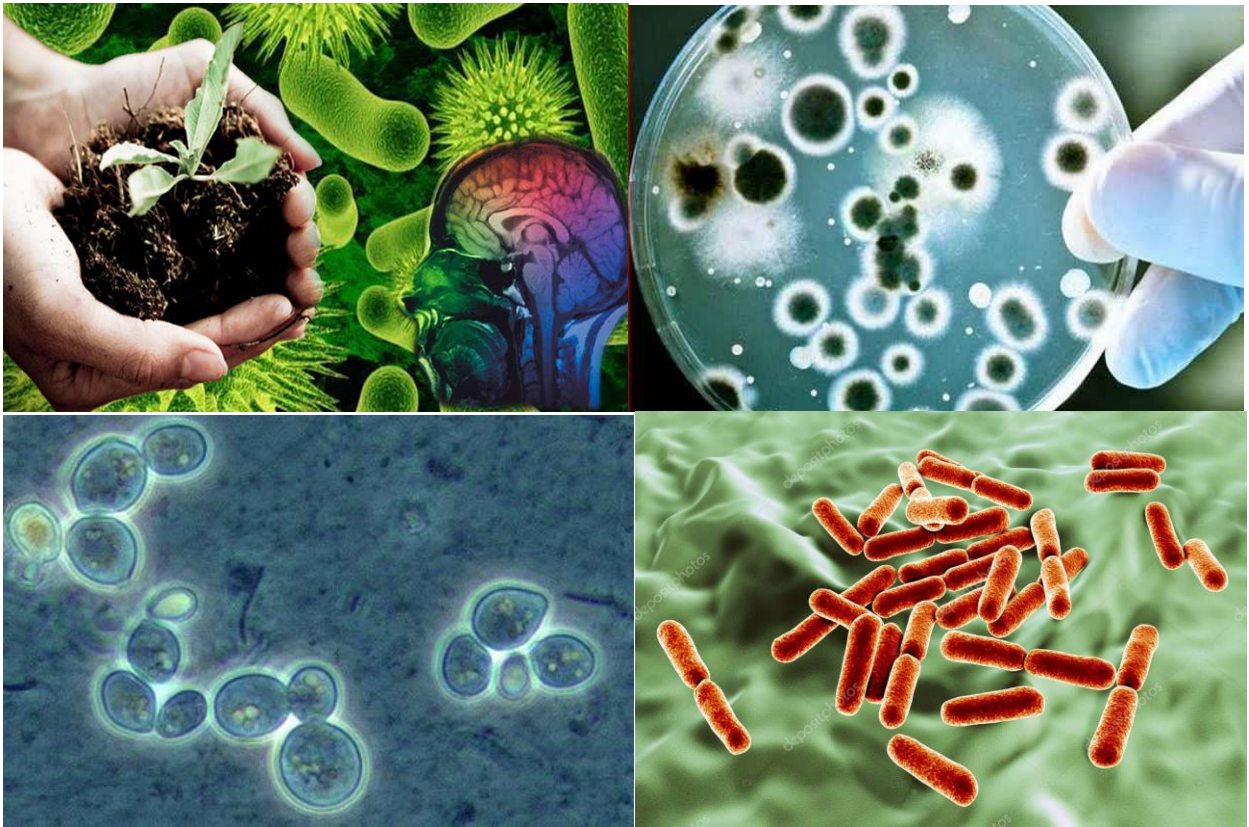


**Сыдыкбекова Р.К., Бержанова Р.Ж., Игнатова Л.В.,
Омирбекова А.А. Мукашева Т.Д.**

**МИКРООРГАНИЗМДЕР ЭКОЛОГИЯСЫ ПӘНІНЕН ОҚУ-
ӘДІСТЕМЕЛІК ҚҰРАЛ**



**Алматы
«Қазақ университеті»
2019**

УДК 576.80.85 (075.8)

Сыдыкбекова Р.К., Бержанова Р.Ж., Игнатова Л.В., Өмірбекова А.А. Мукашева Т.Д «Микроорганизмдер экологиясы» (зертханалық сабақтарға арналған оқу-әдістемелік құрал)

Рецензентер:

Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институтының "Өсімдіктер физиологиясы және биохимиясы" зертханасының бас ғылыми қызметкері, б.ғ.д., профессор А.А. Нуржанова

Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-нің биология және биотехнология факультетінің биотехнология кафедрасының профессоры, б.ғ.к. Турашева С.К.

