPO_4\times MgCO_3$; ასევე მნიშვნელოვანია გამოყენებამდე $CaCO_3$ დაქუცმაცება სტერილურ ფაიფურის როდინში.

საკვებ არეს პეტრის ჯამებში დააშრობენ 40-50°C თეთრი ზედაპირის მიღებამდე. მის ზედაპირზე ალაგებენ ნიადაგის გოროხებს, ამისათვის საათის მინებს ასტერილებენ ფლამბირებით, ერთზე ათავსებენ ნიადაგს, მეორეზე კი

დისტილირებულ წყალს, მინის წკირის ბოლოს ასველებენ სტერილურ დისტილირებულ წყალში და შემდეგ მისი საშუალებით იტაცებენ ნიადაგის გოროხს, რომელიც გადააქვთ ფირფიტის ზედაპირზე. პეტრის ჯამებს ათავსებენ ტენიან კამერაში და ალაგებენ თერმოსტატში 28-30 ^{O}C, გარკვეული დროის შემდეგ (7. 14. 21 დღე) ნიტრიფიკატორი ბაქტერიების აქტივობიდან გამომდინარე გოროხების ირგვლივ წარმოიქმნება ცარცის დაშლის ზონები, რაც ნიტრიფიკატორების განივითარების ნიშანია.

ამის შემდეგ შეიძლება ნიტრიფიკატორების რაოდენობისა (%) და მორფოლოგიის შესწავლა. ნიტროფიკატორი მიკროორგანიზმების რაოდენობის დასადგენად, პეტრის ჯამზე განლაგებული ნიადაგის გოროხები მიიჩნევა 100%. შემდეგ ითვლიან იმ გოროხების რაოდენობას, რომლის ირგვლივაც წარმოიქმნა ცარცის დაშლის ზონა, და ადგენენ მათ პროცენტულ თანაფარდობას გოროხების საერთო რადოენობასთან მიმართებაში. ნიტროფიკატორი ბაქტერიების ცხოველმყოფელობის პოდუქტების შესასწავლად, ნიადაგის გოროხებს გელიანად ამოჭრიან და ათავსებენ ფაიფურის ჯამზე, ამიაკის აღმოსაჩენად იყენებენ ნესლერის რეაქტივს, ამ დროს გელი ღებულობს მოყვითალო-მონარინჯისფრო შეფერილობას, ხოლო ნიტრიტის აღმოსაჩენად გამოიყენება გრისის რეაქტივი, თუ გელი არ განიცდის ცვლილებას მაშინ ის თავისუფალია ნიტრიტისაგან. ასეთი თვისობრივი რეაქციები ტარდება როგორც ცარცის დაშლის ზონის მქონე გელის მონაკვეთებზე, ასევე თავისუფალ მონაკვეთებზე, სადაც ცარცის დაშლა არ აღინიშნება.

ნიტრიფიკატორების თვისობრივი იდენტიფიცირებისთვის ამზადებენ ფიქსირებულ, შეღებილ პრეპარატს, მიკროსკოპში ჩანს ოვალური ფორმის ბაქტერიები- ***Nitrosomonas*** და ***Nitrospira*** (სურათი№--).

ნიტრიფიკაციის მეორე ფაზა ნიტრიფიკაციის მეორე ფაზაში მონაწილე ბაქტერიებზე დაკვირვება შესაძლებელია იგივე პეტრის ჯამებზე, სადაც განვითარებულია პირველი ფაზის ნიტრიფიკატორები, მხოლოდ კულტივირების დროის გახანგრძლივებით. ამიაკის გაქრობის შემდეგ წარმოქმნილი ნიტრიტი იჟანგება ნიტრატამდე. სტერილური ლანცეტით ჭრიან გელის მცირე ფრაგმენტს, ათავსებენ ფაიფურის ჯამზე, გრისის რეაქტივზე უარყოფიტი რეაქცია მიუთითებს ნიტრიტის არარსებობაზე, ხოლო ნიტრატის აღმოსაჩენად გელის ფრაგმენტს ათავსებენ დიფენილამინისა და კონცენტრირებული გოგირდმჟავას ხსნარში, აზოტმჟავას თანაობისას გელი იღებება მუქი ლურჯი შეფერილობით (ეს რეაქცია ტარდება მხოლოდ ნიტრიტის არარსებობის პირობებში).

თვისობრივი თვალსაზრისით ნიტრიფიკაციის მეორე ფაზის მიკროორგანიზმების ფიქსირებულ და შეღებილ პრეპარატზე მიკროსკოპში იდენტიფიცირდება მცირე ზომის, კუთხოვანი ფორმის უჯრედები-***Nitrobacter.***

ასევე შესაძლებელია მარტივი თვისობრივი რეაქციის ჩატარება ნიტრიფიკაციის ორივე ფაზის მიკროორგანიზმების იდენტიფიცირებისათვის, ეს არის ტეპერის მეთოდი, რომლის მიხედვით, გელის ფირფიტებზე, რომელზეც მიმდინარეობდა ნიტრიფიკაციის პროცესი პეტრის ჯამში ახამენ 6-8მლ სტერილურ წყალს და აყოვნებენ, ამ დროს მიკროორგანიზმები ამოტივტივდება ზედპირზე, შემდეგ მასზე ფრთხილად შეახებენ სასაგნე მინას და ფიქსირებულ პრეპრატს ღებავენ ფუქსინით, მთელი სპექტრი ნიტრიიკაციაში მონაწილე მიკროორგანიზმებისა აღირიცხება სასაგნე მინაზე.

ნიტრიფიკაციის პროცესი თხევად საკვებ არეებზე. ნიტრიფიკაციის I და II ფაზაზე დაკვირვება შესაძლებელია ასევე თხევად საკვებ არეებზე, თუმცა პროცესი მეტ-ნაკლებად თვალშისაცემია.

ნიტრიფიკაციის I ფაზის საკვები არე (%): $(NH_4)SO_4$-0.2; K_2HPO_4-0.1; $MgSO_4 \times 7H_2O$-0.05; NaCl-0.2; $FeSO_4 \times 7H_2O$-0.04; $CaCO_3$ ან $MgCO_3$-0.5.

ნიტრიფიკაციის II ფაზის საკვები არე (%): $NaNO_2$-0.1; Na_2CO_3 (უწყლო)-0.1; NaCl-0.05; K_2HPO_4-0.05; $MgSO_4 \times 7H_2O$-0.05; $FeSO_4 \times 7H_2O$-0.04.

30-30მლ საკვებ არეებს ჩამოასხამენ ერლენმეიერის კოლბებში, აინფიცირებენ ნიადაგით და დგამენ თერმოსტატში 25-30°C. 7 დღის შემდეგ (ზოგჯერ 14-21 დღის შემდეგ) ნიტრიფიკაციის პირველი ფაზის საკვებ არეში ჩნდება აზოტოვანი მჟავა, ნიტრიფიკაციის II ფაზის საკვებ არეში კი – აზოტმჟავა. ამიაკის გაქრობის შემდეგ (Iფაზისათვის) და აზოტოვანი მჟავის გაქრობის შემთხვევაში (II ფაზისათვის) ცდას ასრულებენ.

ნიტრიფიკაციის პირველი ფაზის კვლევისას აზოტოვანი მჟავის წარმოქმნას აკვირდებიან გრისის რეაქტივით, სინჯარაში ასხამენ 1 მლ გრისის რეაქტივს და 10 მლ საკვლევ კულტურალურ სითხეს და ადუღებენ. აზოტოვანი მჟავის თანაობისას მიიღება წითელი შეფერილობა:

$H_2N\text{-}C_6H_4SO_3H + C_{10}H_7\text{-}NH_2 + NO_2^- = H_2N\text{-}C_6H_6\text{-}N{=}N\text{-}C_6H_4\text{-}SO_3H$

ნიტრიფიკაციის მეორე ფაზაზე დაკვირვებისას ნიტრიტის გაქრობის შემდეგ ფაიფურის ჯამზე შეაქვთ საკვლევი სითხე და ამატებენ 1 წვეთ H_2SO_4 და 1 კრისტალ დიფენილამინს. თუ ხსნარში არის აზოტმჟავა მიიღება მუქი ლურჯი შეფერილობა.

თვისობრივი კვლევისათვის საკვები არის ზედაპირიდან ამოაქვთ მცირე რაოდენობის საკვლევი მასალა და ამზადებენ ნაცხს, რომელსაც იკვლევენ მიკროსკოპით.

დენიტრიფიკაცია

ნიტრატული სუნთქვა მიმდინარეობს ნიტრატის ბმული ჟანგბადის ხარჯზე. მრავალი ბაქტერია სუნთქვისას აღადგენს მოლეკულურ აზოტს ან აზოტის ოქსიდს. ნიტრატის დისიმილაციური აღდგენის ამ პროცესმა მიიღი დენიტრიფიკაციის სახელწოდება. დენიტრიფიკაციის პროცესში ორგანული სუბსტრატი იჟანგება CO_2 და H_2O წარმოქმნით.

$C_6H_{12}O_6 + 4NO_3^- = 6CO_2 + 6H_2O + 2N_2$

დენიტრიფიკატორი მიკროორგანიზმების უმრავლესობა ეკუთვნის ***Pseudomonas*** გვარს ***(P. fluorescens, P. stutzeri), Paracoccus (P. denitrificans).*** პროცესი ანაერობულია.

ლაბორატორიულ პირობებში დენიტრიფიკაციის პროცესის წარმოსაჩენად იყენებენ **გილტაის** საკვებ არეს (იხ. დანართი)

ერლენმეიერის კოლბაში ასხამენ მცირე რაოდენობით საკვებ არეს და აინფიცირებენ ნიადაგით. კოლბას კარგად ურევენ ჰაერის ბუშტუკების გამოსადევნად და ავსებენ ბოლომდე საკვები არით, ახურავენ კაუჩუკის საცობს, რომელზეც დამაგრებულია მინის თავმოჩრჩილული მილი, ისე რომ კოლბაში არსებული საკვების მცირე ნაწილი გადადის მილში (სურათი№---). ნახშირწყლების არარსებობა გამორიცხავს დუღილის პროცესს და ამ პირობებში მიკროორგანიზმები ვითარდებიან ნიტრატული ჟანგბადის ხარჯზე. 5-

6 დღის კულტივირების შემდეგ 28-30°C აკვირდებიან საცობის ქვეშ აირის ბუშტუკების წარმოქმნას და საკვები არის ფერის შეცვლას.

დენიტრიფიკატორების იდენტიფიკაციისათვის სუბსტრატის შუაგულიდან სტერილური პიპეტით ამოაქვთ კულტურალური სითხის წვეთი და ამზადებენ ფიქსირებულ პრეპარატს, რომელსაც ღებავენ და აკვირდებიან იმერსიით.

პრეპარატზე ჭარბობს ***Paracoccus denitrificans , Pseudomonas fluorescens*** და ***P. stutzeri***.

დენიტრიფიკატორი ბაქტერიების ცხოველმყოფელობის პროდუქტების აღმოსაჩენად ატარებენ რეაქციებს ნიტრატზე-დიფენილამინთან, ნიტრიტზე-ცინკ-იოდ-სახამებელთან ან გრისის რეაქტივთან და ამიაკზე-ნესლერის რეაქტივთან.

კულტივირების მეექვსე დღეს რეაქცია ნიტრატზე და ნიტრიტზე როგორც წესი უარყოფითია, ამიაკზე კი დადებითი. ნიტრატული აზოტის ძირითადი მასა აღდგება მოლეკულურ აზოტამდე, რაზეც მეტყველებს CO_2 და N_2 გამოყოფა. ამიაკის არსებობა კი მიუთითებს, რომ ეს მიკროორგანიზმები ამავდროულად აწარმოებენ ნიტრატის ამონიფიკაციას.

აზოტფიქსაცია

ნიადაგში აზოტის ბალანსის ერთ-ერთი მარეგულირებელი არის ბაქტერიების მიერ ატმოსფრული აზოტის ფიქსაციის პროცესი. მოლეკულური აზოტის ასიმილაციას აწარმოებენ პროკარიოტი ორგანიზმები, რომლებიც მცენარეებთან ურთიერთობის მიხედვით იყოფა:

- მცენარეებთან სიმბიოზში მყოფი - სიმბიოტური აზოტფიქსატორები;
- რიზოსფერული (ფესვის) და ფილოსფერული (ფოთლის)-ბაქტერიები, რომლებიც არიან ასოციაციაში პარკოსან მცენარეებთან - ასოციაციური აზოტფიქსატორები;
- ნიადაგის თავისუფლად მცხოვრები აზოტფიქსატორები – ბინადრობენ ნიადაგში და მათი ცხოველმყოფელობა არ არის დამოკიდებული მცენარეების არსებობაზე.

ყველა ზემოთ ჩამოთვლილი მიკროორგანიზმი არის დიაზოტროფი ანუ კვებისათვის იყენებს მოლეკულურ და მინერალურ აზოტს. ყოველწლიურად ხმელეთზე ბაქტერიები აფიქსირებენ 200მლნ ტ აზოტს, წყლის ეკოსისტემებში კი-30-190მლნ ტ.

სიმბიოტური აზოტფიქსატორები

სიმბიოზური აზოტფიქსაცია-მიკროორგანიზმების უნარი მოლეკულური აზოტის ფიქსაციისა მცენარეებთან სმიბიოზში ყოფნის პირობებში. 1300 მეტი სახეობის პარკოსანი მცენარეს, 200 მეტი სახეობის სხვა ბალახოვან და ბუჩქოვან (არამერქნიანი) მცენარეს გააჩნია ფესვებზე კოჟრები.

კოჟრის ბაქტერიები ეკუთვნის შემდეგ გვარებს – ***Rhizobium, Bradhyrhizobium, Azorhizobium*** და სხვა.

შეიჭრებიან რა მცენარეთა ფესვთა სისტმაში ეს ბაქტერიები, ვრცელდება როგორც წესი ინფექციური ძაფების სახით. ზრდასრულ კოჟრის ქსოვილში ბაქტერიალური უჯრედები გარდაიქმნება ბაქტერიოიდებად, რომლებსაც ჩხირისებური ბაქტერიალური უჯრედისაგან განსხვავებით აქვს მსხლისებრი, სფერული ან დატოტვილი ფორმა და ზომით 2-3 ჯერ აღემატება ბაქტერიალურ უჯრედს.

სხვადასხვა პარკოსანი მცენარეების კოჟრების ფორმა და ზომა განსხვავებულია (სურათი). კოჟრების დაშლას თან სდევს მცენარეული უჯრედის დეგრადაცია და ბაქტეროიდის ერთი ნაწილის ლიზისი, მაშინ როდესაც მეორე ნაწილი წარმოქმნის მცირე ზომის კოკისებურ უჯრედებს-ართროსპორებს, რომლებიც ასრულებენ გამრავლების ფუნქციას. ართროსპორების დანახვა შესაძლებელია მხოლოდ ელექტრონულ მიკროსკოპში მაღალ გადიდებებზე.

რიზობიუმების უჯრედები ლაბორატორიულ საკვებ არეებზე წარმოქმნიან გრამ უარყოფით ჩხირებს. მათ შორის გვხვდება კოკისებური ფორმებიც. დაბერებულ კულტურაში უჯრედები დიდი ზომისაა, ჩხირისებური, უძრავი, იშვიათად გვხვდება T-მსგავსი ბაქტეროიდული ფორმა.

ზრდის სიჩქარის მიხედვით კოჟრის ბაქტერიები იყოფა ნელაზრდად და სწრაფადზრდად ფორმებად.

კოჟრის ბაქტერიების პრეპარატები მზადდება ბოტანიკური ლანცეტით ან მიკროტომით, კოჟრის თხელი ანათალები თავსდება სასაგნე მინაზე და კეთდება გაჭყლეტილი წვეთის პრეპარატი, თუ მშრალი პრეპარატია მაშინ აუცილებელია მოიძებნოს კოჟრის ბაქტეროიდული ზონა, და ანათალის სითხელის პირობებში იმერსიული სისტემის გამოყენებით მისი კვლევა.

შემდეგ მზადდება კოჟრის ბაქტეროიდული ქსოვილიდან ფიქსირებული და შეღებილი პრეპარატები კოჟრის ბაქტერიებისა. თუ კოჭრი დიდია მას ჭრიან ან სტერილური ნემსით აზიანებენ და გამოდევნიან მისგან ერთ წვეთ სითხეს სასაგნე მინაზე, თუ მცირე ზომის კოჟრია მას ათავსებენ სასაგნე მინაზე, აწვეთებენ ერთ წვეთ წყალს და მეორე სასაგნე მინით დააჭერენ (გაჭყლეტენ) რათა მისი შიგთავსი გამოიდევნოს, რომელსაც შემდეგ ანაწილებენ სასაგნე მინაზე, აფიქსირებენ და ღებავენ კარბოლური ერითროზინით, ფუქსინით ან გენციანვიოლეტით. საუკეთესო შედეგი მიიღება, როცა შესაღებად იყენებენ ფუქსინისა და მეთილენის ლურჯის ნარევს (1:1) გახსნილს 1% ძმარაჟავაში. პრეპარატს საღებავში აყოვნებენ 2-5წთ. კოჟრის ქსივილი იღებება ლურჯად, ბაქტერია კი –წითლად.

კოჟრის ბაქტერიების კულტივირებისათვის ლაბორატორიულ პირობებში, კოჟრის მცირე ფრაგმენტს რეცხავენ სტერილურ წყალში, ასტერილებენ სპირტში, შემდეგ კვლავ რეცხავენ კოჟრის შიგთავსს გამოდევნიან სტერილური წყლის წვეთში და სუსპენზიას თესავენ პარკოსნების აგარზე ან ფრედის საკვებ არეზე (იხ. დანართი).

თავისუფლადმცხოვრები აზოტფიქსატორები

თავისუფლადმცხოვრებ ბაქტერიებს შორის დიდ ინტერესს იწვევს გვარები-***Closridium*** და ***Azotobacter***

C. pasteurianum-ობლიგატური ანაერობი, ენერგიის წყარო ამ ბაქტერიებისათვის არის ერბომჟავა დუღილი. ახალგაზრდა კულტურაში უჯრედებს გააჩნია ჩხირისებური ფორმა პერიტრიქიალურად განლაგებული შოლტებით. სპორები ოვალური ფორმისაა, გარშემორტყმულია კაფსულით. უჯრედებს გააჩნია კლოსტრიდიალური ფორმა, აგროვებენ სამარაგო ნივთიერებას გრანულოზას, რომელიც ლუგოლის გამოყენებისას იღებება ლურჯად. სპორაწარმოქმნის პროცესში გრანულოზა ქრება.

C. pasteurianum – ის დაგროვებითი კულტურის მისაღებად გამოიყენება ვინოგრადსკის ელექტიური საკვები არე (გ/ლ დისტილირებული წყალი):

გლუკოზა-20.0; K_2HPO_4-1.0; $MgSO_4 \times 7H_2O$-0.5; NaCl-0.5; $CaCO_3$-20.0. ნიადაგში ***C. pasteurianum***-ის უჯრედების (კოე) აღსარიცხად იყენებენ ემცევის საკვებ არეს (გ/ლ დისტილირებული წყალი): NaH_2PO_4-0.5; K_2HPO_4-0.5; $MgSO_4 \times 7H_2O$-0.5; NaCl-0.5; $FeSO_4$-0.01; $MnSO_4 \times 4H_2O$-0.01; მიკროელემენტების ნარევი ფიოდოროვის მიხედვით -1მლ (იხ. დანართი) გლუკოზა-20.0; პეპტონი-5.0; საფუვრის ავტოლიზატი-0.2მლ; $CaCO_3$-10; Ph-7.0.

100-150მლ კოლბაში ასხამენ 2/3 საკვებ არეს და ამატებენ 1/3 ჩაის კოვზ ნიადაგს. საკვები არის ელექტიურობას განაპირობებს ბმული აზოტის არარსებობა და ანაერობული პირობები. ცარცს უმატებენ ერბომჟავას გასანეიტრალებლად. კოლბებს ათავსებენ თერმოსტატში 25-30°C. რამოდენიმე დღის შემდეგ აკვირდებიან საკვების შემღვრევას და ზედაპირზე აირის ბუშტუკების წარმოქმნას. საკვები არის ზედაპირზე ვითარდება აერობული მიკროორგანიზმები, რომლებიც შთანთქავენ ატმოსფერულ ჟანგბადს. ინკუბაციის 4-5 დღის შემდეგ კულტურას აანალიზებენ.

საკვლევი სუბსტრატიდან ამოაქვთ ერთი წვეთი და აწვეთებენ სასაგნე მინაზე, მას უმატებენ ლუგოლის ხსნარს, აფარებენ საფარ მინას და აკვირდებიან იმერსიული ობიექტივით. უჯრედები, რომლებიც შეიცავენ გრანულოზას იღებება ლურჯად, როგორც წესი მათ თითისტარისებური ფორმა აქვთ (სურათი№----).

C. pasteurianum-ის სუფთა კულტურის გამოყოფა ხორციელდება დაგროვებითი კულტურიდან, მისი პასტერიზაციის შემდეგ სუსპენზიას განთესავენ აგარიზებულ ვინოგრადსკის საკვებ არეზე ან ემცევის (კარტოფილიან, სტაფილოიან) საკვებ არეზე: კარტოფილის ნახარში-500მლ; სტაფილოს ნახარში-500მლ; გლუკოზა-20გრ; K_2HPO_4-1გრ; $MgSO_4 \times 7H_2O$-0.5გრ; NaCl, $MnSO_4 \times 4H_2O$, $FeSO_4 \times 7H_2O$-კვალი; პეპტონი-5გრ; საფუვრის ავტოლიზატი-0.02მლ; $CaCO_3$-40გრ; აგარი-6გრ. ნახარშის მოსამზადებლად კანგაცლილ ბოსტნეულს 0.5-0.5კგ უმეტებენ 2-2ლ დისტილირებულ წყალს, ადუღებენ 10წთ, ფილტრავენ, შეავსებენ დისტილირებული წყლით საწყის მოცულობამდე.

Azotobacter chroococum აფიქსირებს აზოტს აერობულ პირობებში. მისი კოლონიები მუქი ყავისფერი შეფერილობისაა, თხევად კულტურებში წარმოქმნის აპკს, აგარზე კი-ლორწოვან კოლონიებს.

აზოტობაქტერის უჯრედები პლეიომორფულია-ჩხირისებურიდან-კოკისებურამდე. განლაგებულია ცალ-ცალკე ან წყვილ-წყვილად, გარშემორტყმულია ლორწოვანი კაფსულით რომლის აღმოჩენა შესაძლებელია ფუქსინისა და ტუშის შერევით (სურათი№----). უჯრედის შიგნით მკვეთრად გამოხატული მარცვლოვანება შეინიშნება.

აზოტობაქტერის კვლევისათვის გამოიყენება ვინოგრადსკის მეთოდი გელის ფირფიტებზე. ქლორის ნარჩენებისაგან გარეცხილი გელის ფირფიტები იჟღინთება 2-5 მლ შემდეგი შედგენილობის საკვები არით(გრ/200მლ დისტილირებულ წყალზე): მანიტი ან ლერწმის შაქარი-20.0; K_2HPO_4-1.0; $MgSO_4 \times 7H_2O$-0.5; NaCl-0.5; $FeSO_4 \times 7H_2O$-0.01; $MnSO_4 \times 4H_2O$-0.01; $CaCO_3$-5.0.

მას შემდეგ რაც საკვებ არეს ააორთქლებენ ზედმეტი ტენის გაქრობამდე, ფირფიტის ზედაპირზე განალაგებენ ნიადაგის გოროხებს (იხ. თავი----). საკვები არის ელექტიურობა უზრუნველყოფილია ბმული აზოტის არარსებობით და აერობული პირობებით.

ჯამებს ალაგებენ ტენიან კამერაში, 5-6 დღიანი ინკუბაციის შემდეგ აზოტობაქტერის არსებობის შემთხვევაში ნიადაგის გოროხების ირგვლივ წარმოიქმნება ლორწოვანი მასა.

ლორწოთი გარშემორტყმული კოლონიების პროცენტული თანაფარდობის განსაზღვრით შესაძლებელია იმის დადგენა თუ რომელი ნიადაგია აზოტობაქტერით მდიდარი.

ასევე, თუ წარმოქმნილი კოლონიები დროთა განმავლობაში მიიღებს რუხ შეფერილობას მას აკუთვნებენ ***A. chroococum***, თუ მწვანე მაფლუორესცირებელი მაშინ მორფოლოგიის მიხედვით ***A. agile*** (როგორც წესი ბინადრობს წყალში) ან ***A. vinelndii***. უფერული ლორწოვანი კოლონიები არის გვარი ***Beijerinckia***, ის ძირითადად გვხვდება მჟავე ტროპიკულ ნიადაგში.

მიკროსკოპირებისათვის მზადდება ფიქსირებული, შეღებილი პრეპარატები, როგორც წესი აზოტობაქტერის უჯრედები სფეროსებრია, გვხვდება დიპლოკოკებიც.

დაგროვებითი კულტურის მისაღებად გამოიყენება ბეიერინკის თხევადი საკვები არე (გრ/ლ ონკანის წყალი): მანიტი ან გლუკოზა-20.0; K_2HPO_4-0.2; $CaCO_3$-5.0; მიკროელემენტები ფიოდოროვის მიხედვით (იხ. დანართი)-1მლ; $MgSO_4 \times 7H_2O$-0.2.

ერლენმეიერის (100მლ) კოლბებში ასხამენ 30 მლ საკვებ არეს და აინფიცირებენ 1/3 ჩაის კოვზი საკვლევი ნიადაგით. ათავსებენ თერმოსტატში 28-30°C. 5-6 დღიანი ინკუბაციის შემდეგ საკვები არის ზედაპირზე ვითარდება აზოტობაქტერის აპკი. დაგროვებითი კულტურის მიკროსკოპირების შემდეგ, სუფთა კულტურის მისაღებად ის გადააქვთ აგარიზებულ ეშბის საკვებ არეზე (გრ/ლ ონკანის წყალი): მანიტი-20.0; K_2HPO_4-0.2; $MgSO_4 \times 7H_2O$-0.2; NaCl-0.2; K_2SO_4-0.1; $CaCO_3$-5.0; აგარი-20.0. მიკროელემენტები ფიოდოროვის მიხედვით-1მლ(იხ. დანართი).

ასოციაციური ბაქტერიები

ასოციაცური დიაზოტროფების 200 სახეობაა ცნობილი:***Azospirillum, Achromobacter, Arthrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Aquaspirillum, Xantobacter*** და სხვა. მათთვის დამახასიათებელია მცენარეთა ფესვების კოლონიზაცია მკვეთრად გამოხატული სტრუქტურების წარმოქმნის გარეშე.

როგორც წესი ამ მიკროორგანიზების აღრიცხვისათვის გამოიყენება გლუკოზოავტოლიზატური საკვები არე, რომლის საფუძველი არის ფიოდოროვა-კალინინსკაიას საკვები არე (გრ/ლ დისტილირებული წყალი): K_2HPO_4-0.74; KH_2PO_4-0.91; $MgSO_4 \times 7H_2O$-0.3; NaCl-0.5; $CaCl_2 \times 6H_2O$-0.1; $FeCl_3 \times 6H_2O$-0.01,; ამას ემატება (გრ) გლუკოზა-10; საფუვრის ავტოლიზატი-0.1; ბრომთიმოლბლაუ-0.2, ასევე (მკგ) ვიტამინები: ბიოტინი-10; რიბოფლავინი-200; ვიტამინი 12-2; თიამინი, პირიდოქსინი, კალციუმის პანტოტენატი, ნიკოტინისა და პარაამინობენზოის მჟავა-100-100.

30მლ საკვებ არეს ჩამოასხამენ 100მლ კოლბებში, ასტერილებენ 20წთ 0.5 ატმ. ინოკულაციისათვის იყენებენ 1:100 - 1:10 000 000 ნიადაგის განზავებებს, სამ-სამ პარალელად. კულტივირება მიმდინარეობს 25-28°C 3-4 კვირა. თუ საკვები არე შემჟავებულია Ph-6.0 გასანეიტრლებლად უმატებენ სტერილურ NaOH (0.1-0.2N). ცდის დასრულების შემდეგ აზოტის განსაზღვრა ხდება კელდალის მეთოდით (მასალას არ ვწერ რადგან ზედმეტად გადატვირთ ვს< გვ. 199???).

აზოტის საწყისი დონის მომატება 0.3მგ აზოტფიქსაციის მაჩვენებელს წარმოადგენს. აზოტფიქსატორი მიკროორგანიზმების რადოენობრივი დათვლა ხორციელდება მაკ-კრედის ცხრილით.

აზოტფიქსატორული აქტივობის განსაზღვრა შესაძლებელია ასევე აცეტილენური მეთოდით, ამისათვის ცდის დაყენებიდან 5-7 დღეს სტერილურ პენიცილინის ფლაკონებში გადააქვთ 3-3მლ კულტურალური სითხე, ახურავენ რეზინის საცობებს და აინკუბირებენ ატმოსფეროში, რომელიც შეიცავს 10% აცეტილენს 24სთ განმავლობაში. აზოტფიქსაციის პროცესის არსებობას ადგენენ აცეტილენის ეთილენამდე აღდგენით.

ზოგიერთი ასოციაციური აზოტფიქსატორების რაოდენობრივი განსაზღვრა შეიძლება მოხდეს ნიადაგის განზავებების პენიცილინის ფლაკონებში განთესვისას. ყოველ ფლაკონში შეაქვთ 3-3.5მლ საკვები არე (ამ შემთხვევაში ძირითად საკვებ არეს ემატება 0.06გრ/ლ საფუვრის ავტოლიზატი). 3-4 დღის შემდეგ საკვებ არეს ანეიტრალებენ სტერილური 0.05-1N NaOH, ბამბის საცობებს ცვლიან რეზინის საცობებით და თითოეულ ფლაკონში შეაქვთ 1მლ აცეტილენი. წარმოქმნილი ეთილენის რაოდენობას საზღვრავენ ინკუბაციის 1, 2 და 7 დღეს. სანდოა მონაცემი, როცა ეთილენის რაოდენობა აღემატება 5-6ნმ (ნანომოლი). ამ საკვებ არეზე იზრდება ***Xanthomonas*** გვარის ბაქტერიები, ასევე ენტერობაქტეიები. კლოსტრიდიები და აზოტობაქტერი ამ საკვებ არეზე არ ვითარდება.

ქსანტობაქტერის რაოდენობრივი აღწერისათვის კულტივირება ხდება არგონის, წყალბადის, ნახშირორჟანგის და ჟანგბადის შემცველ ატმოსფეროში, პენიცილინის ფლაკონებით. ასევე შეიძლება გამოყენებულ იქნეს თხევადი საკვები არე, რომლის საფუძველია ფიოდოროვა-კალინინსკაიას მინერალური საკვები (იხ. დანართი---), ბიოტინი-10მკგ/ლ; მეთანოლი-2.0გრ და საფუვრის ავტოლიზატი-0.06გრ. აცეტილენი ფლაკონებში შეაქვთ დათესვიდან 2-3დღეს. წარმოქმნილი ეთილენის რადოენობას საზღვრავენ 7 დღეს, ხოლო რაოდენობრივ მახასიათებლებს ადგენენ მაკ-კრედის ცხრილით. მიკროსკოპირება შესაძლებელია მინერალურ აგარიზებულ საკვებ არეზე ან კარტოფილიან აგარზე განთესვით.

ასოციაციურ ბაქტერიებს შორის საინტერესოა ასევე ***Azospirillum.*** ეს არის მსხვილი ვიბრიონები ან ჩხირები, წაწვეტებული ბოლოებით, მოძრაობენ შოლტებით ახალგაზრდა ასაკში, ცისტურ მდგომარეობაში და დაბერების პერიოდში კარგავენ მოძარობის უნარს.

აზოსპირილების გამოსაყოფად მცენარის ფესვების ფრაგმენტებს არბილებენ ფლამბირებული პინცეტით და ათავსებენ ნახევრად თხევად საკვებ არეში (გრ/ლ დისტილირებული წყალი): L-ვაშლის მჟავა-5; K_2HPO_4-0.5; $MgSO_4 \times 7H_2O$-0.2; NaCl-0.1; $CaCl_2$-0.02; KOH-4; აგარი-7.75. ასევე (მლ): მიკროელემენტების ხსნარი-2; ბრომთიმოლის ლურჯი - (5% სპირტხსნარი), Fe-EDTA (1.64% ხსნარი); ვიტამინების ხსნარი-1. მიკროელემენტების ხსნარი შეიცავს (გრ/200მლ დისტილირებული წყალი): $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$-0.2; $MnSO_4 \times H_2O$-0.235; H_3BO_3-0.28; $CuSO_4 \times 5H_2O$-0.008; $ZnSO_4 \times 7H_2O$-0.024. ვიტამინების ხსნარი კი (გრ/10მლ დისტილირებული წყალი): ბიოტინი-10; პირიდოქსინი-20.

საკვები არის Ph 6.8, ადუღებენ აგარის გალღობამდე და ასტერილებენ 15 წთ $121^{O}C$. ფესვებით ან ნიადაგით ინოკულაციის შემდეგ ფლაკონებს დგამენ

თერმოსტატში 40 სთ 32 ^{O}C. შემდეგ ამოწმებენ ნიტროგენაზურ აქტივობას, თუ საკვები არის ზედაპირზე განვითარებული მიკროორგანიზმები აღადგენენ აცეტილენს, მათ განთესავენ პეტრის ჯამებზე, სადაც ჩამოსხმულია იმავე შემადგენლობის საკვები არე, მხოლოდ დამატებულია 1.5% აგარი და 20მგ საფუვრის ექსტრაქტი 1 ლ საკვებზე. ერთი კვირის შემდეგ წარმოქმნილი თეთრი კოლონიები გადააქვთ საკვებ არეზე, რომელიც მზადდება შემდეგნაირად. 200გრ გარეცხილ, გასუფთავებულ, დაჭრილ კარტოფილს ათავსებენ დოლბანდის ჩანთაში, ადუღებენ 30 წთ 1ლ წყალში, გაფილტრავენ ბამბით. ფილტრატს ინახავენ. 2.5გრ ვაშლის მჟავას ხსნიან 50მლ წყალში და უმატებენ 2 წვეთ ბრომთიმოლბლაუს (დაახლოებით 2გრ), სანამ ვაშლის მჟავის ხსნარი არ გახდება მწვანე (Ph 7).

ვაშლის მჟავის, ვიტამინების ხსნარს (1მლ) და აგარს (15გრ) უმატებენ ფილტრატს, მოცულობა დისტილირებული წყლით მიყავთ 1ლ, ადუღებენ აგარის გალღობამდე და ასტერილებენ 121°C 15 წთ.

თავი 17. გენეტიკის ძირითადი კანონზომიერებები

*ძირითადი წარმოდგენები; **მუტაგენეზი;** სპონტანური მუტაციები; ინდუცირებული მუტაციები; მუტაგენის შერჩევა; ულტრაიისფერი გამოსხივება (უი); ნიტროზოგუანიდინი; აზოტოვანი მჟავა; მაალკილირებელი აგენტები; მუტაგენებთან მუშაობისას უსაფრთხების წესები; **მუტაციის ექსპრესია; მუტანტების გადარჩევა;** მუტანტების პირდაპირი გადარჩევა; მუტანტების არაპირდაპირი გადარჩევა; ინდიკატორული საკვები არეების გამოყენება; ანაბეჭდის მეთოდი; მუტანტური უჯრედების პენიცილინით გამდიდრების მეთოდი; **გენეტიკური ინფორმაციის გადატანა ბაქტერიებში; ტრანსფორმაცია; კონიუგაცია; არაკონიუგაციური პლაზმიდების მობილიზაცია;** შეჯვარება.*

ძირითადი წარმოდგენები. თანამედროვე ბიოლოგიის ერთ-ერთი ცენტრალური მიმართულება არის გენეტიკა-მეცნიერება მემკვიდეობითობისა და ცვალებადობის შესახებ. მემკვიდრეობითობა უზრუნველყოფს შთამომავლობას

შორის მატერიალურ და ფუნქციონალურ კავშირს. მემკვიდრეობითი ინფორმაცია, რომელიც საჭიროა ორგანიზმის თვითწარმოქმნისათვის და არსებობისათვის ლოკალიზებულია გენებში, რომლებიც თავის მხრივ სამი ძირითადი თავისებურებით ხასიათდებიან: ისინი ასრულებენ სპეციფიურ ფუნქციას, შეუძლიათ ზუსტი ასლის წარმოქმნა, და არიან ძალიან სტაბილურები. გენები განლაგებულია ხაზოვნად ქრომოსომაზე და თითოეულ მათგანს გააჩნია თავისი ადგილი ანუ ლოკუსი.

პროკარიოტები და ეუკარიოტები განსხვავდება გენეტიკური ორგანიზაციით. პროკარიოტებში მემკვიდრეობითი ინფორმაცია განლაგებულია რგოლური დნმ მოლეკულაში ბაქტერიალურ ქრომოსომაში. ასევე ნაწილი მემკვიდრეობითი ინფორმაციისა შეიძლება ინახებოდეს პლაზმიდებში-ავტონომიურად რეპლიცირებად, კოვალენტურად დახვეულ დნმ მოლეკულებში. ეუკარიოტებში მემკვიდრეობითი ინფორმაცია განლაგებულია ბირთვში არსებულ ქრომოსომებში. ექსტრაქრომოსომული დნმ ეუკარიოტებში წარმოდგენილია პლაზმიდურ, პლასტიდურ ან მიტოქონდრიალურ დნმ-ში.

ცვალებადობა შეიძლება იყოს მემკვიდრეობითი და არამემკვიდრეობითი. არამემკვიდრეობითი ცვალებადობა (მოდიფიკაციური) არის ადაპტაციური, შემგუებლური შეცვლილი საარსებო გარემო პირობების მიმართ. ამასთანავე ის არის გენეტიკურად დეტერმინირებული და ორგანიზმის რეაქციის ნორმის ფარგლებში მოქმედებს.

მემკვიდრეობითი ცვალებადობა იყოფა კომბინაციურად და მუტაციურად. კომბინაციური ცვალებადობისას გენები არ იცვლება, მიმდინარეობს მხოლოდ მათი ან სხვადასხვა ალელების მატარებელი ქრომოსომების გადარეკომბინირება.

ამავე დროს მიუხედავად სტაბილურობისა გენები ექვემდებარება შემთხვევით ცვლილებებს-მუტაციებს. რის შედეგედაც მიიღება საწყისი გენისაგან ფუნქციონალურად განსხვავებული ახალი ალელები. მუტაციური ცვალებადობა-არის გენეტიკური მასალის ახალი დისკრეტული ერთეულების წარმოქმნა.

მიკროორგანიზმების თითოეული სახეობა შეიძლება იყოს წარმოდგენილი რიგი შტამებით. მიკროორგანიზმების გენეტიკაში ტერმინი შტამი აღნიშნავს განსაზღვრული სახეობის ერთგვაროვან კულტურას, რომელიც გამოყოფილია ერთი უჯრედიდან და შეიძლება განსხვავდებოდეს ერთმანეთისაგან სისტემატიკისათვის უმნიშვნელო ნიშან-თვისებებით. შტამს, რომელიც გამოყოფილია ველური ბუნებიდან ეწოდება ველური შტამი. მიკროორგანიზმების გენეტიკური ანალიზის ერთ-ერთი მეთოდია კულტურის კლონირება. კლონი-გენეტიკურად ერთგვაროვანი შთამომავლობა, რომელიც მიიღება ერთი უჯრედის გამრავლებისას. ეუკარიოტულ მიკროორგანიზმებში კლონი ეს არის ერთი უჯრედის შთამომავლობა (სპორა), რომელიც იყოფა მიტოზურად.