«Микроорганизмдер экологиясы» оқу-әдістемелік құралы «5В050700 - Биотехнология» «5В070100 - Биотехнология» мамандығында білім алатын бакалавр бөлімінің студенттеріне оқытылатын «Микроорганизмдер экологиясы» пәні бойынша оқу бағдарламасына сай жазылғандықтан аталған бағыттарда білім алатын студенттер мен магистранттарға ұсынылады. Оқу-әдістемелік құралда микроорганизмдердің экологиясы туралы мәліметтер қамтылады. Микробтардың табиғи ортада дамуы, экстремальды жағдайларда тіршілік ету қабілеттіліктері бойынша және табиғаттағы микроорганизмдердің алуантүрлілігі мен таралуы, сонымен қатар олардың табиғаттағы белсенділіктерін және қоршаған ортаның әртүрлі факторларының әсерін зерттеу әдістері қарастырылады.

МАЗМҰНЫ

	бет
АЛҒЫ СӨЗ	5
Тақырып 1. Топырақтан микроорганизмдерді бөліп алу және санау. Таза культураларды бөліп алу	6
Зертханалық сабақ 1. Топырақ микрофлорасын зерттеу және ондағы микроорганизмдердің санын анықтау үшін қоректік орталар дайындау	8
Зертханалық сабақ 2. Микробиологиялық зерттеуге топырақ үлгісін таңдап алу	10
Зертханалық сабақ 3. Топырақтағы әртүрлі физиологиялық топтарға жататын микроорганизмдерді бөліп алу үшін элективті жағдай жасау	12
Зертханалық сабақ 4. Әртүрлі физиологиялық топтарға жататын микроорганизмдердің санын анықтау	15
Зертханалық сабақ 5. Бөліп алған культуралардың тазалығын тексеру	17
Зертханалық сабақ 6. Микроорганизмдерді идентификациялауға арналған белгілер	18
Зертханалық сабақ 7. Зерттелетін микроорганизм культураларын дифференциальды-диагностикалық орталарға егу	21
Зертханалық сабақ 8. Зерттелетін культуралардың культуралды, физиологиялық және биохимиялық қасиеттерін анықтау	22
Зертханалық сабақ 9. Бөліп алған культураларды идентификациялау	24
Тақырып 2. Микроорганизмдердің өсуі мен дамуына қоршаған ортаның әртүрлі факторларының әсері	25
Зертханалық сабақ 1. Микроорганизмдерге жоғарғы температураның әсері	27
Зертханалық сабақ 2. Ет-пептонды сорпа ортасында микроорганизмдерге әртүрлі рН мәнінің әсері	29

Зертханалық сабақ 3. Микроорганизмдерге ультракүлгін сәулелерінің әсерін зерттеу	30
Зертханалық сабақ 4. Ашытқылардың өсуін қоректік ортадағы осмостық қысымға байланысты өсуін зерттеу	30
Зертханалық сабақ 5. Микроорганизмдерге антибиотиктердің әсерін дискі-диффузиялы әдістер мен сұйылту әдістерін қолдану арқылы зерттеу	31
Зертханалық сабақ 6. <i>Escherichia coli</i> және <i>Bacillus subtilis</i> өсуіне пенициллин мен стрептомициннің әртүрлі концентрациясының әсері	34
Қорытынды	47
Әдебиеттер	48