ცალკეული კლონების გამოყოფა საშუალებას იძლევა შევისწავლოთ გენეტიკურად ერთგვაროვანი უჯრედების ერთიანობის (პოპულაცია) თავისებურებები. პრაქტიკაში კლონი მიიღება მყარი საკვები არის ზედაპირზე გაზრდილი მიკროორგანიზმების ცალკეული კოლონიიდან, რომელიც თავის მხრივ მიღებულია ერთი უჯრედიდან, პრინციპი-ერთი უჯრედი-ერთი კოლონია.

მიკროორგანიზმების სახასიათო ნიშან-თვიესებები შეიძლება იყოს მორფოლოგიური, ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური, ერთობლიობაში ისინი წარმოადგენს ფენოტიპს. გენოტიპის მემკვიდრეობითი საფუძველი არის გენოტიპი.

გენეტიკური ექტპერიმენტების ჩატარებამდე აუცილებელია დავრწმუნდეთ შტამის სისუფთავეში.

მუტაგენეზი

მუტაცია არის მემკვიდრეობითი ცვალებადობის პირველწყარო, რომელიც გენეტიკურ რეკომბინაციასთან ერთად იძლევა ევოლუციისა და ხელოვნური გადარჩევისათვის მასალას. ის წარმოადგენს მნიშვნელოვან ინსტრუმენტს გენეტიკური და ბიოქიმიური კვლევებისათვის:

1. გენში და შესაბამისად ფენოტიპში გამოწვეული ცვლილებების ხარჯზე მუტაცია ასრულებს გენეტიკური მარკერის როლს, რომელიც იძლევა საშუალებას არა მარტო გენის იდენტიფიცირებისა, არამედ ქრომოსომაზე, პლაზმიდაზე ან დნმ სხვა მოლეკულაზე მისი ლოკალიზაციისა გენეტიკური კარტირების მეთოდებით.
2. მუტაციის არსებობა საშუალებას იძლევა გამოკვლეულ იქნეს მეტაბოლიზმის პროცესები და მოხდეს მათი გენეტიკური კონტროლი.
3. მუტაციის შედეგად შეცვლილი ცილების კვლევა შესაძლებლობას იძლევა დადგინდეს მათი სტრუქტურა და ფუნქციონირების თავისებურებები
4. მუტაცია არის საფუძველი მიკროორგანიზმთა შტამების სელექციისა.

წარმოშობის მიხედვით მუტაციები შეიძლება იყოს სპონტანური ან ინდუცირებული.

სპონტანური მუტაციები

სპონტანური მუტაციები წარმოიქმნება ბუნებრივ პირობებში უჯრედში მიმდინარე ნორმალური პროცესების ხარჯზე ან უჯრედის გარემოსთან ურთიერთქმედების შედეგად. მუტაგენური თავისებურებებით გამოირჩევა გარემოს არაკონტროლირებადი ფაქტორები, მაგ. ბუნებრივი რადიაცია. მუტაგენური ზემოქმედება შეიძლება გამოიწვიოს საკვები არეების ზოგიერთმა კომპონენტმა, არსებითი მნიშვნელობა მუტაციის ამ პროცესებში გააჩნია ასევე რეკომბინაციას, რეპლიკაციას და რეპარაციას. უჯრედის პოპულაციაში სპონტანური მუტაციები წარმოიქმნება ძალიან იშვიათად (10^{-5}-10^{-7}), მაგრამ, როცა არსებობს მუტანტური ფენოტიპის სელექციის მეთოდი, შესაძლებელია უფრო იშვიათი შემთხვევების გამოვლენაც. ასეთი მეთოდების არსებობისას უპირატესობა ენიჭება სწორედ სპონტანური მუტანტების გადარჩევას, რადგან

მრავალი მუტაგენური ფაქტორი ადამიანისათვის დიდ საშიშროებას წარმოადგენს, ხოლო ქიმიური მუტაგენები ამავდროულად აბინძურებენ გარემოს.

ინდუცირებული მუტაციები

მუტაგენები-ქიმიური, ფიზიკური ან ბიოლოგიური ფაქტორები, რომლებიც აინდუცირებენ მუტაციას. ესენია-მაიონიზირებელი გამოსხივება, ულტრაიისფერი სხივები, ტრანსპოზონური ელემენტები, ტრანსპოზონების მსგავსი ფაგები, ასევე გენი მუტატორები (მუტაციები გარკვეულ გენებში).

მუტაგენის შერჩევა

მუტაგენის შერჩევა განისაზღვრება მუტაციის ტიპით, რომლის მიღებას სურთ და მუტაგენის ეფექტურობით საკვლევი მიკროორგანიზმის მიმართ. მაგ. დელეციურ მუტანტებს გააჩნიათ მკვეთრად გამოხატული ფენოტიპი, არ არიან ტემპარატურადამოკიდებული პირობითად ლეტალური. ველური ტიპის მიმართ ჭეშმარიტი რევერსიები მათთში შეუძლებელია. სხვადასხვა ტიპის მიკროორგანიზმები ითხოვენ ეფექტური მუტაგენეზისათვის სხვადასხვა დოზებსა და პირობებს. ამ მიზნით ექსპერიმენტის დაწყებამდე აუცილებელია მიკროორგანიზმის გადარჩენის მრუდის აგება მოცემული მუტაგენური ფაქტორის დოზიდან და დამუშავების დროიდან გამომდინარე.

ულტრაიისფერი გამოსხივება (უფ) არის მარტივი მეთოდი საკვლევ მიკროორგანიზმებში მუტანტების მიღებისა. რადგან ულტრაიისფერი სხივები სუსტი მუტაგენებია. საუკეთესო შედეგები მიიღება უჯრედების გადარჩენის ხარისხის დაბალი მაჩვენებლის პირობებში (0.1-1.0%). ულტრაიისფერი სხივები მთლიანად შთაინთქმება მინის მიერ, ამიტომ დასხივების წინ ვეგეტატიური უჯრედების ან სპორების სუსპენზიას ათავსებენ მინის თავღია ჭურჭელში-პეტრის ჯამში. ეკრანირების ეფექტის თავიდან აცილების მიზნით სუსპენზიების კონცენტრაცია უნდა იყოს არაუმეტეს 5×10^8 უჯრედი/მლ და დასხივებისას გამოყენებულ უნდა იქნეს ბუფერული ხსნარები. უფ-ის ლეტალური ეფექტი დამოკიდებულია უჯრედების ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე, უპირველეს ყოვლისა მათ ასაკზე. როგროც წესი ექსპონენციალური ზრდის პირობებში კულტურები უფრო მგრძნობიარეა უფ-ს მიმართ ვიდრე სტაციონარულ ფაზაში. გარდა ამისა დასხივება უნდა წარმოებდეს პირობებში როცა გამორიცხულია ფოტორეაქტივაცია ანუ სიბნელეში.

ნიტროზოგუანიდინი - N-მეთილ-N-ნიტრო-N-ნიტროზოგუანიდინი (ნგ) არის ერთ-ერთო ყველაზე ძლიერი და ფართოდ გამოყენებადი მუტაგენი. ნგ საწყისი ხსნარები მზადდება უშუალოდ გამოყენების წინ. მას ხსნიან შესაბამის ბუფერში (0.1M ციტრატული ბუფერი, Ph 5.5) კონცენტრაცია 1მგ/მლ. ნგ სამუშაო კონცენტრაცია არის 50-500მკგ/მლ. საკვლევი კულტურის 5მლ სითხიდან (ექსპონენციალური ფაზა) უჯრედებს ლექავენ ცენტრიფუგირებით, რეცხავენ შესაბამისი რაოდენობის ციტრატული ბუფერით, უმატებენ ნგ და აინკუბირებენ 30-37°C განსაზღვრული დროის განმავლობაში. დამუშავების დრო უნდა შეირჩეს ისე, რომ უჯრედების გადარჩენის ხარისხი 50% შეადგენდეს. უჯრედებს

ამუშავებენ ნგ საბოლოო კონცენტრაციით 50-500მკგ/მლ 30წთ განმავლობაში. დამუშავებულ უჯრედებს აცენტრიფუგირებენ, რეცხავენ ფოსფატური ბუფერით (Ph 7.0) ან მინიმალურ საკვები არით (იხ, დანართი) ნგ ნარჩენების მოსაცილებლად, შემდეგ უჯრედებს ათავსებენ მდიდარ საკვებ არეზე (იხ. დანართი) და აინკუბირებენ 12-16სთ.

აზოტოვანი მჟავა მის ხსნარს ამზადებენ უშუალოდ გამოყენების წინ, ნატრიუმის ნიტრატს ხსნიან 0.1M Na-აცეტატურ ბუფერში (Ph-4.6) საბოლოო კონცენტრაცია 0.05 .

საკვლევ უჯრედებს (5მლ ექსპონენციალური ფაზაში მყოფი კულტურა) აცენტრიფუგირებენ, რეცხავენ Na-აცეტატური ბუფერის შესაბამისი რაოდენობით, ახდენენ უჯრედების რესუსპენდირებას 1 მლ აზოტოვანი მჟავის ხსნარში და აინკუბირებენ 30- 37°C გარკვეული დროის განმავლობაში. დამუშავების დრო უნდა შეირჩეს ისე, რომ გადარჩენილი უჯრედების რადოენობა შეადგენდეს 0.01-0.1%. უჯრედებს ამუშავებენ აზოტოვანი მჟავით 10-20წთ, ინკუბაციის დასრულების შემდეგ სუსპენზიას უმატებენ მინიმალური საკვებ არეს რეაქციის შესაჩერებლად. უჯრედებს აცენტრიფუგირებენ, ასუსპენდირებენ 10მლ მდიდარ საკებ არეში და აინკუბირებენ მთელი ღამის განმავლობაში.

მაალკილირებელი აგენტები მათგან ყველაზე ხშირად მუტაგენად იყენებენ ეთილმეთანსულფონატს(ემს). საკვლევ უჯრედებს (5მლ ექსპონენციალური ფაზაში მყოფი კულტურა) აცენტრიფუგირებენ და ასუსპენდირებენ 2მლ მინიმალურ საკვებ არეში (ნახშირბადის წყაროს გარეშე), რომელიც შეიცავს 0.2 TRIS – HCl (Ph-7.5), უჯრედების სუსპენზიას უმატებენ 0.03მლ ემს, ენერგიულდ ურევენ მის საბოლოო გახსნამდე და აინკუბირებენ 30-37°C 1-2სთ (სასურველია სანჯღრეველაზე). შემდეგ უჯრედების სუსპენზიას უმატებენ 10-15მლ მინიმალურ ან მდიდარ საკვებ არეს და აინკუბირებენ მთელი ღამის განმავლობაში.

მუტაგენებთან მუშაობისას უსაფრთხების წესები

ფიზიკური და ქიმიური მუტაგენები არა მარტო ზრდიან მუტაციის სიხშირეს, არამედ მრავალი მათგანი ხასიათდება კანცეროგენული თვისებებით, ასევე მათი მოხვედრა ორგანიზმის შიგნით ან ზედაპირზე იწვევს სხვადასხვა ხარისხის დამწვრობებსა და მოწამლვას.

მუტაგენებთან მუშაობისას აუცილებელია შემდეგი წესების ზუსტი და მკაცრი დაცვა:

1.ქიმიური მუტაგენებთან მუშაობა ამწოვ კარადაში, რომლის სამუშაო ზედაპირი დაფარულია ფილტრის ქაღალდით;

2.ხელები უნდა იყოს დაცული რეზინის ხელთათმანებით;

3.მუტაგენების ხსნარებთან მუშაობისას აუცილებელია ავტომატური პიპეტების გამოყენება;

4.მუტაგენების ხსნარების გადაღვრა წყლის ნიჟარაში არ შეიძლება. სასურველია ხსნარით გაიუღინთოს სხვადასხვა მყარი მასალა, მაგ, ვერმიკულიტი და მოთავსდეს ჰერმეტულ კონტეინერში.

5. უფ მუშაობისას აუცილებელი თვაელბის დაცვა მინის სათვალეებით.

მიკროორგანიზმებში მუტაციის ინდუქციისათვის გამოყენებული ზოგიერთი მუტაგენის თვისებები

მუტაგენი	მოქმედების მექანიზმი	მუტაციის ტიპი	ეფექტურობა	თავისებურებები
რადიაცია				
რენტგენული დასხივება, სწრაფი ნეიტრონები	ქრომოსომების გახლეჩა	დელეცია, ინვერსია	საშუალო	საჭიროებს სპეციალურ აპარატურას
ულტრაიისფერი	პირიმიდინების დიმერიზაცია	ტრანზიცია, ტრანსვერსია, დელეცია	საშუალო	მუტაციის ინდუქციის მაღალი ხარისხი მიიღწევა გადარჩენილი უჯრედების დაბალი მაჩვენებლით და ფოტორეაქტივაციის გამორცხვით
ქიმიური აგენტები				
2-ამინოპურინი; 5-ბრომურაცილი	შეცდომები დნმ რეპლიკაციაში	ტრანზიცია	დაბალი	სუსტი მუტაგენი
ჰიდროქსილამინი	ციტოზინის დეზამინირება	ტრანზიცია	დაბალი	სუსტი მუტაგენი
აზოტოვანი მჟავა	ციტოზინისა და ადენინის დეზამინირება	ტრანზიცია, დელეცია	საშუალო	მუტაციის ინდუქციის მაღალი ხარისხი მიიღწევა გადარჩენილი უჯრედების დაბალი მაჩვენებლი პირობებში
ნიტროზოგუანიდინი	რეპლიკაციურ ჩანგალში ფუძეების ალკილირება	ტრანზიცია, ტრანსვერსია, დელეცია (დაბალი სიხშირით)	ძალიან მაღალი	საშიშია მუშაობისას, მაღალია მეორადი მუტაციების ხარისხი
ემს	გუანიდინის ალკილირება	ტრანზიცია, ტრანსვერსია	მაღალი	საშიშია მუშაობისას
აკრიდინული საღებავები	დნმ რეპლიკაციისას ფუძეებს შორის	მუტაციები წაკითხვის ჩარჩოს	დაბალი	ეფექტურია უჯრედების პლაზმიდებიდან გამოცალკევების

	ინტერკალაცია	გადაადგილებით, დელეცია, ჩადგმები		დროს
ბიოლოგიური აგენტები				
გენი-მუტატორები	დნმ რეპლიკაციის და რეპარაციის დარღვევა	ტრანზიცია, ტრანსვერსია	საშუალო	აუცილებელია შტამების გენეტიკური კონსტრუირება
ტრანსპოზიური ელემენტები(IS-ელემენტები, ტრანსპოზონები)	დნმ-ში ჩართვა	ჩადგმები, დელეცია	ძალიან მაღალი	აუცილებელია შტამების ან ვექტორების გენეტიკური კონსტრუირება

მუტაციის ექსპრესია. მიკროორგანიზმებში ექსპონანციალური ზრდის ფაზაში ქრომოსომების დაყოფის სიჩქარე (პროკარიოტებში) და ბირთვის დაყოფის სიჩქარე (ეუკარიოტებში) წინ უსწრებს უჯრედების დაყოფას, ამიტომ მუტაციების გამოსავლენად, რომელთა უმრავლესობა რეცესიულია აუცილებელია ე.წ. სეგრეგაციული ლაგ-პერიოდი, რომლის დროსაც მიმდინარეობს მუტანტური ქრომოსომებისა და ბირთვების შემცველი უჯრედების წარმოქმნა. ასევე, ზოგიერთი მუტაციის გამოსავლენად აუცილებელია დამატებითი ფენოტიპური ლაგ-პერიოდი. მაგ. ***E.coli*** ფაგის მიმართ მდგრადობის მუტაციის გამოსავლენად აუცილებელია, რომ უჯრედის კედლის ყველა რეცეპტორი ჩანაცვლდეს მუტანტურით. ეს ხდება მხოლოდ 12 დამატებითი გაყოფის შემდეგ. ამიტომ უჯრედების სუსპენზია დამატებით უნდა გავზარდოთ (გავაჩეროთ) გარკვეული პერიოდის განმავლობაში, და ამ პერიოდის ხანგრძლივობა დამოკიდებულია უჯრედის დაყოფის სიჩქარეზე, ასევე კულტურის ზრდის თავისებურებებზე. კულტურებში, რომლების ჯგუფებად იზრდებიან ეს პერიოდი უფრო ხანგრძლივია, ვიდრე შტამებისათვის, რომელთაც ახასიათებთ ერთეული ზრდა.

უჯრედების მუტაგენით დამუშავებისას ყველა როდი წარმოადგენს დამოუკიდებელ მუტანტს, ზოგიერთი მათგანი წარმოიქმნება საწყისი მუტანტური უჯრედიდან მათი გამრავლების გზით. ამიტომ, დამოუკიდებელი მუტანტების მისაღებად კულტურას, მუტაგენით დამუშავების შემდეგ ყოფენ რიგ სუბკულტურებად და თითოეული სუბკულტურიდან გადაარჩევენ მხოლოდ ერთ მუტანტს.

მუტანტების გადარჩევა. მუტანტების პირდაპირი გადარჩევა. სელექტიური საკვები არეების გამოყენება ხშირ შემთხვევაში იძლევა საშუალებას მუტანტების პირდაპირი გადარჩევისა. ასეთ მუტანტებს მიეკუთვნება უჯრედები,

რომლებსაც გააჩნიათ მდგრადობა სხვადასხვა ნაერთების მაგ. ანტიბიოტიკების, ტოქსიური ნერთებისა და ფაგების მიმართ. ყველა ამ შემთხვევაში საკვები არე უნდა შეიცავდეს შესაბამის დანამატს (ანტიბიოტიკს), რომელიც დათრგუნავს ველური ტიპის უჯრედების ზრდას. ასევე პირდაპირი გადარჩევით შეიძლება შეირჩეს მუტანტები, რომელთაც შესწევთ უნარი აზოტისა და ნახშირბადის არატრადიციული წყაროების უტილიზაციისა. ამ შემთხვევაში საკვებ არეში არ უნდა შედიოდეს ველური ტიპის უჯრედების ზრდისათვის აუცილებელი რომელიმე ფაქტორი.

მუტანტების პირდაპირი შერჩევისას მნიშვნელოვანია სელექტიური აგენტის ოპტიმალური კონცენტრაციის შერჩევა, რომელიც დათრგუნავს ველური ტიპის უჯრედების ზრდას და ამავე დროს ხელს შეუწყობს მუტანტების განვითარებას.

სელექტიური საკვები არეებით შეიძლება ასევე რევერტანტების შერჩევა-უჯრედების, რომლებსაც ჭეშმარიტი ან სუპრესორული უკუმუტაციების ხარჯზე აღუდგათ ველური ტიპის უჯრედებისათვის დამახასიათებელი თავისებურებები.

პირდაპირი გადარჩევის მეთოდი გამოირჩევა მაღალი მგრძნობელობით რადგან იძლევა საშუალებას არამუტირებული უჯრედების ფონზე იშვიათი მუტანტური უჯრედების შერჩევისა.

მუტანტების არაპირდაპირი გადარჩევა.

ინდიკატორული საკვები არეების გამოყენება-საკვები არეები, რომლებზეც სხვადასხვა ფენოტიპის მიკროორგანიზმები განსხვავდება ერთმანეთისაგან გარეგნული თვისებებით ხშირად გამოიყენება მიკროორგანიზმთა გენეტიკაში. ისინი საშუალებას იძლევა განვასხვაოთ მიკროორგანიზმები კოლონიის ფერით. ინდიკატორული საკვები არეების ორი ტიპი არსებობს: ნივთიერებათა ათვისების ინდიკატორებით და ქრომოგენული სუბსტრატით.

საკვები არეები ნივთიერებათა ათვისების ინდიკატორით შეიცავს რაიმე ტიპის ნახშირწყალს (მაგ. ლაქტოზას) და ინდიკატორს (ქლორიდტრიფენილ ტეტრაზოლს, ეოზინ-მეთილენის ლურჯს, მაკ-კონკის ინდიკატორს და სხვა), რომელიც იცვლის ფერს გარემოს მჟავიანობის მაჩვენებლიდან გამომდინარე.