АЛҒЫ СӨЗ

Экология – жаратылыстану ғылымдарының басқа бөлімдерімен салыстырғанда едәуір жаңа сала болып табылады. Кез-келген басқа ғылымдар сияқты экология өзінің даму барысында жіктелуге және арнайы салаларға бөлінді. Соның нәтижесінде ол пән аралық тармақталған ғылымның бір жүйесін құрады. Қазіргі кезде жалпы экология, биологиялық экология, геоэкологиялық, химиялық экология және т.б. болып бөлінеді. Соның ішінде биологиялық экологияға тірі организмдердің жеке топтарын негізделген өсімдіктер, жануарлар және микроорганизмдер экологиясы болып ажыратылады. Микроорганизмдер экологиясы пәнінің мақсаты табиғи ценоздарды және олардың құрам бөліктерін құрайтын – бактериялар, вирустар, микроскопиялық саңырауқұлақтар, балдырлар және қарапайымдарды зерттеу болып табылады. Микроорганизмдер экологиясы микроорганизмдердің биосферада, микробиоценоздардың сандық және сапалық сипаттау, микроорганизмдердің трофикалық тізбектегі алатын орнын және табиғаттағы заттар алмасуындағы ролін, микроорганизмдердің басқа жоғары сатыдағы организмдермен (өсімдіктер, жануарлар, адаммен) қарым-қатынасын және микроорганизмдерді практикалық экологияда қолдану жолдарын қарастырады. Сонымен қатар микроорганизмдердің экологиялық биотехнологияда атқаратын қызметтері алуантүрлі болуына байланысты маңызы зор. Осыған байланыста ұсынып отырған оқу-әдістемелік құралында микроорганизмдерді топырақтан бөліп алу және олардың таза дақылдарын бөліп алу, гетеротрофты, денитрифицирлеуші және басқа әртүрлі физиологиялық топтарға жататын микроорганизмдерің санын анықтау әдістері толық берілген. Оқу-әдістемелік құралда қоршаған ортадан бөліп алған микроорганизмдердің систематикалық жағдайын анықтауда маңыздылығы жоғары әртүрлі культуральды-морфологиялық, физиологиялық және биохимиялық қасиеттері зерттеу бойынша әдістер көрсетілген. Сонымен қатар, микроорганизмдерге қоршаған ортаның әртүрлі факторларының әсерін зерттеу бойынша әдістер көрсетілген. Әрбір тақырыптар тапсырмалар мен студенттердің алған білімдерін бағалау үшін тақырыпқа сай бақылау сұрақтары көрсетілген.

Оқу-әдістемелік құрал ҚР ЖОО «Микроорганизмдер экологиясы» пәнінің типтік оқу бағдарламасы бойынша білім алатын студенттерге арналған.

Оқу әдістемелік құралдың мақсаты:

- микроорганизмдердің маңызды қасиеттері мен олардың табиғи процестердегі маңызы туралы білім қалыптастыру;
- әртүрлі микробиологиялық зерттеу әдістерін қолдануды қарастырады.

Міндеттері:

- микроорганизмдердің өмірлік процестерінің ерекшеліктерін негіздеу, олардың функционалдық әртүрлілігін зерттеу, әртүрлі экологиялық факторлардың әрекеті кезінде метаболизм ерекшеліктері;

- әртүрлі микробтық қауымдастықтар, олардың топырақ ортасында өзара әрекеттесуін зерттеу.

ТАҚЫРЫП 1.

Топырақтан микроорганизмдердің бөліп алу және санау. Таза культураларды бөліп алу

Топырақты микробиологиялық зерттеу әдістеріне шолу.

Микроорганизмдер табиғатта кең таралған: топырақ, ауа, су объектілері, әртүрлі беттерде, адамдар мен жануарлар денесінде және т.б. Олар мұхит тереңдігінде де, Жер бетіндегі ондаған километр қашықтықта да кездеседі. Топырақ микроорганизмдердегі ең бай субстраттардың бірі болып табылады. Топырақта кездесетін көптеген процестер микроорганизмдердің өмірлік белсенділігіне, ең алдымен қоректік заттардың айналымына, жануарлар мен өсімдік қалдықтарының минералдануына және азоттың тиісті формалары бар топырақты байытуға байланысты. Топырақ құнарлылығы микроорганизмдердің белсенділігіне байланысты. Топырақ микроорганизмдері жалпы экологиялық жүйеде міндетті байланыстырушы болып табылады. Демек, табиғатта микроорганизмдердің рөлін, топырақты мекендейтін микроорганизмдер санының, оның ішінде жеке физиологиялық топтардың өкілдерін және олардың жүзеге асыратын процестерін білу өте маңызды

Топырақ микрофлорасын зерттеу бірнеше кезеңде жүргізіледі. Бірінші кезеңде топырақтағы микроорганизмдердің жалпы саны әртүрлі әдістермен анықталады: микроскоптың астында тікелей клеткаларды арнайы есептеу камераларында, клеткалар фиксирленіп боялған препараттарда және мембрана сүзгілерінде тікелей санау; микроорганизмдердің тығыз қоректік ортада (Кох әдісі) және сұйық қоректік ортада (он еселік сұйылту әдісі) егу арқылы бөліп алу және санын анықтау.