ლაქტოზიან და ტრიფენიტეტრაზოლიან საკვებ არეზე ***E. Coli*** უჯრედები ითვისებს ლაქტოზას, გამოყოფს მჟავებს და ამცირებს არის Ph. Ph დაბალი მაჩვენებლის პირობებში ტრიფენილტეტრაზოლის აღდგენა არ ხდება და კოლონიებს აქვთ ნეიტრალური ან თეთრი ფერი. კოლონიები, რომელთა უჯრედებსაც არ შესწევთ უნარი ლაქტოზის ათვისებისა ღია წითელი შეფერილობისაა. მაკ-კონკის ინდიკატორიან საკვებ არეზე კი პირიქით, ლაქტოზის ათვისების უნარის მქონე უჯრედები იღებება მუქ წითლად, ხოლო კოლონიები, რომლებიც ვერ აითვისებენ მოცემულ ნახშირწყალს რჩება თეთრი.

ინდიკატორული საკვები არეების გამოყენების აუცილებელი პირობაა კულტურის ოპტიმალური განზავების შერჩევა, პეტრის ჯამზე კოლონიების რაოდენობა არ უნდა აღემატებოდეს 100.

ქრომოგენული სუბსტრატიან საკვები არეებში არის სპეციალური სუბსტრატი, რომელიც იშლება საღებავის წარმოქმნით, ამის მიზეზი არის გარკვეული ფერმენტების მიერ წარმოებული ჰიდროლიზის პროცესი, მათი არსებობა აუცილებლად უნდა გადამოწმდეს. ასეთი სუბსტრატები ან პირდაპირ შეაქვთ საკვებ არეში ან მასზე საკვლევი კულტურის გაზრდის შემდეგ შეასხურებენ. ქრომოგენული სუბსტრატის სახით ხშირად გამოიყენება X-gal (5-ბრომ-4-ქლორ-3-ინდოლ-β-D-გალაქტოზიდი) რომლის საშუალებითაც შესაძლებელია β-გალაქტოზიდაზის აღმოჩენა, რომელიც მონაწილეობს ლაქტოზის უტილიზაციაში. ამ ფერმენტის სინთეზის უნარის მქონე უჯრედები შლიან X-gal 5-ბრომ-4-ქლორინდიგოს წარმოქმნით, რომელიც ღებავს უჯრედებს ცისფრად.

ანაბეჭდის მეთოდი პეტრის ჯამებზე ჩამოასხამენ სრულფასოვან არასელექტიურ საკვებ არეს და დათესავენ მუტაგენიზირებულ კულტურას, რის შედეგადაც ღებულობენ საწყის მატრიცულ ჯამს. კოლონიების წარმოქმნის შემდეგ, ზედაპირს ეხებიან სტერილური ბარხატის ნაჭრით (ან ფილტრის ქარალდით), რომელიც დაჭიმულია სპეციალურ შაბლონზე, ასეთი ზედაპირით, რომელზეც გადასულია კოლონიების ანაბეჭდი ეხებიან სტერილური სელექტიური საკვები არის ზედაპირს და შემდეგ პეტრის ჯამებს დგამენ თერმოსტატში ინკუბაციისათვის შესაბამის ტემპერატურაზე, ასეთი სახით შეიძლება მომზადდეს დაახლოებით 10 ანაბეჭდი (რეპლიკი). კოლონიებს, რომლებიც არ იზრდება არასელექტიურ საკვებ არეებზე, მაგრამ განვითარდა სელექტიურზე ამოწმებენ მუტაციების არსებობაზე.

მუტანტური უჯრედების პენიცილინით გამდიდრების მეთოდი

მუტაციის სიხშირე, მიუხედავად იმისა თუ რა სიმძლავრის მუტაგენია გამოყენებული ძალიან დაბალია, ამიტომ პოპულაციაში მუტანტური უჯრედების შეხვედრის სიხშირის გასაზრდელად იყენებენ გამდიდრების მეთოდს, ახდენენ რა არამუტანტური უჯრედების მნიშვნელოვანი ნაწილის ელიმინირებას. ბაქტერიებთან მუშაობისას იყენებენ პენიცილინით გამდიდრების მეთოდს. პენიცილინი თრგუნავს უჯრედის კედლის (მურეინის) სინთეზს და იწვევს აქტიურად ზრდადი უჯრედების დაღუპვას. თუ კულტურას, რომელიც შეიცავს მუტანტურ და არამუტანტურ უჯრედებს გავზრდით მინიმალურ საკვებ არეზე, მასზე განვითარდება მხოლოდ არამუტანტური უჯრედები. ასეთ საკვებ არეში პენიცილინის შეტანისას ხდება მხოლოდ არამუტანტური უჯრედების დაღუპვა და პოპულაცია მდიდრდება მუტანტებით. ოპტიმალურ პირობებში მუტანტებით პოპულაციის გამდიდრება შესაძლებელია ×1000.

პენიცილინური გამდიდრების მეთოდის გამოყენებისას აუცილებელია რიგი წესების დაცვა:

1. კულტურა ან უჯრედების სუსპენზია, რომელიც მუშავდება პენიცილინით უნდა შეიცავდეს უჯრედების 10^7 უჯრედი/მლ რაოდენობას. უფრო მაღალი კონცენტრაციების შემთხვევაში უჯრედების ლიზისის პროდუქტები შეასრულებს ზრდის ფაქტორების როლს მუტანტური უჯრედებისათვის, ისინი დაიწყებენ ამ საკვებ არეზე განვითარებას და პენიცილინის ზემოქმედების ქვეშ დაიღუპებიან.

2. პენიცილინით დამუშავებისას ბაქტერიების ინკუბაცია უნდა მოხდეს მინიმალურ საკვებ არეზე იმ პერიოდის განმავლობაში, რაც აუცილებელია 3-4 დაყოფისათვის. ამ დროს ხდება მუტანტური უჯრედების ენდოგენური მეტაბოლიტებით გაღარიბება, რაც იცავს მათ პენიცილინის ზემოქმედებისაგან.

გენეტიკური ინფორმაციის გადატანა ბაქტერიებში.

ბაქტერიებში გენეტიკური ინფორმაციის გადატანის სამი გზა არსებობს: ტრანსფორმაცია, კონიუგაცია და ტრანსდუქცია, რომლებიც ფართოდ გამოიყენება გენეტიკურ ექსპერიმენტებში.

ტრანსფორმაცია-ეგზოგენური დნმ შეაღწევს რეციპიენტ უჯრედში და იწვევს მასში გენეტიკურ ცვლილებებს. ამ დროს დნმ შეიძლება წარმოადგენდეს მთლიან გენომს ან მხოლოდ მის ნაწილს.

ფაგის მთლიანი გენომის უჯრედში გადატანას, რომელიც იწვევს მასში ზრდასრული ფაგური ნაწილაკების წარმოქმნას ეწ. ტრანსფექცია. დნმ ბაქტერიალურ უჯრედში გადატანის ხერხის მიხედვით ეს პროცესი არის ტრანსფორმაცია, მაგრამ ამ უკანასკნელისაგან განსხვავებით ტრანსფექციის პროცესში ხდება უჯრედის ლიზისი და არა მემკვიდრეობითი ცვლილება.

კონიუგაცია-გენეტიკური ინფორმაციის გადატანა დონორიდან რეციპიენტზე მათი უშუალო კონტაქტის დროს.

ტრანსდუქცია-გენეტიკური ინფორმაციის გადატანა დონორიდან რეციპიენტზე ფაგის საშუალებით.

ამ სამი პროცესის საერთო თავისებურებაა მათი ერთმიმართულებიანობა ანუ ყველა შემთხვევაში ერთი უჯრედი ასრულებს დნმ დონორის როლს, ხოლო მეორე რეციპიენტის. რეციპროკნული (ურთიერთგაცვლა) გაცვლა გენეტიკური ინფორმაციისა ბაქტერიებში არ ხდება.

გენეტიკურ ექსპერიმენტებში ძირითადად იყენებენ მეთოდებს, რომლებიც ეყრდნობა ტრანსფორმაციასა და კონიუგაციას.

ტრანსფორმაცია.

ტრანსფორმაციის განხორციელება შესაძლებელია როგორც ქრომოსომული ასევე პლაზმიდური დნმ-ით. რეციპიენტულ უჯრედს, რომელშიც ხდება დონორის გენეტიკური მასალის ექსპრესია ეწ. ტრანსფორმანტი. უჯრედის ტრანსფორმაციის აუცილებელი პირობაა მასში კომპეტენტურობის არსებობა, რომლის მიხედვითაც მიკროორგანიზმები იყოფა სამ კატეგორიად:

1. მიკროორგანიზმები, რომლებშიც კომპეტენტურობა ვლინდება მხოლოდ განვითარების გარკვეულ ფაზაში (სტრეპტოკოკები, ბაცილები).

2. მიკროორგანიზმები, რომელთა უჯრედები კომპეტენტურია ზრდის ნებისმიერ ფაზაში (გონოკოკები, მენინგოკოკები).

3. მიკროორგანიზმები რომელთაც ბუნებრივი კომპეტენცია არ გააჩნია. ისინი ამ თვისებას მხოლოდ გარკვეული დამუშავების შემდეგ იძენენ (***E. Coli*** კომპეტენტური ხდება დაბალ ტემპერატურაზე კალციუმის ქლორიდით დამუშავებისას).

ტრანსფორმაციული უჯრედების დათესვა სელექტიურ საკვებ არეებზე წარმოებს მხოლოდ მას შემდეგ, რაც ისინი გარკვეულ პერიოდს მდიდარ საკვებ არეზე გაატარებენ, სწორედ ინკუბაციის ამ პერიოდში ხდება უჯრედებში ახალი მარკერების (გენები) ექსპრესია და ისინი იძენენ ახალ ფენოტიპს.

ტრანსფორმაციის ეფექტურობის გასაზრდელად აუცილებელია უჯრედების პროტოპლასტების მიღება.

ბუნებრივი კომპეტენტურობის მქონე მიკროორგანიზმებში ტრანსფორმაციის ჩატარებისას გასათვალისწინებელია ამ მდგომარეობაზე მოქმედი ფაქტორების- ტემპერატურა, საკვები არის შედგენილობა, Ph, ორვალენტიანი კათიონების კონცენტრაციის გათვალისწინება.

ძალიან პოპულარულია ტრანსფორმაციის მიღების ელექტროპორაციული მეთოდი. ელექტროპორაცია-უჯრედში დნმ შეყვანა სპეციალური ელექტრონული იმპულსებით.

სხვადასხვა მიკროორგანიზმებისათვის ტრანსფორმაციისა და კომპეტენტური უჯრედების მიღების სხვადასხვა მეთოდი არსებობს.

მაგალითის სახით მოცემულ გამოცემაში მოყვანილი იქნება ***E. Coli C600*** შტამის კომპეტენტური უჯრედების მიღებისა და პლაზმიდური დნმ მისი ტრანსფორმაციის მაღალეფექტური მეთოდი.

E. coli* უჯრედებიდან პლაზმუდური დნმ გამოყოფა** ***E. Coli უჯრედებს (12სთ) 1.5-5 მლ აცენტრიფუგირებენ ეპენდორფის სინჯარებით 11ათასი ბრ/წთ 3წთ განამვლობაში. სუპერნატანტს გადაღვრიან, ხოლო ნალექის რესუსპენდირებას ახდენენ 350მკლ STET-ბუფერში (8%საქაროზა, 5% ტრიტონ X-100, 50 EDTA-Na_2, 50 MM Tris –HCl, Ph-8.0) ლიზისისათვის, უმატებენ 25 მკლ ლიზოციმის ხსნარს (10მგ/მლ დისტილირებული წყალი), ურევენ და აინკუბირებენ ოთახის ტემპერატურაზე 5 წთ. შემდეგ სინჯარებს გადაიტანენ მდუღარე წყლის აბაზანაზე და აინკუბირებენ 40წმ, მიღებულ ლიზატებს აცენტრიფუგირებენ 11 ათასი ბრ/წთ 30 წთ და მიღებულ ნალექს (ლიზირებული უჯრედები, დენატურირებული ცილები, დენატურირებული ქრომოსომული დნმ) აცილებენ სუფთა ასანთის ღერით ან სუპერნატანტი გადააქვთ სუფთა სინჯარაში. რომელშიც შეაქვთ 174 მკლ 7.5 ამონიუმის აცეტატის ხსნარი და 300 მკლ იზოპროპილის სპირტი. ურევენ და აინკუბირებენ -20 ^{O}C 15 წთ. ამ

პირობებში ხდება დნმ პრეციპიტაცია, მაშინ როცა არადენატურირებული ცილები რჩება ხსნარში. პრეციპიტატს აცენტრიფუგირებენ 11 ათასი ბრ/წთ 15 წთ. ნალექს ორჯერ რეცხავენ 1.5მლ 70% ეთანოლით, რომელიც ასევე გაცივებულია -20°C. (ეთანოლის დამატებისას ნალექის მორევა არ შეიძლება).

მიღებულ მოთეთრო ნალექს აშრობენ ჰაერის ჭავლით და ხსნიან 50მკლ TE –ბუფერში (10 MM Tris-HCl, 1MM EDTA-Na2, Ph-7.5). აუცილებლობის შემთხვევაში დნმ ხსნარი ინახება -20 ^{O}C.

E. coli* კომპეტენტური უჯრედების მიღება *E. Coli C600 შტამის ღამის კულტურას, რომელიც იზრდებოდა აერაციის გარეშე, 20 ჯერადად აზავებენ LB საკვებ არეში (იხ.დანართი) და აინკუბირებენ სანჯღრეველაზე 37 ^{O}C 90-100 წთ. უჯრედებს ლექავენ ცივი ცენტრიფუგირებით და ნალექს ასუსპენდირებენ 1/2მოცულობის 10Mm კალციუმის ქლორიდის ხსნარში 4°C, ლექავენ ცენტრიფუგირებით და ასუსპენდირებენ 1/20 (საწყისი მოცულობიდან) 100MM კალციუმის ქლორიდის ხსნარში 4°C.

ასეთი სახით მომზადებული E. Coli უჯრედები ინარჩუნებს ყინულში კომპეტენციას 24 საათის განმავლობაში. უ ჯრედები კომპეტენტურობას კარგავს ტემპერატურის უმნიშვნელო ცვლილების დროსაც კი. კომპეტენტური უჯრედების ხანგრძლივი შენახვისათვის ამატებენ გლიცერინს 15% საბოლოო კონცენტრაციამდე. ანაწილებენ ალიკვოტებს 0.2-0.2მლ და ინახავენ -80 ^{O}C.

***E. coli* კომპეტენტური უჯრედების ტრანსფორმაცია** E. Coli კომპეტენტური უჯრედების 0.2მლ უმატებენ 1-10მკლ პლაზმიდურ დნმ (1-100ნგ) და უჯრედებს აინკუბირებენ ყინულში 30-45წთ. შემდეგ უჯრედებს უქვემდებარებენ სითბურ შოკს 42°C 5-10 წთ მათი მოთავსებით. ამატებენ 0.5მლ LB საკვებ არეს და აინკუბირებენ აერაციის პირობებში 37°C 2სთ. ინკუბაციის დასრულების შემდეგ 0.1მლ კულტურას გადათესავენ სელექტიურ საკვებ არეზე და კვლავ აინკუბირებენ 16-24სთ.

ონიუგაცია.

კონიუგაციის პროცესი ბაქტერიალურ უჯრედში განპირობებულია კონიუგაციური პლაზმიდების არსებობით. რომლებიც შეიცავენ tra-გენებს. ეს გენები აკოდერებს სასქესო პილების წარმოქმნას, რის ხარჯზეც ხდება შეჯვარებადი (კონიუგაციური) წყვილების ფორმირება, რაც თავის მხრივ უზრუნველყოფს პლაზმიდური ან ქრომოსომული დნმ კონიუგაციურ გადატანას რეციპიენტ უჯრედში. თუ პლაზმიდა არ ხასიათდება კონიუგაციური გადატანით მას არაკონიუგაციურს უწოდებენ. კონიუგაციური პლაზმიდა, რომელიც უზრუნველყოფს ***E. Coli K12*** კონიუგაციას და რომელიც პირველად იქნა აღწერილი, არის სასქესო ფაქტორი **F (fertiliti)**. ფაქტორი **F** არსებობს დამოუკიდებლად და მაღალი ეფექტურობით გადაეცემა დონორიდან რეციპიენტს. სასქესო ფაქტორის ***E. Coli*** უჯრედში ინტეგრაციის შემდეგ მიიღება

Hfr შტამი **(High frequency of recombination**), რომელსაც შეუძლია რეკომბინანტული დნმ გადატანა რეციპიენტ უჯრედში. რეციპიენტ უჯრედებს, რომლებშიც მიმდინარეობს დონორის გენეტიკური მასალის ექსპრესია ეწ. ტრანსკონიუგანტები.

კონიუგაციაზე ექსპერიმენტების ჩატარებისას აუცილებელია შემდეგი ფაქტორების გათვალისწინება:

1. კონიუგაციური პლაზმიდის და დონორის ქრომოსომის გადატანა Hfr შტამების შემთხვევაში იწყება პლაზმიდის განსაზღვრული წერტილიდან-**oriT**.

2. დონორის ქრომოსომის გადატანა ხდება ორიენტირებულად ანუ გენები გადაიტანება იმ თანმიმდევრობით რომლითაც ისინი განლაგებული არიან ქრომოსომაზე. გადატანის საწყისი წერტილი დაკავშირებულია კონიუგაციური პლაზმიდის დონორული შტამის ქრომოსომაში ინტეგრაციის ადგილთან და მის ორიენტაციასთან.

3. ქრომოსომული მარკერების გადატანის სიჩქარე დამოკიდებულია ტემპერატურაზე, მაგრამ სტანდარტულ პირობებში შეჯვარება არის მუდმივი სიდიდე. დონორის ყოველი გენეტიკური დეტერმინანტი ხვდება რეციპიენტ უჯრედში შეჯვარების დაწყებიდან გარკვეული პერიოდის შემდეგ.

4. გადატანა არის ნაწილობრივი. ქრომოსომის გადატანისას ხდება მისი სპონტანური გაწყვეტა. ამიტომ წარმოქმნილი ზიგოტები შეიცავს დონორის გენომის მხოლოდ ნაწილს და არის არასრული (მეროზიგოტა).

კონიუგაციის გამოყენებას ეყრდნობა ბაქტერიების გენეტიკური ანალიზის სამი მეთოდი;

1. გენეტიკურ მარკერებს შორის რეკომბინაციის სიხშირეების დადგენა.

2. ქრომოსომაზე გენების თანმიმდევრობის დადგენა მათი გადატანის გრადიენტის მიხედვით.

3. გენების ლოკალიზება მათი რეციპიენტ უჯრედში შეღწევის დროის მიხედვით-კარტირება კონიუგაციის შეწყვეტის მეთოდით.

არაკონიუგაციური პლაზმიდების მობილიზაცია.

ზოგიერთი არაკონიუგაციური პლაზმიდისათვის დამახასიათებელია რეციპიენტ უჯრედში გადასვლა სხვა კონიუგაციური პლაზმიდის თანაობისას, ამ მოვლენამ მიიღო არაკონიუგაციური პლაზმიდების მობილიზაციის სახელწოდება. ამ პროცესის ორი მექანიზმი არსებობს:

1. არაკონიუგაციური პლაზმიდების გადატანა ხორციელდება კონიუგაციური პლაზმიდების Tra-გენების პროდუქტების ხარჯზე.

2. არაკონიუგაციური პლაზმიდების გადატანა რეციპიენტში ხორციელდება კონიუგაციური პლაზმიდების კოინტეგრატების შემადგენლობაში.

კოინტეგრატი არის დნმ მოლეკულა, რომელიც წარმოიქმნება ან რეციპროკნული რეკომბინაციის ხარჯზე ან IS –ელემენტებისა და ტრანსპოზონების ტრანსპოზიციის გზით. სასქესო ფაქტორის ქრომოსომაში

ინტეგრაცია, რომელსაც მივყავართ Hfr-შტამების წარმოქმნამდე, ასევე განიხილება, როგორც მაგალითი კოინტეგრატების წარმოქმნისა.

არაკონიუგაციური პლაზმიდების მობილიზაციისათვის ასევე შეიძლება გამოვიყენოთ შეჯვარების მეთოდი, როცა მობილიზირებული და მობილიზირებადი პლაზმიდები მდებარეობს სხვადასხვა დონორულ შტამში.

შეჯვარება - არსებობს კონიუგაციის გზით ბაქტერიალური შტამების შეჯვარების სხვადასხვა მეთოდები: თხევად საკვებ არეში, აგარის ზედაპირზე ან მემბრანულ ფილტრებზე. მეთოდის შერჩევა დამოკიდებულია ექსპერიმენტის მიზანზე. ყველაზე მარტივია შეჯვარება თხევად საკვებ არეში. ამ პირობებში ადვილად მიმდინარეობს შეჯვარება, რომელიც განპირობებულია F ფაქტორითა და მისი მონათესავე პლაზმიდებით. მაგრამ მეთოდის უარყოფითი მხარე გახლავთ ის, რომ მრავალი პლაზმიდის მიერ ხორციელდება მოკლე პილების წარმოქმნა, რაც თხევად საკვებ არეში არ უზრუნველყოფს უჯრედების მჭიდრო კონტაქტს, ამიტომ ამ პრობლემის აღმოსაფხვრელად იყენებენ შეჯვარების მეთოდს აგარიზებულ ზედაპირზე ან მემბრანულ ფილტრებზე, ეს უკანასკნელი მოხერხებულია, თუ საჭიროა ერთდროულად რამოდენიმე შეჯვარების ჩატარება. შეჯვარებისათვის იყენებენ მემბრანულ ფილტრებს დიამეტრით-0.45-0.22მკმ.

მაგალითისათვის მოცემულ სახელმძღვანელოში მოყვანილია კონიუგაციური პლაზმიდის RP1 მიერ არაკონიუგაციური პლაზმიდის RSF 1010 მობილიზაცია.

მშობლიური უჯრედები, რომლებიც გამოიყენება შეჯვარებისას უნდა განსხვავდებოდეს ერთმანეთისაგან გენეტიკური მარკერებით. მაგ. აუქსოტროფულობისა და ანტიბიოტიკების მიმართ მდგრადობის გენეტიკური მარკერებით. ***E.coli*** შემთხვევაში ეს შეიძლება იყოს შტამები ***C600*** (***thr leu thi***) და ***J53 (pro met). C600*** ერთი შტამი შეიცავს კონიუგაციურ პლაზმიდას RP1 (რომელიც აკოდირებს მდგრადობას ამპიცილინის, კანამიცინის, ტეტრაციკლინის მიმართ), ხოლო მეორე შტამი **C600** შეიცავს არაკონიუგაციურ პლაზმიდას **RSF1010**(აკოდირებს მდგრადობას სულფანილამიდებისა და სტრეპტომიცინის მიმართ), რომელიც უნდა გადაეცეს შტამს **J53.**

შეჯვარებისათვის იყენებენ ახალგაზრდა, აქტიურად ზრდად უჯრედებს, ამასთანავე რეციპიენტი უჯრედების კონცენტრაცია უნდა აღემატებოდეს (10ჯერ) დონორის კონცენტრაციას. ამ მიზნით სამივე შტამის ღამის კულტურებს (ზრდიან აერაციის გარეშე) აზავებენ 5 ჯერადად LB თბილ საკვებ არეში და აინკუბირებენ 90-100წთ. ამის შემდეგ ეპენდორფის სინჯარებში ათავსებენ 20მკლ დონორი შტამის (შტამები რომლებიც შეიცავენ RP1 და RSF1010 პლაზმიდებს) სუსპენზიას და 0.1მლ რეციპიენტი შტამის კულტურას, ურევენ, ამ ნაზავს გადაიტანენ LB-აგარის ზედაპირზე და გადაანაწილებენ შპატელით, პეტრის ჯამს აინკუბირებენ 37 ^{O}C 3 სთ. შეჯვარების დასრულების შემდეგ აგარის ზედაპირიდან უჯრედებს ჩამორეცხავენ 2 მლ ფიზიოლოგიური

ხსნარით (შპადელის დახმარებით) და აზავებენ ფიზიოლოგიური ხსნარით 10^{-5} განზავებამდე. შემდეგ 10^{-3}-10^{-5} განზავების სინჯებს თესავენ 0.1 მლ სელექტიურ საკვებ არეებზე. ერთი პეტრის ჯამი უნდა შეიცავდეს ერთ-ერთ ანტიბიოტიკს კანამიცინი 50მკგ/მლ, ტეტრაციკლინი – 20მკგ/მლ, ამპიცილინი – 100მკგ/მლ, რათა მოხდეს ტრანსკონიუგატების გადარჩევა, რომლებმაც მიიღეს პლაზმიდა RP1, მეორე პეტრის ჯამი უნდა შეიცავდეს სტრეპტომიცინს 50მკგ/მლ იმ ტრანსკონიუგატების გადასარჩევად, რომლებმაც მიიღეს პლაზმიდა RSF 1010. სელექტიური საკვები არის საფუძველი არის მინიმალური საკვები A (პროლინისა და მეთიონინის დანამატით), რომელზეც იზრდება მხოლოდ შტამი **J53**. კონტროლის სახით სელექტიურ საკვებ არეზე თესავენ მშობლიური შტამის უჯრედებს, იმისათვის რომ დავრწმუნდეთ რომ მათ არ შესწევთ უნარი მოცემულ საკვებ არეზე განვითარებისა. პეტრის ჯამებს ათავსებენ თერმოსტატში $37^{O}C$ 48 სთ. ინკუბაციის დასრულების შემდეგ აწარმოებენ ტრანსკონიუგატების გადათვლას. არაკონიუგაციური პლაზმიდის RSF1010 მობილიზაციის სიხშირეს განსაზღვრას არაკონიუგაციური პლაზმიდის მიმღები ტრანსკონიუგატებისა და კონიუგაციური პლაზმიდის მარკერის მიმღები ტრანსკონიუგატების თანაფარდობა.

თავი 18. მიკროორგანიზმების სისტემატიკა და იდენტიფიკაცია

სახელწოდებების შერჩევის ძირითადი პრინციპები; აღწერა და იდენტიფიკაცია; კულტულარული თვისებები; მორფოლოგიური მახასიათებლები; ფიზიოლოგო-ბიოქიმიური თვისებები; უჯრედის შემადგენლობის განსაზღვრა; გენის სისტემატიკა.

სახელწოდებების შერჩევის ძირითადი პრინციპები. აღწერილია მიკროორგანიზმების რამოდენიმე ათასი სახეობა, თუმცა ითვლება რომ ეს არის რეალურად ბუნებაში არსებული მიკროორგანიზმების მხოლოდ 5%. მიკროორგანიზმების მრავალფეროვნების შესწავლა სისტემატიკის საგანს

წარმოადგენს. ის აერთიანებს ისეთ განყოფილებებს, როგორიცაა კლასიფიკაცია, ნომენკლატურა და იდენტიფიკაცია. კლასიფიკაცია განსაზღვრავს გარკვეული ნიშან-თვისებებით მსგავსი ინდივიდუმების გაერთიენებას ჯგუფებად ანუ ტაქსონებად. ნომეკლატურა წარმოადგენს სახელწოდებების შერჩევის წესების ერთობლიობას. იდენტიფიკაცია-არის ამა თუ იმ ორგანიზმის გარკვეული ტაქსონისათვის მიკუთვნების განსაზღვრა.

მიკრობიოლოგიასა და სხვა ბიოლოგიურ მიმართულებებში ძირითად ტაქსონომიურ ერთეულად მიჩნეულია სახეობა. სახეობა- გენეტიკური, ფიზიოლოგო-ბიოქიმური და მორფოლოგიური ნიშან-თვისებებით მსგავსი ინდივიდების ერთობლიობა.

შტამი-მიკროორგანიზმების სუფთა კულტურა გამოყოფილი გარკვეული საარსებო გარემოდან (წყალი, ნიადაგი, ცხოველის ორგანიზმი). ერთი და იმავე სახეობის სხვადასხვა შტამი განსხვავდება ეთმანეთისაგან გარკვეული ნიშან-თვისებებით-ანტიბიოტიკებისადმი მდგრადობით, მეტაბოლური პროდუქტების სინთეზის გზებით და სხვა. მაგრამ ეს განსხვავებები მცირეა ვიდრე სხვაობა სახოების დონეზე. მიკრობიოლოგიური სახეობები ერთიანდება უფრო მაღალი კატეგორიის სისტემატიკურ ერთეულებში-გვარი, ოჯახი, რიგი, კლასი, განყოფილება, სამეფო. ამ კატეგორიებს ეწოდება აუცილებელი, არის ასევე არააუცილებელი კატეგორიები: ქვეკლასი, ქვეოჯახი, ქვერიგი, ქვესახეობა და ა. შ.

მიკროორგანიზმების ნომენკლატურა ექვემდებარება საერთაშორისო წესებს. გამოიყენება ბინალური და ბინომინალური ნომენკლატურის სისტემა. თითოეულ სახეობას აქვს ორი ლათინური სიტყვისაგან შემდგარი სახელწოდება. პირველი აღნიშნავს გვარს (იწერება დიდი ასოთი), მეორე კი კონკრეტულად სახეობას (იწერება პატარა ასოთი). ქვესახეობის აღნიშვნისას გამოიყენება სიტყვათწყობა, რომელიც მოიცავს გვარის, სახოებისა და ქვესახეობის ეპითეტებს და მათ გამოსაყოფად ასევე გამოიყენება ასოთა წყობა “SS” რაც “subspecies” აბრივიატურას წარმოადგენს. მაგ. ***Lactobacilus delbrueckii ss. Bulgaricus***. შტამის აღწერისას მიუთითებენ კოლექციის დასახელებას, მაგ. ***Clostridium butirycum ATCC 19398***, რაც ნიშნავს, რომ შტამი ინახება ამერიკულ კოლექციაში (***American Type Culture Collection ATCC***) ნომრით 19398. მიკროორგანიზმების სისტემატიკის შესახებ ინფორმაციის ყველაზე ცნობილი და სრულყოფილი წყარო არის ბერგის განმსაზღრელი (***Bergey’s manual of Sistematic Bacteriology)***.

გარდა შტამისა მიკრობიოლოგიაში გამოიყენება ასევე ტერმინები ვარიანტი, ტიპი, ფორმა. ისინი ძირითადად გამოიყენება იმ მიკროორგანიზმების შტამების აღსანიშნავად, რომლებიც გარკვეული ნიშან-თვისებებით განსხვავდება ტიპიური შტამისაგან. შტამს, რომელიც ტიპიურისაგან განსხვავდება მორფოლოგიური ნიშან-თვისებებით ეწ. მორფოვარი (მორფოტიპი), ფიზიოლოგიური-ბიოქიმიური ნისან-თვისებებით - ბიოვარი, (ბიოტიპი,

ფიზიოლოგიური ტიპი), სხვადასხვა ქიმიური ნაერთების სინთეზით - ქემოვარი (ქემოტიპი, ქემოფორმა), კულტივირების პირობებით - კულტივარი, ბაქტერიოფაგის შეყვანაზე საპასუხო რეაქციით - ფაგოვარი (ფაგოტიპი, ლიზოტიპი), ანტიგენური მახასიათებლებით - სეროვარი (სეროტიპი) და ა. შ.

მიკროორგანიზმების გენეტიკაში ძალიან ხშირად იყენებენ ტერმინს კლონი - გენეტიკურად მონათესავე უჯრედების პოპულაცია, მიღებული უსქესო გზით მშობლიური უჯრედებიდან. მოლეკულურ ბიოლოგიაში კლონი ეწოდება დნმ თანმიმდევრობების იდენტურ ასლებს, რომლებიც მიიღება მათი ჩადგმით კლონირებად ვექტორებში (მაგ. პლაზმიდებში). გენეტიკურად მოდიფიცირებული ანუ რეკომბინანტულია შტამი, რომელიც მიიღება გენურ-ინჟინერული მანიპულაციებით. ხშირად ახალ შტამებს ღებულობენ მუტაგენების გამოყენებით.

იდენტიფიკაციის მიზანია საკვლევი შტამის (ბუნებრივი წყაროდან გამოყოფილი) ტაქსონომიური მდგომარეობის განსაზღვრა მისი თავისებურებების შედარებით სხვა (ოფიციალურად დარეგისტრირებული) ცნობილი სახეობის თავისებურებებთან. ამიტომ იდენტიფიკაციის შედეგი როგორც წესი არის ახალი შტამის გაიგივება ან მისი მიკუთვნება უკვე ცნობილ სახეობებთან. თუ დამთხვევა არ არის მაშინ საუბრობენ ახალი ტაქსონის აღმოჩენაზე, ახლად აღმოჩენილი ტაქსონის დასარეგისტრირებლად აუცილებელია მათი აღწერა: შტამების ნუსხა, რომელიც შედის ტაქსონში, თითოეული შტამის დახასიათება, ნიშან-თვისებების ნუსხა, რომელიც განიხილება, როგორც ტაქსონისათვის მნიშვნელოვანი, ნიშან-თვისებების ნუსხა, რომელიც უზრუნველყოფს ტაქსონის გაერთიანებს უფრო მაღალ სისტემატიკურ ერთეულში, დიაგნოსტიუკური ნიშან-თვისებები, რომლითაც მოცემული ტაქსონი განსხვავდება მისი მონათესავე ფორმებისაგან, ტიპიური შტამის აღწერილობა და სურათი. მონაცემები ოფიციალურად ქვეყნდება საერთაშორისო ჟურნალში მაგ. ***Internationa Journal of sistematyc of Bacteriology***, და კულტურა გადაეცემა შესანახად მსოფლიოს ერთ-ერთ კოლექციას.

აღწერა და იდენტიფიკაცია.

სხვადასხვა ეუკარიოტებისა და პროკარიოტების იდენტიფიკაციის პრინციპები განსხვავებულია. სოკოების კლასამდე, რიგამდე, ოჯახამდე იდენტიფიკაციისათვის მნიშვნელოვანია სასქესო სტრუქტურების წარმოქმნის გზები და მათი აგებულების თავისებურებები, ასევე გამოიყენება სპორამატარებლებისა და მიცელიუმის მახასიათებლები, კულტურალური და ფიზიოლოგიური თავისებურებები. სახეობის იდენტიფიკაციისათვის მნიშვნელოვანია მორფოლოგიური ნიშნები, მიღებული ელექტრონული მიკროსკოპული კვლევით, ასევე ფიზიოლოგიური და კულატურალური ნიშან-თვისებები. ერთიანი განმსაზღვრელი ყველა სოკოს იდენტიფიკაციისათვის არ

არსებობს, ამიტომ ჯერ საზღვრავენ საიდენტიფიკაციო სოკოს რიგს და კლასს, შემდეგ კი იყენებენ შესაბამის განმსაზღვრელს.

საფუვრების იდენტიფიკაცია ეყრდნობა კულტურალურ, ციტოლოგიურ, მორფო-ბიოქიმიურ თვისებებს, ეკოლოგიასთან დაკავშირებულ სპეციფიურ ნიშნებს, გამოიყენება შესაბამისი განსმაზღვრელები.

მიკროსკოპული ფორმის წყალმცენარეების სისტემატიკის საფუძველი არის უჯრედის აგებულება და პიგმენტების შემადგენლობა. უმარტივესების სისტემატიკური მდგომრეობის განსაზღვრა ხორციელდება მორფოლოგიური ნიშნებისა და სასიცოცხლო ციკლის განსაზღვრით. ამრიგად, ეუკარიოტების კლასიფიკაცია ეყრდნობა მათი მორფოლოგიის და განვითარების ციკლის შესწავლას.

პროკარიოტების იდენტიფიკაცია, რომლებიც მორფოლოგიურად ნაკლებად მრავალფეროვანია, ვიდრე ეუკარიოტები, ეყრდნობა ფენოტიპური და გენოტიპური ნიშან-თვისებების ფართო სპექტრს. ის უფრო მეტად ეყრდნობა ფუნქციონალურ თავისებურებებს, რადგან ბაქტერიების უმრავლესობის იდენტიფიკაცია შესაძლებელია იმ პროცესების კვლევით, რომელთა განხოციელების უნარიც მათ გააჩნიათ.

ბაქტერიების იდენტიფიკაციისას შეისწავლიან მათ კულტურალურ თვისებებს, მორფოლოგიას, უჯრედის ორგანიზაციას, ფიზიოლოგო-ბიოქიმიურ ნიშნებს, უჯრედების ქიმიურ შედგენილობას, გუანინ-ციტოზინის შემცველობას დნმ. ამ დროს აუცილებელია სუფთა კუტლტურებთან მუშაობა და კვლევის სტანდარტული მეთოდების გამოყენება.

კულტურალური თვისებები თხევად და მყარ საკვებ არეებზე მიკროორგანიზმების ზრდის თავისებურებები. ძირითადად მათ იყენებენ მხოლოდ ორგანიზმების დასახასიათებლად, იდენტიფიკაციისათვის ისინი იშვიათად გამოიყენება.

მორფოლოგიური მახასიათებლები (იხ. თავი–-) - ბაქტერიების ფორმა, ზომა, მოძრაობის ორგანოები, სპორაწარმოქმნის ფორმები. სასარგებლოა ასევე უჯრედის სახასიათო მემბრანული სისტემისა და ორგანელების (ალოროსომა, კარბოქსისომა, ფიკობილისომა და ა. შ.), ასევე ჩანართების (ვოლურინი, პოლისაქარიდები და ა. შ.) კვლევა.

უმნიშვნელოვანესია გრამის წესით შეღებვა და უჯრედის კედლის აგებულება.

ფიზიოლოგო-ბიოქიმიური თვისებები ითვალისწინებს ბაქტერიების კვების (ფოტო/ქემო/აუტო/ჰეტეროტროფია), ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის (დუღილი, აერობული და ანაერობული სუნთქვა, ფოტოსინთეზი) ტიპის განსაზღვრას. მნიშვნელოვანია განისაზღვროს ისეთი თვისებები, როგორიცაა: ბაქტერიების დამოკიდებულება მოლეკულური ჟანგბადის, ტემპერატურის, Ph, მარილიანობის, განათების მიმართ, ასევე აზოტის, ფოსფორის, ნახშირბადის, გოგირდის წყაროს უტილიზაციის ტესტები (იხ. თავი----).

სიმბიოტური და პარაზიტული მიკროორგანიზმების იდენტიფიკაციისას აუცილებელია სიმბიონტის პატრონი უჯრედის მიმართ სპეციფიურობის განსაზღვრა, ასევე ანტიმიკრობული ნაერთების და ფაგების მიმართ მდგრადობის განსაზღვრა.

უჯრედის შემადგენლობის განსაზღვრას აქვს დიდი მნიშვნელობა ბაქტერიების ქემოტაქსონომიაში. მაგ. უჯრედის კედლის შედგენილობა არის ერთ-ერთი სისტემატიკური ნიშანი, კერძოდ მასში შემავალი უნიკალური ნაერთები: მურეინი (ან ფსევდომურეინი), ლიპოპოლისაქარიდი, მიკოლის და თეიხოის მჟავები. უჯრედის კედლის შემადგენლობა საზღვრავს ასევე ბაქტერიების სეროლოგიურ თვისებებს, რაც საფუძვლად უდევს მათი იდენტიფიკაციის იმუნოქიმიურ მეთოდებს.