Жалпыға ортақ тікелей микроскоптаудың қарапайым әдістерінің бірі - бұл Разумов әдісі, оның мәні мынада, мысалы судағы бактерияларды ұстап қалатын арнайы мембраналық сүзгілер арқылы микроорганизмдердің санын анықтау. Фильтрлерді карболдық эритрозинмен бояйды да микроскоптың көмегімен арнайы санақ камерасында, немесе микроскоптың көру аймағында ең үлкен ұлғайтқышта санайды. Санау бактериялардың клетка пішіндері бойынша жүргізіледі: таяқшалар, коккалар, ашытқылар, жіпше пішінділер. Мембраналық сүзгінің ауданын, ол арқылы өткізілген су мөлшерін біле отырып, барлық формаларды қосып, 1 мл судың микроорганизмдерінің жалпы санын есептейді немесе микробтық биомассаның басқа маңызды көрсеткішін анықтау үшін қажетті нысандар бойынша есеп жүргізеді. Микробтық биомассаны анықтағанда, шартты түрде бактериялық жасушаның нақты үлес салмағы 1. Таяқша және басқа да пішінді клеткалардың санын біле отырып, клетканың шамасын өлшей отырып, әрбір жасушаның көлемін есептейді. Сондай-ақ, клеткалардың көлемін де мембраналық сүзгілерде окуляр - және объект-микромметрлер

көмегімен анықтайды. Клеткалардың әртүрлі пішіндерінің көлемін есептеп, олардың салмағын 1-ге тең тығыздықта анықтайды.

Микробиологиялық нұсқаулықтарда әртүрлі клеткалардың пішіндердің көлемін белгілі бір мөлшерде анықтау және әрбір морфологиялық топ салмағын есептеу үшін кестелер бар, содан кейін бактериялардың жалпы биомассасын 1 мл, 1 литр су немесе 1 г топыраққа шаққанда есептейді.

Бактериялардың көбею жылдамдығы немесе генерация уақыты клеткалардың санын екі есе көбейту үшін қажетті маңызды көрсеткіш. Генерация уақыты бойынша субстраттардағы микроорганизмдердің көбею жылдамдығын анықтауға болады: генерация уақыты аз болған сайын, бактериялар жылдамырақ көбейеді және су мен топырақ субстратында қолайлы жағдайлар жасалады. Анықтаулар бактериялардың тікелей саналуымен жүзеге асырылады, содан кейін субстрат бірдей жағдайларда тұйық контейнерге орналастырылады және белгілі бір уақыттан кейін бактериялардың санын есептеп, генерация уақытын анықтайды. Процестер баяу болса, әр түрлі болуы мүмкін - бірнеше сағаттан бірнеше аптаға дейін. Зертханалық жағдайда генерациялау уақыты 30 минутқа дейін болуы мүмкін.

Микробиологиялық маңызды көрсеткіштердің бірі - субстраттардағы гетеротрофты микроорганизмдердің саны, бұл гетеротрофты микроорганизмдердің жалпы санына қосылады. Гетеротрофты микроорганизмдер органикалық тығыз қоректік ортада отырғызу арқылы саналады. Гетеротрофты бактериялардың жалпы санын МПА ортасында, сусло-агар ортасында саңырауқұлақтар саны, крахмал-аммиак агар ортасында - актиномицеттер, МПА және сусло - агар орталарының қоспасында - спора түзуші микроорганизмдерді анықтауға болады.

Тығыз қоректік ортада егу әдісі микроорганизмдердің белсенді түрлерін есептеуге, басым түрлерді анықтауға, таза культураларды бөліп алуға және олардың қасиеттерін зерттеуге мүмкіндік береді. Ал микроскоп астында тікелей санау әдісі тек субстраттағы микроорганизмдер санын анықтауға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, микроскоптың көмегімен ғана микроорганизмдерді бақылау берілген субстратта олардың қандай процесстерді жүргізетінін айтуға мүмкіндік бермейді. Топырақ микрофлорасын зерттеудің келесі кезеңі микроорганизмдердің әр түрлі физиологиялық топтарын анықтауды қарастырады.

Топтар арасында маңызды физиологиялық айырмашылықтар болуына байланысты, топырақ микроорганизмдерінің әртүрлілігін бір ортада анықтау мүмкін емес. Микроорганизмдердің жекелеген топтарының өкілдерін бөліп алу және оларды санаудың негізінде элективті жағдай жасау арқылы жинақтаушы культураларды алу жатыр.

Жинақтаушы культура деп микроорганизмдердің бір тобы немесе тіпті микроорганизмдердің бір түрінің өкілдері басым культураны айтады.