ქემოტაქსონომიური მარკერის სახით ასევე იყენებენ უჯრედის ლიპიდებისა და ცხიმოვანი მჟავების შედგენილობას. მათ შემადგენლობაში განსხვავება გამოიყენება ბაქტერიების იდენტიფიკაციისათვის გვარისა და სახეობის დონეზე. თუმცა არის გარკვეული შეზღუდვები, რადგან ცხიმოვანი მჟავების შედგენილობა დამოკიდებულია კულტივირების პირობებზე და ბაქტერიის ასაკზე. ზოგიერთი ბაქტერიების სისტემატიკაში ითვალისწინებენ ქინონების და სხვა ელექტრონების გადამტანების, ასევე პიგმენტების შედგენილობას.

ბაქტერიების ნათესაური კავშირების დადგენა შესაძლებელია ცილების შესწავლით. მემბრანული, რიბოსომული და უჯრედული ცილების შესწავლამ საფუძველი ჩაუყარა ახალ მიმართულებას ცილოვან ტაქსონომიას. რიბოსომული ცილების სპექტრი არის ყველაზე სტაბილური და გამოიყენება ბაქტერიების იდენტიფიკაციისათვის ოჯახის ან რიგის დონეზე. მემბრანული ცილების სპექტრი ასახავს განსხვავებებს გვარის, სახეობის და შიდასახეობრივ დონეზე. თუმცა უჯრედის ქიმიური შედგენილობა არ გამოიყენება როგორც განყენებული ფორმა ტაქსონომიისა, ის ყოველთვის კომპლექსშია ფენოტიპურ კვლევასთან.

მიკროორგანიზმების იდენტიფიკაციისას ძალან ხშირად იყენებენ ე. წ. ნუმერულ ტაქსონომიას. მას საფუძვლად უდევს ფრანგი ბოტანიკოსის მ. დანსონის იდეა, რომლის თანახმადაც ფენოტიპური ნიშან-თვისებები, რომელთა აღრიცხვაც ხდება, შესაძლებელია ჩაითვალოს თანაბარფასეულად, რაც იძლევა საშუალებას რაოდენობრივად გამოისახოს ტაქსონომიური დისტანცია ორგანიზმებს შორის დადებითი ნიშან-თვისებების თანაფარდობის სახით შესწავლილი ნიშან-თვისებების საერთო რიცხვთან. შაკვლევს მიკროორგანიზმებს შორის მსგავსებას განსაზღვრავენ ფენოტიპური ნიშან-თვისებებით რომლებსაც შეარჩევენ ისე, რომ მათი ვარიანტები იყოს ალტერნატიული და აღინიშნოს “+” და “-“. მსგავსების ხარისხი დგინდება ნისან-თვისებათა დამთხვევის ხარისხით (S):

S=a+b/a+b+c+d;

სადაც a და d არის ნიშან-თვისებების რადენობა, რომლითაც შტამი A და B ერთმანეთს გავს (a-ორივე შტამი დადებითი თვისებებით; d-ორივე

უარყოფითი თვისებებით). b-თვისებების ჯამი რომლითაც შტამი A არის დადებითი, ხოლო B-უარყოფითი, c-თვისებების ჯამი რომლის მიხედვითაც შტამი A არის უარყოფითი, ხოლო B-დადებითი. მსგავსების კოეფიციენტის მნიშვნელობა შეიძლება შეიცვალოს 0-1. კოეფიციენტი -1 ნიშნავს სრულ იდენტურობას, ხოლო -0 სრულ არადიენტურობას. ნიშან-თვისებათა კომბინაციის შეფასება ხდება კომპიუტერის საშუალებით მიღებული შედეგები წარმოდგენილია მსგავსების მატრიცის ან დენდროგრამის სახით. ნუმერული ტაქსონომია შეიძლება გამოყენებული იყოს მხოლოდ დაბალი ტაქსონების შედარებისას (გვარი, სახეობა). ის არ იძლევა საშუალებას სახეობებს შორის გენეტიკური მსგავსების დადგენისა, თუმცა გარკვეულწილად ასახავს მათ ფილოგენეტიკურ თავისებურებებს. დადგენილია, რომ ფენოტიპური თვისებები რომელთა გასაზღვრაც თანამედროვე პერიოდში არის ხელსმისაწვდომი ასახავს გენოტიპის თავისებურებების 5-20%.

გენის სისტემატიკა

მიკროორგანიზმთა გენეტიკის შესწავლა შესაძლებელი გახდა მოლეკულური ბიოლოგიის განითარებასთან ერთად და საფუძველი ჩაუყარა გენოსისტემატიკის განვითარებას. ნმ მჟავების ანალიზზე დაყრდნობით გენოტიპის შესწავლა საშუალებას იძლევა მიკროორგანიზმების ფილოგენეტიკური სისტემის შედგენისა. ბაქტერიების ფილოგენეტიკურ ურთიერთობებს ადგენეს დნმ გც თანაფარდობის მიხედვით, დნმ-დნმ და დნმ-რრნმ დნმ-ზონდებით ჰიბრიდიზაციით და ასევე 5S, 16S და 23S რრნმ ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობის შესწავლით.

პროკარიოტების დნმ გც შემცველობა მერყეობს 25-75%. ბაქტერიის თითეულ სახეობას გააჩნია დნმ გც მხოლოდ მისთვის დამახასიათებელი პროცენტული შემცველობა. იმის გამო, რომ გენეტიკური კოდირება ეყრდნობა არა მარტო კოდირების ერთეულებში (ტრიპლეტებში) ნუკლეოტიდების შემადგენლობას, არამედ მათ ურთიერთგანლაგებასაც, ამიტომ ორი სახეობის ბაქტერიებში გც ერთნაირი შედგენილობას შეიძლება თან ახლდეს მნიშვნელოვანი გენეტიკური სხვაობები. თუ ორი ორგანიზმი ძალიან ახლოს არის დნმ ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობით ეს მიუთითებს მათ ევოლუციურ ნათესაობაზე მხოლოდ იმ პირობით რომ მათ გააჩნიათ ძალიან ბევრი საერთო ფენოტიპური ნიშან-თვისება და გენეტიკური მსგავსება დამტკიცებული სხვა მეთოდებით. ამასთანავე 10-15% სხვაობა დნმ ნუკლეოტიდების შედგენილობაში ფენოტიპურად მსგავს ორ შტამს შორის მიუთითებს რომ ისინი ეკუთვნის სხვადასხვა სახეობას.

დნმ-დნმ ჰიბრიდიზაციის მეთოდი უფრო მნიშვნელოვანია ბაქტერიების გენეტიკური ნათესაობის დასადგენად. სახეობის შიგნით შტამების გენეტიკური ჰომოლოგია აღწევს 70-100%. თუ ევოლუციური დივერგენციის გამო ორი ბაქტერიის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა მკვეთრად განსხვავდება

ერთმანეთისაგან მაშინ დნმ-დნმ სპეციფიური რეასოციაცია ხდება ძალიან სუსტი და ვერ ისაზღვრება ჰომოლოგიის ხარისხი, ამ შემთხვევაში დნმ-რრნმ ჰიბრიდიზაცია იძლევა საშუალებას მკვეთრად გავზარდოთ მიკროორგანიზმთა არეალი, რომლებშიც შესაძლებელია ჰომოლოგიის ხარისხის დადგენა. რრნმ მიერ კოდირებული ბაქტერიალური გენომის მონაკვეთზე მონომერების თანმიმდევრობის მუდმივობა შენარჩუნებულია გაცილებით მეტად ვიდრე ქრომოსომის სხვა უბნებში. შედეგად დნმ-რრნმ ჰიბრიდიზაციის გზით შესაძლებელია ბაქტერიების გენომის ჰომოლოგიურობის დადგენა საკმაოდ მაღალი სიზუსტით, იმ შემთხვევაში როცა დნმ-დნმ რეასოციაცია არ იძლევა საშუალებას შესამჩნევი ჰომოლოგიის დადგენისა.

ბაქტერიების იდენტიფიკაციისათვის ასევე იყენებენ დნმ-ზონდების მეთოდს. ჰიბრიდიზაციის რეაქცია ამ დროს მიდმინარეობს არა ტოტალური დნმ ორ პრეპარატს შორის, არამედ დნმ ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის ფრაგმენტებს (დნმ-ზონდებს) შორის. რომელიც აერთიანებს გარკვეულ ფუნქციაზე პასუხისმგებელ გენს (გენეტიკურ მარკერს-მაგ. ანტიბიოტიკის მიმართ მდგრადობის) და საკვლევი ბაქტერიის დნმ. გენური ზონდების მიღების გავრცელებული მეთოდია სპეციფიური ფრაგმენტების გამოყოფა მოლეკულური კლონირებით. ამისათვის რესტრიქციის ენდონუკლეაზებით ხდება დნმ ფრაგმენტაცია და "გენების ბანკის" შექმნა. შემდეგ კი გადაარჩევენ საჭირო ფრაგმენტებს ელექტროფორეზის გზით და მისი თვისებების შემოწმებით ტრანსფორმაციის მეთოდით. შემდეგ შერჩეულ დნმ ფრაგმენტს ფერმენტ ლიგაზის დახმარებით შეიყვანენ პლაზმიდაში (ვექტორი). ამ კომბინირებულ პლაზმიდას კი შეიყვანენ ბაქტერიის სამუშაო შტამში (მაგ. E. Coli). ნმ-ზონდის მატარებელი ბაქტერიების შტამისაგან გამოყოფენ პლაზმიდურ დნმ და ნიშნავენ მას რადიოიზოტოპური ნიშნულით და ახდენენ დნმ-ზონდის ჰიბრიდიზაციას ბაქტერიის დნმ-თან. მიღებული ჰიბრიდული მონაკვეთების გამოვლენა ხორციელდება აუტორადიოგრაფიული მეთოდით. ბაქტერიის ქრომოსომასთან გენეტიკური მარკერის ჰიბრიდიზაციის სიხშირის განსაზღვრით აკეთებენ დასკვნებს საკვლევი ობიექტების გენეტიკური ნათესაობის შესახებ.

დიდი მნიშვნელობა აქვს რრნმ ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების განსაზღვრის მეთოდს, რომელიც ასევე გამოიყენება გენოსისტემატიკაში. რრნმ 5S, 16S 23S შეიცავს გენეტიკურად მაღალი სტაბილობის მონაკვეთებს. ითვლება რომ მათზე არ მოქმედებს ბუნებრივი გადარჩევა, მათი ევოლუციონირება ხდება მხოლოდ მუდმივი სიჩქარით მიმდინარე სპონტანური მუტაციებით. 5S რრნმ ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის განსასზრვრისას აანალიზებენ სრულ თანმიმდევრობას (120 ნუკლეოტიდი). 16S და 23S რრნმ ანალიზისას, რომლებიც შეიცავს 1500 და 2500 ნუკლეოტიდს შესაბამისად, იკვლევენ სპეციფიური რესტრიქციის ენდონუკლეაზების დახმარებით მიღებულ ოლიგონუკლეოტიდებს. პროკარიოტებში არქებაქტერიების გამოყოფა სწორედ 16S რრნმ სტრუქტურის

შესწავლის საფუძველზე მოხდა. მსგავსების კოეფიციენტის მაჩვენებელი S_{AB}, რომელიც დაფიქსირდა 16S რრნმ კვლევისას ეუბაქტერიებსა და არქებაქტერიებში მეყეობს 0.1 ფარგლებში. მაშინ როცა სრული ჰომოლოგია მოითხოვს რომ S_{AB} =1.0, ხოლო თუ S_{AB}=0.02 –ეს არის შემთხვევითი დამთხვევის მაჩვენებელი.

ძალიან ხშირად გამოიყენება ბაქტერიების იდენტიფიკაციისას დენდროგრამები, რომელიც ასახავს ურთიერთობებს ბაქტერიების გვარებს, სახეობებსა და შტამებს შორის, დნმ-დნმ, დნმ-რრნმ ჰიბრიდიზაციის ან რრნმ ნუკლეოტიდურ შემადგენლობაზე დაყრდნობით, მაგრამ მეთოდის სიძვირე და შრომატევადობა ხშირად მიუწვდომელს ხდის მას.

საუკეთესო მიდგომა ბაქტერიების სისტემატიკისადმი არის გენეტიკური და ფენოტიპური ნიშნების კომპლექსური კვლევა, თუ ადგილი აქვს ფილოგენეტიკურ და ფენოტიპურ კვლევის შედეგებს შორის შეუსაბამობას, უპირატესობა ფენოტიპურ კვლევას ენიჭება. ყოველ განმსაზღრელს გააჩნია მოცემული საძიებო ორგანიზმის იდენტიფიკაციისათვის თავისი გასაღები.

თავი 19. მიკროორგანიზმების ეკოლოგია

ადამიანის მიკროფლორა; ნიადაგის მიკროფლორა; წყლის მიკროფლორა; ჰაერის მიკროფლორა.

ადამიანის მიკროფლორა. ადამიანის ორგანიზმი სიცოცხლის პირველივე წუთებიდან ეხება გარემოს, მრავალი საპროფიტი მიკროორგანიზმი ევოლუციის

პროცესში შეეგუა მაკროორგანიზმში ცხოვრებას და შევიდა მასთან სიმბიოზურ ურთიერთობაში. ადამიანის სხეულის ზედაპირზე გვხვდება სტაფილოკოკები, მიკროკოკები, სტრეპტოკოკები, საფუვრები, სოკოები, გრამდადებითი და გრამუარყოფითი ჩხირები. საკვებად ისინი იყენებენ საოფლე ჯირკვლების მიერ გამოყოფილ ნაერთებს. კანის ზედაპირზე მიკრობთა საერთო რაოდენობა აღწევს 1×10^{10}, ზოგიერთი მიკროორგანიზმი, რომელიც გვხვდება კანის საფარველში წარმოადგენს პირობით-პათოგენურ ფორმებს და ჰიგიენური წესების დაუცველობა ან ორგანიზმის დასუსტება (გადაციება, გადახურება, კვების რეჟიმის დარღვევა) ააქტიურებს მათ და იწვევს სხვადასხვა დაავადებებს.

ადამიანის პირის ღრუს მიკროფლორა განსაკუთრებით მრავალფეროვენია, ანუ აქ არსებული პირობები, ტენი, ტემპერატურა, მჟავიანობა ოპტიმალურია მათი განვითარებისათვის.

ცხოვრების განმავლობაში პირის ღრუს მიკროფლორა მნიშვნელოვნად იცვლება. ადრეულ ბავშვობაში ჭარბობს რძემჟავა ბაქტერიები, შემდეგ იზრდება რაოდენობა და მრავალფეროვნებაც მიკროორგანიზმებისა. ზრდასრული ადამიანის ორგანიზმში არის ანაერობული სტრეპტოკოკები, ტეტრაკოკები, საპროფიტული ნეისერიები, მცირე ზომის გრამუარყოფითი კოკები-განლაგებული ჯგუფებად-ვეილომელები. გრამდადებითი ბაქტერიები წარმოდგენილია– ლაქტობაცილებით, ლეპტოტრიქებით, გრამუარყოფითი - პოლიმორფული ანაერობებით: ბაქტეროიდები, თითისტარისებური ჩხირები, ანაერობული ვიბრიონები და სპირილები, პირის ღრუში ყოველთვის არის აქტინომიცეტები, საფუვრების მსგავსი ***Candida*** გვარის სოკოები, და უმარტივესები; ღრძილის ამება, ტრიქომონადები.

ადამიანის ნორმალური მიკროფლორის შესასწავლად იყენებენ მიკროსკოპიის მეთოდებს. ეს შეიძლება იყოს როგორც ცოცხალი პრეპარატი გაჭყლეტილი წვეთი, ასევე ფიქსირებული პრეპარატი, შეღებილი გრამის წესით. სტერილური ტამპონით იღებენ ნაცხს ცხვირიდან ან პირის ღრუდან, კბილის ჩხირით კი კბილის ნადებიდან და გაუცხიმოვნებულ სასაგნე მინაზე აკეთებენ ნაცხს. აფიქსირებენ, ღებავენ გრამის წესით და იმერსიული სისტემის გამოყენებით იკვლევენ.

მიზანი: ადამიანის ნორმალური მირკოფლორის შესწავლა.

საჭირო მასალა: სტერილური ტამპონები, კბილის ჩხირები, პეტრის ჯამები ხპა, ხპა გლუკოზით და სისხლიანი აგარით.

სამუშაოს მიმდინარეობა: სტერილური ტამპონებით ავიღოთ პირის და ცხვირის ღრუდან ნაცხი, ჩხირით კი კბილის ნადებიდან და გაუცხიმოვნებულ სასაგნე მინაზე გადატანის შემდეგ, დავაფიქსიროთ, შევღებოთ გრამის წესით და მიკროსკოპირების შემდეგ ჩავხატოთ.

ასეთივე სახით აღებული საკვლევი მასალა დავთესოთ ზემოთ ჩამოთვლილ საკვებ არიან პეტრის ჯამებზე და შევდგათ თერმოსტატში 37°C 24 სთ. გაზრდილი კოლონიებიდან გავაკეთოთ მიკროსკოპული პრეპარატები და

მოვახრდინოთ მათი იდენტიფიკაცია, როგორც წესი ხპა იზრდება არაპათოგენური სტაფილოკოკები და სტრეპტოკოკები, სხვა დანარჩენ საკვებ არეზე პირობით პათოგენური და პათოგენური კოკები, რომლებიც მეტად მომთხოვნი არის საკვები არის მიმართ და სისხლიან აგარზე ჰემოლიზის ზონებს წარმოქმნის (ერითროციტების დაშლა).

ხელის ზედაპირის მიკროფლორის შესასწავლად თითის ანაბეჭდები კეთდება სტერილურ საკვებ არიან (ხპა) პეტრის ჯამზე, ინკუბაცია მიმდინარეობს 37°C 24 სთ. გაზრდილი კოლონიებიდან ხდება ფიქსირებული პრეპარატების გაკეთება, შეღებვა გრამის წესით და კვლევა მიკროსკოპით. ნაცხში შეიძლება აღმოჩნდეს სტაფილოკოკები, გრამდადებითი, ძალიან იშვიათად გრამ უარყოფითი ჩხირები, საფუვრები. სუფთა კულტურის მისაღებად მიღებული მასალა უნდა გადაითესოს დაცერებულ აგარზე (ხპა).

ნიადაგის მიკროფლორა

ნიადაგი წარმოადგენს მრავალი მიკროორგანიზმის საარსებო გარემოს, მათ შორის უმრავლესობა საპროფიტული ორგანიზმია და მონაწილეობს ნივთიერებათა წრებრუნვის ისეთ მნიშვნელოვან ეტაპებში, როგორიცაა: ნახშირბადის, აზოტის, გოგირდის, ფოსფორის წრებრუნვა. თვისობრივი შედგენილობით ნიადაგი ძალიან მრავალფეროვანია, მასში არსებობს, ლპობის, ნიტრიფიკაციის, დენიტრიფიკაციის, აზოტმაფიქსირებელი, ცელულოზოდამშლელი, რკინაბაქტერიები, აქტინომიცეტები, სოკოები, წყალმცენარეები და უმარტივესები.

მიკროორგანიზმთა რაოდენობა ნიადაგში განისაზღრება ტერმინით მიკრობული რიცხვი-ეს არის მიკრობათა რაოდენობა 1 გრ მშრალ ნიადაგში. ის დამოკიდებულია ნიადაგის შედგენილობაზე, გეოლოგიურ პროცესებზე, სეზონურობაზე, მიკრობთა ყველაზე დიდი რაოდენობა აღმოჩენილია ჰუმუსში. იადაგის 10-25სმ სიღრმეში მიკრობათა რაოდენობა 1 გრ ნიადაგში აღწევს ათობით და ასობით მილიონს, სიღრმის ზრდასთან ერთად მიკრობთა რაოდენობა კლებულობს.

პირობით პათოგენური და პათოგენური მიკროფლორა ნიადაგში ხვდება ადამიანის და ცხოველის ფეკალურ მასებთან ერთად.

ნიადაგის ნიმუშების ასაღებად გარკვეული სიღრმიდან სტერილური შპატელით ამოაქვთ ნიადაგის გარკვეული რაოდენობა და ათავსებენ წინასწარ გამზადებულ სტერილურ ქაღალდის კონვერტებში. ანალიზი უნდა ჩატარდეს ან აღებისთანავე ან მაცივარში 24 სთ შენახვის მერე.

საკვლევ ნიადაგს აქუცმაცებენ სტერილურ როდინში და საცრით გაცრიან (პორები 3მმ). ამზადებენ ნიადაგის 10 % სუსპენზიას კოლბებში, ანჯღრევენ და აკეთებენ განზავებებს, შესაბამისი განზავება ითესება მყარ საკვებ არეზე სიღრმული ან ზედაპირული მეთოდით (იხ. თავი). ასევე შეიძლება გამოყენებულ იქნეს თხევადი საკვები არეები, რომელშიც შესაბამისი განზავების 1მლ ასხამენ სტერილური პიპეტით, პარალელების რაოდენობა როგორც თხევად

ისე მყარ საკვებ არეზე უნდა იყოს არანაკლებ სამისა. საკვებ არედ გამოიყენება მიკროორგანიზმთა საძიებო ჯგუფისათვის ელექტიური საკვები არე ან უნივერსალური საკვები (ხპა, ბადაგი, თუ ხდება მიკროფლორის საერთო რადენობის დადგენა). მყარ საკვებ არეებზე გაზრდილ კოლონიებს ითვლიან და გადაიანგარიშებენ შესაბამის განზავებიდან 1 გრ ნიადაგზე, ხოლო თხევად საკვებ არეებზე მიკრობთა რაოდენობას განსაზღვრავენ მაკ-კრედის ცხრილის გამოყენებით (იხ. თავი----).

რაც შეეხება ნიადაგის სანიტარულ-მიკრობიოლოგიურ დაბინძურების ხარისხის მაჩვენებელს ეს არის ***E. Coli*** და ***Clostridium perfingens.***

ნაწლავის ჩხირის რაოდენობრივი დახასიათებისათვის იყენებენ კოლი-ტიტრს. ეს არის ნიადაგის უმცირესი რაოდენობა გრ-ში, რომელშიც არმოჩენილია ***E. coli*** ერთი უჯრედი. ნიადაგის კოლი-ტიტრის დასადგენად იყენებენ ელექტიურ საკვებ არეებს, რომელიც შეიცავს ნაღველსა და გენციან-ვიოლეტს, რომელიც თრგუნავს მიკროორგანიზმთა უმრავლესობის ზრდას, მაგრამ არ აფერხებს ***E. Coli***-ს განვითარებას. ფართოდ გამოიყენება კესლერის საკვები არე. საწყის ეტაპზე 10მლ (განზავება 1/10) ნიადაგის სუსპენზიას თესავენ თხევად კესლერის არეზე, რაც შეესაბამება 1 გრ ნიადაგს 50მლ კესლერის საკვებ არეში, შემდეგ თითო მლ ყოველი მომდევნო განზავება ამ სუსპენზიისა გადააქვთ სინჯარებში 5 მლ კესლერის საკვები არით, ინკუბაცია მიმდინარეობს 43°C. 24სთ ინკუბაციის შემდეგ გადაარჩევენ ე.წ. დადებით სინჯარებს ანუ მათ რომელშიც შეინისნება ***E. Coli*** აქტიური ზრდა და აირის წარმოქმნა ტივტივაში, რომელიც სინჯარაში არის განთავსებული. აღებული სინჯარებიდან გადათესავენ ნიმუშს ენდოს მყარ საკვებ არეზე 37 ^{O}C, 24 სთ ინკუბაციის შემდეგ აღრიცხავენ ***E. Coli*** წითელ ბზინავ კოლონიებს. ნიდაგის ზღვრული განზავება, რომელშიც აღმოჩენული იქნება ***E. Coli*** არისნაწლავი ჩხირის ტიტრი.

Clostridium perfingens-ის რაოდენობრივი აღრიცხვისათვის არის პერფინგენს-ტიტრი, ნიადაგის უმცირესი რაოდენობა, რომელშიც აღმოჩნდება ამ მიკროორგანიზმის ერთი უჯრედი. პერფინგენს-ტიტრის დასადგენად იყენებენ ვილსონ-ბლერის საკვებ არეს(იხ. დანართი). დასათესად იყენებენ იმავე სუსპენზიას, რაც გამოყენებულ იყო კოლი-ტიტრის შემთხვევაში. იმისათვის რომ არასპოროვანი ბაქტერიების ზრდა გამოირიცხოს სუსპენზიას აცხელებენ 80 ^{O}C 15-20წთ. შემდეგ ერთ მლ შესაბამის ნიადაგის განზავებას შეიტანენ გამღვალ ვილსონ-ბლერის საკვებ არეში, ანაწილებენ თანაბრად და დგამენ თერმოსტატში 37-43°C. თუ ნიადაგში აღმოჩნდება ***Cl. Perfingens*** შეინიშნება საკვები არის ცვლილება 3-18სთ. ეს მიკროორგანიზმი ამ დროს აღადგენს ნატრიუმის სულფიტს გოგირდწყალბადამდე (H_2S), რომელიც ურთიერთქმედებს საკვებ არეში არსებულ რკინის ქლორიდთან რის შედეგადაც წარმოიქმნება რკინის სულფიდი და კოლონიები იღებება შავად. ასევე შესაძლებელია ***Cl.***

perfingensis გამოყენებულ იქნეს რძიანი საკვები არეები (ტუკაევის საკვები არე), რადგან ეს მიკროორგანიზმი აქტიურად ადუღებს ლაქტოზას და რძე დედდება დაახლოებით დათესვიდან 3 სთ. თუ ასეთი დაბინძურებული ნიადაგი მოხვდა ღია ჭრილობაში, ის იწვევს აიროვან განგრენას.

ნიადაგის სანიტარულ ბაქტერიოლოგიური შეფასება კოლი-ტიტრითა და პერფინგენს-ტიტრით.

საკვლევი ნიადაგი	ტიტრი ***E. Coli*** (გრ)	ტიტრი ***Cl. Perfingens*** (გრ)
ძლიერ დაბინძურებული	<0.001	<0.0001
ზომიერად დაბინძურებული	0.01-0.001	0.001-0.0001
სუსტად დაბინძურებული	1.0-0.01	0.01-0.001
სუფთა	>1	>0.1

სამუშაოს მიზანი: ნიადაგის მიკრობული რიცხვის განსაზღვრა, კოლი-ტიტრისა და პერფინგენს-ტიტრის დადგენა.

მასალები: ნიადაგის ნიმუში, ტექნიკური სასწორი, სტერილური როდინები, სტერილური ფიზიოლოგიური ხსნარი, სინჯარები, პიპეტები, პეტრის ჯამები, საკვები არეები; ხპა, ენდო, ვილსონ-ბლერი, კესლერი, ტუკაევის საკვები არეები, თხევადი არეებისათვის ტივტივები.

სამუშაოს მსვლელობა:

1. მომზადდეს ნიადაგის სუსპენზია ზემოთ ნახსენები პროპორციით და გაკეთდეს განზავებები ფიზიოლოგიურ ხსნარში: $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$, ათმაგ განზავებებს ღებულობენ 9მლ ფიზიოლოგიურ ხსნარშსი 1 მლ სუსპენზიის დამატებით. 1 მლ თითოეულ განზავება შევიტანოთ სტერილურ პეტრის ჯამზე და დავასხათ გამლღვალი ხპა ($45^{O}C$). ინკუბაცია წარმოებს 48 სთ 22 ^{O}C . კოლონიების გადათვლით და განზავებებზე გადაანგარიშებით გამოითვლება საკვლევი ნიადაგის მიკრობული რიცხვი.

2. 10 მლ ნიადაგის სუსპენზია (1:10) შევიტანოთ 50მლ კესლერის თხევად საკვებ არეში კოლბაში, 1 მლ ეს სუსპენზია და ყოველი მომდევნო განზავება დავთესოთ 5-5მლ იგივე საკვებ არეში სინჯარებში. 24 სთ $43^{O}C$ ინკუბირების შემდეგ გადავარჩევთ აქტიურად ზრდად სინჯარებს, რომლებშიც აირი წარმოიქმნა და გადავთესავთ ენდოს საკვებ არეზე, $37^{O}C$ 24 სთ ინკუბაციის შემდეგ ვაკვირდებით წითელ კოლონიებს, ვამზადებთ პრეპარატებს მიკროსკოპირებისთვის. ბოლო განზავების გათვალისწინებით, რომელთიც აღმოჩნდა ***E. Coli*** ანგარიშობენ კოლი-ტიტრს.

3. ნიადაგის სუსპენზიას აცხელებენ 80 ^{O}C 15წთ, 1მლ შეაქვთ ვილსონ-ბლერის $45^{O}C$ გამთბარ საკვებ არეში, სინჯარებში, აინკუბირებენ $43^{O}c$. 18 სთ.

აკვირდებიან ***Cl. Perfingens*** შავი კოლონიების გამოჩენას და ნიადაგის სუსპენზიის განზავებაზე დაყრდნობით ანგარიშობენ პერფინგენს-ტიტრს.

4. 1 მლ ასევე 80°C გაცხელებული ნიადაგის სუსპენზია შეაქვთ ტუკაევის საკვებ არიან სინჯარებში 43 ^{O}C 18 სთ ინკუბაციის გასვლის შემდეგ აკვირდებიან რძის შედედებას და ასევე საზღვრავენ პერფინგენ-ტიტრს განზავებიდან გამომდინარე.

წყლის მიკროფლორა. წყალი, ისევე როგორც ნიადაგი წარმოადგენს მიკრობთა საარსებო გარემოს. სახეობრივი შემადგენლობა ძლიერ ვარირებს და მრავალფეროვენია, როგორც ვერტიკალში, ასევე ჰორიზონტალში. წყალში გვხვდება აზოტფიქსატორები, ნიტრიფიკატორები, ცელულოზოდამსლელები, რკინაბაქტერიები, გოგირდბაქტერიები და სხვა. წყალში განსაკუთრებით ბევრია ლურჯ-მწვანე წყალმცენარეები, საპროფიტული სპიროქეტები და უმარტივესები. წყაროსა და ღრმა ჭაბურღილების წყლები ღარიბია მიკროფლორით, ზღვისა და ოკეანეების წყლებში არის მიკროორგანიზმები, რომლებიც შეგუებულია მარილის მაღალ კონცენტრაციებს (ჰალოფილური მიკროორგანიზმები). ზღვებში გვხვდება ე.წ. მანათობელი ლუმინესცენტური ბაქტერიები, რომლებიც იწვევს ზღვის წყლის ნათებას.

მტკნარი წყლის მიკროფლორის შესწავლა განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია, რადგან ის გამოიყენება სასმელად და ტექნიკური მიზნებისათვის.

წყლის თვითგაწმენდის გათვალისწინებით ღია წყალსატევებში ასხვავებენ სამ ზონას:

1. პოლისაპრობული- ძლიერი დაბინძურების ზონა, წყალი, რომელიც შეიცავს დიდი რაოდენობით ორგანულ ნაერთებს მდიდარია მიკროფლორით. 1მლ წყალი ამ ზონაში შეიძლება შეიცავდეს მილიონობით ბაქტერიას.

2. მეზოსაპრობული-ზომიერად დაბინძურებული ზონა, სადაც მიმდინარეობს ორგანული ნივთიერებების დაშლისა და მინერალიზაციის პროცესები. მიკრობთა რაოდენობა 1 მლ -100.000 მდე.

3. ოლიგოსაპრობული ზონა- ორგანული ნაერთები პრაქტიკულად არ არის, მინერალიზაციის პროცესი სრულდება, სჭარბობს წყლის ნორმალური მიკროფლორის წარმომადგენლები. მიკრობების რაოდენობა 1 მლ არ აღემატება 1000.

ძლიერ დაბინძურებული წყალიც კი ექვემდებარება თვითგაწმენდას შემდეგი პროცესების ხარჯზე: დაბინძურებული წყლის გაზავება სუფთა წყლით, მიკრობული უჯრედების მექანიკური დალექვა, მიკრობების დაღუპვა ანტიბიოტიუკური ნაერთების ზემოქმედებით, რომლებსაც გამოყოფენ სოკოები და წყალმცენარეები, უმერტივესების მიერ ბაქტერიების გამოყენება საკვებად და ა. შ. თუმცა ეს პროცესები მიმდინარეობს ძალიან ნელა და როცა წყალი ძლიერ

დაბინძურებულია ის შეიძლება სხვადასხვა ინფექციური დაავადების წყარო გახდეს.

წყლის სანიტარული დახასიათებისას ანგარიშობენ წყლის მიკრობულ რიცხვს და სანიტარული მაჩვენებლის განმსაზღვრელ მიკროორგანიზმებს.

წყლის მიკრობული რიცხვი ეს არის 1მლ წყალში მიკროორგანიზმთა საერთო რაოდენობა.

წყლის ნიმუშების ასაღებად გამოიყენება 0.5-1მლ მოცულობის კოლბები, წინასწარ გასტერილებული (0.5-1ატმ. 1-1.5სთ), თავდახურული ბამბის საცობით და მოთავსებული სპეციალურ ქაღალდის პარკში. ღია წყალსატევებში წყლის ნიმუშების აღება ხდება ზედაპირიდან 10-15სმ სიღმეში ან ფსკერიდან 10-15სმ სიმაღლეზე, სპეციალური ხელსაწყოთი – ბარომეტრით (სურ. №----).

როცა საუბარია სასმელი წყლის ანალიზზე, წყლის ნიმუშებს იღებენ როგორც წყლის სათაო ნაგებობებიდან, ასევე ცენტრალური ონკანებიდან, რომელსაც გამოწვავენ ცეცხლის ალით და ნიმუშს მხოლოდ შემდეგ აიღებენ, თუ წყალი ქლორირებულია, მას ათავსებენ სტერილურ კოლბებში, რომელშიც ასხია 2მლ 1,5% ჰიპოსულფიტის სტერილური ხსნარი.

წყლის ნიმუშის დასათესად, იღებენ სტერილური პიპეტით მის 1მლ და ასხამენ სტერილურ ცარიელ პეტრის ჯამზე, შემდეგ მასზე ჩამოასხამენ 24°C გაგრილებულ ხპა, შედგამენ თერმოსტატში 37°C 24 სთ, საფუვრებისა და სოკოების გამოსავლენად კი წყლის ნიმუშს თესავენ იგივე სიღრმული მეთოდით ბადაგზე და აინკუბირებენ 24°C 46-72სთ.

ინკუბაციის დასრულების შემდეგ ითვლიან ჯამზე გაზრდილი კოლონიების რაოდენობას, ითვლება რომ ერთი მიკრობული უჯრედიდან ვითარდება ერთი კოლონია და საბოლოოდ გამოიანგარიშებენ მიკრობთა საერთო რიცხვს.

ვინაიდან წყალში დაბინძურებული წყლის ბინადარი მიკროორგანიზმების უმრავლესობის სასიცოცხლო ციკლი და სიცოცხლის ხანგრძლივობა ძალიან ახლოსაა ***E. Coli*** მონაცემებთან, რადგა წყლის ფეკალური დაბინძურების მაჩევნებელი ძირითადად ნაწლავის ფლორაა, წყლის დაბინძურების ხარისხის სანიტარული მარკერი ***E. Coli*** გახლავთ.

კოლი-ტიტრი- წყლის უმცირესი რაოდენობა (მლ) რომელშიც აღმოჩნდება სიცოცხლისუნარიანი ერთი ნაწლავის ჩხირის უჯრედი.

კოლი-ინდექსი- 1ლ წყალში ***E. Coli*** უჯრედების საერთო რაოდენობა.

წყლის კოლი-ტიტრის დასადგენად უფრო ხშირად იყენებენ ორფაზიან დუღილის მეთოდს. პირველ ეტაპზე წყალი ითესება ეიკმანის გლუკოზო-პეპტონურ არეზე, რომელსაც ამზადებენ ორი კონცენტრაციით: გაზავებული - შეიცავს 1% პეპტონს, 0.4%NaCl, 0.5%გლუკოზას და კონცენტრირებული-შეიცავს იგივე კომპონენტებს ათჯერ გაზრდილი კონცენტრაციით. განზავებულ საკვებ არეს ჩამოასხამენ 10-10მლ ტივტივებიან სინჯარებში, ის გამოიყენება წყლის

მცირე მოცულობის დასათესად (<1მლ). კონცენტრირებულ საკვე არეს ასხამენ 1-1მლ ტივტივებიან სინჯარებში და 10-10მლ კოლბებში. ამ ჭურჭელსი ითესება 10მლ და 100მლ საკვლევი წყლის ნიმუში შესაბამისად, ძლიერ დაბინძურებული წყლის შემთხვევაში შესაძლებელია აუცილებელი გახდეს განზავებების გაკეთება და მხოლოდ ამის შემდეგ დათესვა. ინკუბაცია ხდება 43°C 24სთ, რის შემდეგაც ამ სინჯარებიდან ხდება გადათესვა სადიფერენციაციო-სადიაგნოსტიკო საკვებ არეზე-РДА , ეს არის ხპა საფუძველზე დამზადებული საკვები არე, რომელსაც ამატებენ 5% ნაღველს, 1% ლაქტოზას, 0.1% გლუკოზას და ინდიკატორს-როზოლოვაია კისლოტა. Ph-7.0-7.2. სტერილიზაციის შემდეგ საკვებს აქვს ვარდისფერი ფერი, ***E. Coli*** იწვევს მის გაყვითლებას, კონდენსატის წყლის აქაფვებას და აგარის გახლეჩას. მიკროსკოპირების შემდეგ, თუ ნაცხში აღმოჩენილია გრამ-უარყოფითი ჩხირები საუბრობენ ***E. Coli*** არსებობაზე.

წყლის კოლი-ინდექსის გამოთვლა ხარციელდება მემბრანული ფილტრების გამოყენებით. საკვლევი წყალი იფილტრება სტერილური ნიტრაცელულოზური ფილტრებით, სასმელი წყლის ფილტრაციისას ხდება 300-500მლ გატარება, ხოლო დაბინძურებული წყლის შემთხვევაში ხდება მისი გაზავება. ფილტრაციის დასრულების შემდეგ ფილტრის ზედაპირს ფრთხილად იღებენ სტერილური პინცეტით და ათავსებენ სადიფერენციაციო-სადიაგნოსტიკო არის ზადაპირზე (ენდოს საკვები არე), რომელიც სტერილურად ჩამოსხმულია პეტრის ჯამზე. ***E. Coli*** კოლონიები ამ საკვებზე არის მუქი წითელი შეფერილობის, ბზინავი, ასევე ნაწლავის ჩხირის ზოგიერთი შტამი არ ახდენს ლაქტოზის ფერმენტაციას და არის უფერული. ამ უკანასკნელ შემთხვევაში ხდება გადათესვა გლუკოზოპეპტონიან არეზე. გაზრდილი კოლონიების რადოენობის დათვლითა და გაფილტრული წყლის რადოენობის გათვალისწინებით ხდება კოლი-ინდექსის დაანგარიშება. ყველა შემთხევვაში ***E. Coli*** არსებობა უნდა იქნეს დამტკიცებული მიკროსკოპირებით.

ნიადაგის და წყლის მიკროფლორის კვკლევა შესაძლებელია ასევე კაპილარული მეთოდით, ამისათვის ნიადაგში ან წყალში უშვებენ სპეციალურ მიკროკაპილარებს, რომლებიც ივსება საკვლევი მასალით და ხდება მისი სინათლის მიკროკოპით კვევა.

სამუშაოს მიზანი: განისაზღვროს ტექნიკური, დისტილირებული და სასმელი წყლის მიკრობული რიცხვი, კოლი-ტიტრი და კოლი-ინდექსი.

მასალები: წყლის ნიმუშები, სკვები არეები: ხპა, ნდო, ეიკმანის არე, РДА. მემბრანული ფილტრები.

სამუშაოს მსვლელობა:

1. საკვლევი წყლის 1მლ შეაქვთ სტერილურ, ცარიელ პეტრის ჯამზე, ამატებენ 10მლ 45°C გაგრილებულ ხპა და დგამენ თერმოსტატში 37°C 24 სთ. ითვლიან კოლონიების რაოდენობას და და საზღვრავენ მიკრობულ რიცხვს.