Элективті жағдай микроорганизмдердің бір тобы немесе микроорганизмдер бір түріне қолайлы болуды айтады. Элективті жағдайлар жасау кезінде микроорганизмдердің физиологиясы мен метаболизмінің ерекшеліктерін - олардың тамақ көздеріне, аэрацияға, температураға, қоршаған орта қышқылдарына қойылатын талаптарын сонымен қоса спора түзу қабілеті және т.б. ескеру қажет. Бұл жағдайда Кох әдісі және он еселік сұйылту немесе титр әдісі қолданылады. Титр - бұл микроорганизмдер тобы немесе осы физиологиялық процесс көрініс беретін субстраттың ең аз мөлшері.

Бұл әдістер бөліп алған субстраттағы микроорганизмдердің рөлі туралы көрініс береді. Микроорганизмдердің метаболизм өнімдерінің жиналуы бойынша микробиологиялық процестердің қарқындылығын бағалауға болады. Мысалы, нитраттардың түзілуінен нитрификация процесінің қарқындылығы, аммиакты бөлінуі бойынша – белоктың ыдырау жылдамдығына бағаланады. Сонымен қатар, таза химиялық анықтамалар микробиологиялық процестердің қарқындылығы туралы жанама көріністер береді.

Микроорганизмдердің таза культураны бөліп алу, олардың қасиеттерін зерттеу және түрлерді анықтау топырақ микрофлорасын зерттеудің соңғы кезеңі болып табылады.

Таза микробтық культура деп бір клеткадан алынған культураны айтады. Әдетте, таза культураны бөліп алуда жинақтаушы культураның алдында болады, яғни қажетті қасиеттері бар микроорганизмдермен байытылған культура пайда болады.

Таза культураларды алудың бірнеше әдістері бар. Олардың барлығы популяциядан бір ғана клетканы іріктеуге негізделген. Көбінесе Кох әдісі жиі пайдаланылады, оның мәні жеке клетканың дамуының нәтижесі деп саналатын жеке колониядан таза культура алу болып табылады. Жеке колонияларды бөліп алу үшін, клетка суспензиясы тығыз қоректік орта бетіне егіледі. Бір клеткадан таза культура алу микроманипуляторды немесе микроселектордың көмегімен тамшы әдісін қолдана отырып жүзеге асады. Бөліп алған микроорганизмнің тазалығы міндетті түрде тексерілуі керек. Бұл бір мезгілде бірнеше тәсілмен жүзеге асырылады: қиғаш ағарда штрих бойымен өсу біркелкі сипатта болғандығын көзбен қарау, микроскопиялық - микроскоптың ең үлкен үлкейткішпен қарағанда клеткалардың морфологиясы бекітілген препаратта біркелкі болу керек; қолайлы өсу ортасында өсірілген колониялардың біртектілігі бойынша бірнеше қоректік ортаға егу. Егу жеке колонияларды бөліп алуды ескере отырып жүзеге асырылады.

Көптеген микроорганизмдердің түрлерін анықтау өте қиын зерттеу міндеті болады. Ол микроорганизмдердің бірқатар ерекшеліктерін - клеткалардың морфологиясын, әртүрлі қоректік орталардағы өсу сипатын, белгілі бір қосылыстарды қолдану мүмкіндігін, температураға, ортаның

қышқылдығына, оттегінің мөлшеріне тәуелділігін зерттеуді қамтиды. Сонымен қатар, микробтардың түрін анықтау үшін метаболиттік өнімдерді, серологиялық қасиеттерді, жасушаның нуклеотидтік құрамын және бірқатар басқа белгілерді білу қажет. Осыған байланысты бұл бөлімде микроорганизмдерді түрге дейін анықтауды қажет етпейді. Барлық зерттелінетін белгілер мен қасиеттер бөліп алған культураларды тұқымдастар мен туысқа бөлінуін анықтайды. Микроорганизмдердің таксономикалық жағдайын арнайы анықтағыштардың көмегімен анықталады.

Нұсқаулықтың осы бөлімінің негізгі міндеттері:

1. Әртүрлі қоректік ортада егу арқылы топырақтың гетеротрофты микроорганизмдерді бөліп алу және санын анықтау (ЕПА):

а. Ет-пептонды ағарағы бактериялардың жалпы санын санау;
ә. Саңырауқұлақтардың санын сусло-агар немесе Сабуро ортасында анықтау;

б. спора түзуіш бактерияларды МПА және СА орталарын бірге 1:1 қатысындай етіп араластырған қоспасында спора түзетін бактерияларды санау;

в. актиномицеттерді крахмал-аммиак агарында КАА санау;

д. Денитрификаторлардың физиологиялық тобын сұйылтылған Гильтей ортасында он еселік сұйылту әдісімен анықтау;

е. Эшби ортасында топырақтың топырақтарын ластау арқылы аэробты азот қондырғыларын есепке алу;

ж. Виноградский ортасында аэробты целлюлоза ыдыратушы микроорганизмдерді анықтау.

2. Микроорганизмдердің таза культураларын бөліп алу, олардың қасиеттерін зерттеу және идентификациялау:

а. МА және МПА және СА орталарының қоспаларына егу кезінде МО-ға егу барысында Кох әдісімен таза культураті бөліп алу;

ә. іріктеп алған культуратің тазалығын тексеру;

б. Бөліп алған микроорганизмдердің дақылдарының морфологиялық, культуралдық және физиологиялық-биохимиялық белгілерін зерттеу;

в. жекелеген микроорганизмдер культурасының систематикалық жағдайын анықтау.

Зертханалық сабақ 1.

Топырақ микрофлорасын анықтау және сандық бағалау үшін қоректік орталарды дайындау

Қоректік орталар құрамында көміртегі, азот, күкірт, фосфор, микроэлементтер, өсу факторлары сияқты заттардың алмасуы үшін қажетті барлық компоненттер болуы керек. Қоректік орта жасау кезінде микробтардың метаболизмінің ерекшеліктерін және зерттеудің нақты мақсаттарын ескеру қажет. Ортадағы рН қышқылдықтың белсенділігі өсуі үшін оңтайлы болып сәйкес келуі маңызды, әйтпесе қандайда толыққанды орта болмасын оның құрамындағы компоненттері микробтарға қол жетімсіз болуы мүмкін. Сондықтан ортаны дайындаған кезде рН мәнін тексеріп, қажет болғанда қышқылдар, сілтілер немесе тұздар ерітіндісімен қажетті мәнге жеткізіңіз. Гетеротрофты бактерияларды санын анықтау үшін МПА табиғи қоректік ортасы пайдаланылады, ол жеңіл сіңірілетін полипептидтері бар қышқылды ет гидролизатында дайындалады. Гидролизат көлемі бойынша бір бөлік судың бес бөлігімен араласып, 30 % сілтімен 7,0 рН дейін бейтараптандырылады. Бейтарап ет суына 1% пептон, 0,5% тұз және 2% агар агар қосылады. Дайын болған ортаны колбаларға құйып 0, 1 МПа-да 30 минут залалсыздандырылған.

Саңырауқұлақтарды анықтау және сандық бағалау үшін, сапрофиттерге қажетті барлық компоненттері бар суло-агар ортасы пайдаланылады. Суслоны - дәндегі барлық қоректік заттарымен бірге сумен экстракциялап крахмалдың мальтозаға дейінгі гидролизінде алынған өндірілген арпа дәнінен езіндісінен алынады. Суслоның қант құрамы *Balling* дәрежесінде өлшенеді, саңырауқұлақтар үшін 4 ° Балды алыңыз. Суслоға 2% агар агар қосып, ерітіп, колбаларға құйып, 0,05 МПа 30 минутта залалсыздандырылған.

Аэробты спора түзетін бактерияларды бөліп алу ЕПА және СА ортасының 1:1 қатысындағы қоспасы құйылған Петри табақшаларында өсіру арқылы анықтайды.

Азоттың минералдық түрлерін қолданатын актиномицеттерді крахмал аммиакты агар КАА ортасында бөліп алады. Қоректік ортада болатын құрам бөліктер 1 л су көлемінде г мөлшерінде болады: ерігіш крахмал - 10, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; MgSO_4 – 1,0; NaCl – 1,0; CaCO_3 - 3,0; агар-агар – 20,0. Алдымен тұздарды ерітіп, борды қосады, содан кейін ортаның бөлігі құйып алады да оның үстіне крахмалды салып ерітеді. Ортаның қалған бөлігін қайнағанға дейін ысытады, содан кейін оған крахмал қосылған ортаның бөлігін үздіксіз араластыра отырып қосады. Осыдан кейін 2 % агар салады да 0, 1 МПа-ға 30 минут залалсыздандырады.