2. წყლის კოლი-ტიტრის დადგენა-ზემოთ აღწერილი მეთოდით ეიკმანის საკვებ არეში ითესება ნიმუში და 43°C 24 სთ ინკუბაციის შემდეგ გადაიტანენ სადიფერენციაციო-სადიაგნოსტიკო საკვებ არეზე РДА. 37°C 24 სთ ინკუბაციის შემდეგ გაზრდილი მიკროორგანიზმებიდან ამზადებენ პრეპარატებს ***E. Coli*** არსებობის საბოლოოდ დასამტკიცებლად, მიღებულ შედეგებს ადარებენ სტანდარტული მონაცემების ცხრილს და აკეთებენ შესაბამის დასკვნებს.

3. საკვლევი წყლის 500 მლ გაფილტრავენ მემბრანული ფილტრით, ფილტრის ზედაპირი გადააქვთ ენდოს საკვებ არიან პეტრის ჯამზე, 37°C 24 სთ ინკუბირების შემდეგ ითვლიან კოლონიებს, მიკროსკოპირებით ამოწმებენ ***E. Coli*** უჯრედებს და საზღვრავენ კოლი-ინდექსს.

ჰაერის მიკროფლორა

ჰაერი არ წარმოადგენს მიკროორგანიზმებისათვის ოპტიმალურ საარსებო გარემოს, ისინი ხვდებიან აქ ნიადაგიდან, წყლიდან, ადამიანისა და ცხოველის ორგანიზმიდან, როცა ვერ პოულობენ საკვებს, მზის რადიაციის, ტემპერატურისა და სხვა ფაქტორების ზემოქმედებით შრებიან და იღუპებიან.

ჰაერში მიკროორგანიზმთა რაოდენობა მერყეობს მეტეოროლოგიური პირობების, დედამიწის ზედაპირიდან დაშორების მანძილის, დასახლებული პუნქტების არსებობა არარსებობის მიხედვით. მიკროორგანიზმთა დიდი რაოდენობაა ინდუსტრიული ქალაქების ჰაერში, ძალიან მცირეა ტყის მასივებსა და მთიან ადგილებში.

მიკროორგანიზმები ჰაერში არსებობენ მტვრის ან ტენის ნაწილაკებზე აეროზოლის სახით. აეროზოლი-კოლოიდური სისტემა, რომელიც შედგება აიროვანი გარემოსაგან, მაგ. ჰაერში გაფანტული მტვრის ნაწილაკები და ტენის წვეთები.

აეროზოლის დისპერსიული ფაზის მდგრადობა დამოკიდებულია ნაწილაკების სიდიდეზე, მათ ზედაპირულ ენერგიასა და მუხტზე. მიკრობული აეროზოლის კინეტიკაში სქემატურად ასხვავებენ სამ ფაზას:

1. მსხვილბირთვიანი ფაზა-როცა ნაწილაკების დიამეტრი 0.1მმ, სწრაფად ილექება და მათი ჰაერში ყოფნის ხანგრძლივობა განისაზღვრება რამოდენიმე წამით;

2. მცირებირთვიანი ფაზა-ნაწილაკების ზომა <0.1მმ, ეს მცირე წვეთები დიდ ხანს ნარჩუნდება ჰაერში და წარმოქმნის საკმაოდ მდგრად კოლოიდურ სისტემას. მასში მიკროორგანიზმები დაცულია ტენის შრით;

3. ბაქტერიალური მტვერის ფაზა-მცირე და მსხვილბირთვიანი ფაზის ნაწილაკები შრება და გარდაიქმნება ე.წ. მტვერად, რომლის ნაწილაკების ზომა 1მკმ-100მკმ. ისინი დიდხანს არსებობს ჰაერში და აღწევს ადამიანის სასუნთქ გზებში.

ჰაერში გვხვდება 100 ზე მეტი სახეობის მიკროორგანიზმი, რომელთა უმრავლესობა საპროფიტია. ეს არის ძირითადად კოკები, სპორაწამომქმნელი

ჩხირები, პიგმენტური ბაქტერიები, რომლებიც სპორას არ წარმოქმნიან. სოკოების სპორები და საფუვრები.

ასევე შეიძლება იყოს პათოგენური და პირობით პათოგენური მიკროფლორა, განსაკუთრებით ხალხმრავალ დახურულ შენობებში. სტრეპტოკოკები, პნევმოკოკები, დიფტერიისა და ტუბერკულოზის ჩხირები, სხვადასხვა ტიპის ვირუსები. ისინი გარემოში დიდ რაოდენობით გამოიყოფა დახველების, ცხვირის დაცემინებისა და საუბრის დროსაც კი. ამიტომაც დიდი მნიშვნელობა აქვს დახურული შენობების სანიტარულ – ბაქტერიოლოგიურ კვლევას, რომელიც ითვალისწინებს ფართობის 1მ^3 მიკრობთა რაოდენობის ანუ ჰაერის მიკრობული რიცხვის განსაზღვრას და ჰაერის სანიტარული მაჩვენებლის მიკროორგანიზმების დადგენას. ჰაერის მიკრობიოლოგიური კვლევის მეთოდები იყოფა სედიმენტაციურ და ფილტრაციულ მეთოდებად.

კოხის სედიმენტაციის მეთოდი ყველაზე მარტივია, ამ დროს ხპა ჩამოსხმულ პეტრის ჯამებს თავღია ტოვებენ საკვლევ ობიექტზე 5-30წთ, შემდეგ ახურავენ თავს და დგამენ თერმოსტატში 37°C 24 სთ. შემდეგ გამოიტანენ და 24 სთ აჩერებენ ოთახის ტემპერატურაზე. აეროზოლის ნაწილაკებში არსებული მიკროორგანიზმები ილექება საკვები არის ზედაპირზე და ინკუბირებისას წარმოიქმნება კოლონიები. გაზრდილი კოლინიების რადოენობით საზღვრავენ ჰაერის მიკრობულ რიცხვს. ომელიანსკის წესის მიხედვით 100სმ^2 საკვები არის ზედაპირზე 5 წთ განმავლობაში ილექება იმდენი მიკროორგანიზმი, რამდენიც არის 3 ლ ჰაერში. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით და დათვლილი კოლონიების რაოდენობით გადაიანგარიშებენ 1მ3 (100ლ) მიკროორგანიზმთა რადოენობას.

კოხის მეთოდს სიმარტივის მიუხედავად აქვს თავისი უარყოფითი მხარეები. საკვები არის ზედაპირზე ილექება მხოლოდ დიდი ზომის ნაწილაკები. ბაქტერიალური მტვერის ფაზა კი ვერა. გარდა ამისა ეს მეთოდი არ იძლევა საშუალებას ჰაერში რიკეციებისა და ვირუსების რაოდენობრივი განსაზღვრისა.

უფრო სრულყოფილია კროტოვის აპარატით ჰაერის მიკროფლორის კვლევა. კროტოვის აპარატი არის ცილინდრული ფორმის კორპუსი, რომელიც იხურება ზევიდან სახურავით, რომლის ქვეშ ბრუნავ დისკზე მაგრდება პეტრის ჯამი (ხპა-თი). ცილინდრის შიგნით არის ძრავა, რომელიც უზრუნველყოფს ჰაერის შეწოვას. ჰაერის ტურბულენტური ჭავლის ზემოქმედებით დისკი ტრიალებს და მიკროფლოლა პეტრის ჯამზე თანაბრად ნაწილდება და ამ დროს აეროზოლის სამივე ფაზის აქტიური სედიმენტაცია მიდმინარეობს. (სურ. №----).

ამ დანადგარში როტომეტრი გამოიყენება შეწოვილი ჰაერის მოცულობის დასადგენად, ეს როგორც წესი 50-200ლ. სინჯების აღების შემდეგ პეტრის ჯამს ათავსებენ თერმოსატტში 37°C 24 სთ. შემდეგ კი ითვლიან გაზრდილი კოლონიების რაოდენობას, რომელსაც გადაიანგარიშებენ ომელიანსკის წესის შესაბამისად.

ჰაერის ფილტრაციის მეთოდით კვლევისათვის იყენებენ უხსნად ფილტრებს: ბამბის, ქაღალდის, მემბრანული, მილიპორები ან ხსნად ფილტრებს: გლიცერინო-ჟელატინური, ნატრიუმის ალგინატის, შაქრის პუდრის და სხვა.

შესაბამისი მასალის ფილტრი თავსდება ზეიტცის აპარატში (სურათი №---) და ვაკუუმით ხდება გარკვეული რადოენობის ჰაერის შეწოვა, შემდეგ ფილტრის ფირფიტას ათავსებენ ფიზიოლოგიურ ხსნარში, მიკროორგანიზმების დესორბირების შემდეგ ხსნარიდან მათი ამოთესვა ხდება შესაბამის საკვებ არეებზე, თუ ხსნადი ფილტრები გამოიყენება, მაშინ ჰაერის შეწოვის შემდეგ ისინი ფიზიოლოგიურ ხსნარში იხსნება.

სამუშაოს მიზანი: ჰაერის მიკრობული რიცხვის განსაზღვრა და სანიტარული მაჩვენებლების მიკროორგანიზმების შემცველობის დადგენა.

მასალები: პეტრის ჯამები ხპა, ბადაგით, სისხლიანი აგარით. კროტოვის აპარატი.

სამუშაოს მსვლელობა:

1. კოხის მეთოდით მიკროორგანიზმთა რადოენობის დადგენა- სამივე საკვები არიანი პეტრის ჯამები თავღია იდგმევა ჰაერზე 5წთ. შემდეგ ინკუბირდება 37°C 48სთ. კოლონიების დათვლა და მიკრობული რიცხვის განსაზღვრა ხდება ომელანსკის წესზე დაყდნობით.

2. კროტოვის აპარატით მიკრობული რიცხვისა და სანიტარული მაჩვენებლის განმსაზღვრელი მიკროორგანიზმების დადგენა. სამივე საკვები არის შემცველ პეტრის ჯამებს ათავსებენ აპარატში, გაატარებენ 200ლ ჰაერს 20-30ლ/წთ სიჩქარით, სინჯების აღების შემდეგ პეტრის ჯამებს ათავსებენ თერმოსტატში 37 ^{O}C 48 სთ. კოლონიებს ითვლიან, ამზადებენ მიკრობულ პრეპარატებს და იკვლევენ გრამის წესით, სისხლიან აგარზე ჰემოლიზის ზონების არსებობას აფიქსირებენ.

ორივე მეთოდით მიღებული შედეგების შედარების მერე უნდა მოხდეს ჰაერის სისუფთავის შეფასება.

თავი 20. ანტიბიოტიკები

***ანტიბიოტიკები;** ანტიბიოტიკების წარმოქმნა; მიკროორგანიზმების ანტიბიოტიკური აქტივობის განსაზღვრა; პერპენდიკულარული შტრიხების მეთოდი; აგარის ბლოკების მეთოდი; ანტიბიოტიკების მიმართ მიკროორგანიზმების მგრძნობელობის განსაზღვრა.*

ანტიბიოტიკების წარმოქმნა. ცხოველქმედების პროცესში მრავალი მიკროორგანიზმი წარმოქმნის სპეციფიურ ნაერთებს, რომლებიც ხასიათდება ფიზიოლოგიური აქტიურობით სხვადასხვა ორგანიზმების, მათ შორის ვირუსების მიმართ, თრგუნავენ რა მათ ზრდა-განვითარებას ან კლავენ მათ. ეს ანტიბიოტიკებია. მათ ახასიათებთ სპეციფიურობა და ავლენენ აქტიურობას მხოლოდ კონკრეტული ჯგუფის ორგანიზმების მიმართ. როგორც წესი გრამდადებითი მიკროორგანიზმები უფრო მგრძნობიარეა ანტიბიოტიკების მიმართ ვიდრე გრამუარყოფითი, რაც მათი უჯრედის კედლის აგებულებით აიხსნება.

მიკროორგანიზმების ანტიბიოტიკური აქტივობის განსაზღვრა

არსებობს ანტიბიოტიკური აქტივობის განსაღვრის სხვადასხვა მეთოდი, რომელთა უმრავლესობა ეყრდნობა ანტიბიოტიკების უნარს დიფუნდირდეს აგარიზებულ საკვებ არეში და წარმოქმნას ზონები, სადაც ტესტ-ორგანიზმებს არ შეუძლიათ ზრდა-განვითარება. ტესტ-მიკროორგანიზმებად ძირითადად იყენებენ; ***Esherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus mycoides, Bacillus subtilis***.

პერპენდიკულარული შტრიხების მეთოდი.

პეტრის ჯამზე შესაბამის საკვებ არეზე ითესება ანტიბიოტიკოპროდუცენტი ორგანიზმი შტრიხის მეთოდით, კულტივირების დასრულების შემდეგ, ანტიბიოტიკი, რომელიც გამოიმუშავა პროდუცენტმა დიფუნდირებულია აგარის სიღრმეში, ამიტომ იღებენ ტესტ მიკროორგანიზმს და იმავე პეტრის ჯამზე უკვე არსებული შტრიხის პერპენდიკულარულად, ასევე შტრიხით თესავენ. პეტრის ჯამებს ალაგებენ თერმოსტატში შესაბამის ტემპერატურაზე, 2-8 დღის შემდეგ აკვირდებიან ვიზუალურად, თუ პროდუცენტის მიერ გამომუშავებული ანტიბიოტიკი თრგუნავს ტესტ მიკროორგანიზმის ზრდას, მაშინ მისი შტრიხები ვითარდება პროდუცენტი ორგანიზმიდან მოშორებით, ხოლო თუ არ თრგუნავს მაშინ მის უშაუალო სიახლოვეს. რაც უფრო დიდია მანძილი ტესტ-ორგანიზმსა და პროდუცენტს შორის, მით უფრო აქტიურია ანტიბიოტიკი. მეთოდის უარყოფითი მხარე გახლავთ ის რომ, პროდუცენტი და ტესტ-ორგანიზმი უნდა გაიზარდოს ერთი და იგივე საკვებ არეზე და ხშირ შემთხვევაში რთულია ორივესათვის ოპტიმალური შემადგონლობის შერჩევა.

აგარის ბლოკების მეთოდი ითვალისწინებს ანტიბიოტიკის პროდუცენტისა და ტესტ-ორგანიზმისათვის სხვადასხვა საკვები არის გამოყენებას. ანტიბიოტიკის პროდუცენტ მიკროორგანიზმს ზრდიან მისთვის ოპტიმალურ საკვებ არეზე (შპადელით), კულტივირების დასრულების შემდეგ, სპეციალური "ბურღით" სტერილურად ამოჭრიან ბლოკებს და გადააქვთ მეორე პეტრის ჯამზე, რომელზეც ასევე შესაბამის საკვებ არეზე დათესილია ტესტ-ორგანიზმი, ბლოკები იდება სტანდარტულად, თანაბარი მანძილით ერთმანეთისაგან დაშორებული, უკეთესი შედეგის მისაღწევად შეიძლება ისინი ჩავალაგოთ ტეს-მიკროორგანიზმიან პეტრის ჯამში წინასწარ ამოჭრილ შესაბამისი ზომის ჭებში. ასეთი სახით პეტრის ჯამებს აყოვნებენ ოთახის ტემპერატურაზე ანტიბიოტიკის აგარში დიფუნდირების ხელშესაწყობად და ალაგებენ

თერმოსტატში ტესტ-მიკროორგანიზმის განვითარებისათვის საჭირო ტემპერატურაზე. თუ ტესტ-მიკროორგანიზმი მგრძნობიარეა მოცემული ანტიბიოტიკის მიმართ მაშინ ბლოკების ორგვლივ წარმოიქმნება სტერილური ზონები და რაც უფრო დიდია მათი დიამეტრი, მით უფრო აქტიურია ანტიბიოტიკი.

ანტიბიოტიკების მიმართ მიკროორგანიზმების მგრძნობელობის განსაზღვრა ხელსაყრელია ქარხნული წამოების ქაღალდის დისკებით, რომლებიც გაჟღენთილია შესაბამისი ანტიბიოტიკით. დისკებში ანტიბიოტიკების კონცენტრაცია ისეა შერჩეული, რომ სტანდარტული ტესტ-მიკროორგანიზმების დათრგუნვის ზონა 28-32მმ შეადგენდეს.

საკვკლევ მიკროორგანიზმებს ზრდიან შესაბამის საკვებ არეზე, შემდეგ სტრილურ ონკანის წყალში ამზედბენ მათ სუსპენზიას, 1მლ სუსპენზიაში უნდა იყოს 2მლრდ ტესტ-მიკროორგანიზმის უჯრედი (ადგენენ შემღვრევის სტანდარტით). ამ სუსპენზიის 1 მლ შეაქვთ აგარიზებულ 50°C გაგრილებულ საკვებ არეში (სინჯარაში, 20მლ) მოურევენ და ჩამოასხამენ პეტრის ჯამზე, გამყარების შემდეგ მასზე ათავსებენ ქაღალდის დისკებს ანტიბიოტიკებით. 2 სთ აყოვნებენ ოთახის ტემპერატურაზე და ალაგებენ თერმოსტატში შესაბამის ტემპერატურაზე. თუ საკვლევი ტესტ-მიკროორგანიზმი მგრძნობიარეა ანტიბიოტიკის მიმართ დისკების ირგვლივ წარმიქმნება სტერილური ზონა, რომელიც იზომება მმ. თუ ზონა 30მმ მეტია მიკროორგანიზმი ხასიათდება ანტიბიოტიკის მიმართ მაღალი მგრძნობელობით, თუ 12მმ ნაკლებია –მაშინ დაბალი მგრძნობელობა აღინიშნება.

თუ ექსპერიმენტატორს აქვს ანტიბიოტიკების ხსნარები, მაშინ მათი აქტივობის განსაზღვრის მიზნით აგარიზებულ საკვებ არეში, რომელშიც დათესილია ტესტ-მიკროორგანიზმი ამოჭრიან სტერილური ბურღით ჭებს (დიამეტრი-6-8მმ) და გარკვეული კონცენტრაციის ანტიბიოტიკის ხსნარს ასხამენ მასში. კულტივირების დასრულების შემდეგ ზომავენ ჭის ირგვლივ წარმოქმნილ სტერილურ ზონას, რომლის სიდიდე ანტიბიოტიკის აქტივობის განსმაზღვრელია.

ლიტერატურა

1. Айла Ф., Кайгер Дж. Современная генетика., М., 1987
2. Блохина И. Н., Леванова Г. Ф., Антонов А. С., Систематика бактерий (с основами геносистематики) , Н. Новгород., 1992
3. Большой практикум по микробиологии/ Под. Ред. Г. Л. Селибера, М., 1962
4. Воробейков Г. А. , Агре Н. С., Микроорганизмы, урожай и бологизация земледелия. СПБ., 1998
5. Добровольская Т. Т. Структура бактерияльных сообществ почв. М., 2002
6. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках М., 1994
7. Емцев В. Т. , Мишустин Е. Н. Микробиология. М., 1994
8. Емцев В. Т. , Шильникова В. К. Микробиология. М., 1990
9. Заварзин Г. А., Переверзева Г. И. , Храмцов В. В., Микробиология, гигиена, санитария в животноводстве. М., 1985
10. Заварзин Г. А., Колотилова Н.Н. Введение в природоветческую миукробиологию. М., 2001
11. Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. М., 1987
12. Зенова Г. М., Степанов А. Л., Лихачев А. А. И др. Практикум по биологии почв. М., 2002
13. Определитель бактерий Берджи /Под. Ре. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. 9-е издание в 2 –х томах. Ь., 1997
14. Руководство к практическим занятиям по микробиологии/ Под ред. Н. С. Егорова. З-е издание. М., 1995
15. Руководчтво к практическим занятиям по микробиологии/Под ред. Егорова Н. С. 3-е изд. М., 1995
16. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. 5-е издание., М.,2004
17. Хатянович А. В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе. Л., 1991