Денитрификаторлардың физиологиялық тобын анықтау және санау үшін, Гильтай сұйық синтетикалық ортасын дайындайды. Бұл денитрификаторларға арналған элективті орта. Осы ортадағы нитратты денитрификаторлар энергетикалық процестердегі соңғы электрондардың акцепторы ретінде

пайдаланады.. қоректік ортаны үлкен пробиркаларға биік қылып құю арқылы анаэробты жағдай жасайды. Гильтай ортасын 1 литр құбыр суында мынадай құрамда дайындайды: үш алмастырғышты натрий немесе калий цитраты – 5,0; KNO_3 -2,0; аспарагин -1,0; KH_2PO_4 -2,0; MgSO_4 -2,0; CaCl_2 -0,2; FeCl_3 ; FeCl_3 – өте аз мөлшерде (следы). Ортаның рН мәнін бромтимолды көк индикаторын қолдана отырып тексереді, қажет болған жағдайда құрғақ содамен ортаның рН 6,8 – 7,2 жеткізеді. Бейтарап ортада индикатор жапырақ түстес жасыл, қышқылды ортада - сары, сілтілі ортада – көк түсті болады. Ортаны пробиркаларға биіктігіне шаққанда 2/3 бөлігіне дейін құяды да 0,05 МПа 30 минут аралығында залалсыздандырады. Әр студентке 10 пробиркадағы Гильтай ортасы керек.

Аэробты азотты түзушілерді анықтау келесі құрамдағы Эшби тығыз ортасында 1 л суға шаққандағы жүзеге асырылады, 1 литр суға шаққанда: K_2HPO_4 - 0,2; MgSO_4 - 0,2; NaCl -0,2; K_2SO_4 -0,1; CaCO_3 -5,0; маннит -20,0; агар - 20,0. Дайын болған ортаны 0,1 МПа 30 мин залалсыздандырады. Мұндағы элективтілік жағдай қоректік ортаның құрамында азот көзін алып тастауына байланысты болады.

Аэробты целлюлоза ыдыратушы микроорганизмдерді анықтауды келесі құрамдағы Виноградский ортасында өсіру арқылы анықтайды, 1 л суға шаққанда: KH_2PO_4 - 1, 0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,0; MgSO_4 - 0,5; NaCl -0,5; агар- 20,0. Дайын болған ортаны 0,1 МПа 30 мин залалсыздандырады. Қоректік ортада көміртегі көзі жоқ болғандықтан микрооаганизмдер целлюлозаны сүзгі қағазы түрінде көміртегінің көзін пайдаланады. Ол үшін тығыз қоректік ортаның бетіне микроорганизмдерді өсірген соң бірден үстінен сүзгі қағазын салады.

1- зертханалық сабаққа тапсырма

1. Қоректік ортаны дайындап колбалар мен пробиркаларға құяды және залалсыздандырады, ЕПА ортасын - 250 және 500 мл колбалар; СА ортасын - 250 және 500 мл колбаларда; КАА ортасын - 500 мл; Эшби ортасы - 500 мл, Виноградский ортасын - 500 мл колбаларда; Гильтай ортасы - әрбір студентке арналған 10 пробирка.

2. Қажетті ыдыстар мен құрал-жабдықтарды дайындау: Петри табақшаларының диаметріне сәйкес сүзгілер - 2, 50 мл су құйылған колбалар, 10 мл су құйылған 5 пробиркалар, 15 - Петри табақшасы, келі мен келсап – 1, мл 1-2 мл пипеткалар, Дриагальский шпательдері – 1,

3. Қажетті материалдар: Петри табақшасы, пипеткалар, Дриагальский шпательдері, пробиркалар, 0,1 л колбалар, өлшегіш таразылар, фарфор шпательдер, электр плиталары, су моншасы, пробиркаларға арналған штативтер, бромтимол көгі және эмбебап индикаторлар, 30% сілті ерітіндісі, ыдыс-аяқты орауға арналған қағаз.

Зертханалық сабақ 2.

Микробиологиялық зерттеуге арналған топырақтың үлгілерін алу.

Топырақтағы микрофлораны зерттеу үшін ережелерге сәйкес алынатын топырақ үлгілерін стерильді ыдыстарға салып, талдау жүргізгенге дейін тоңазытқышта сақтау қажет. Топырақ үлгілерімен жұмыс жасауда да бөгде микрофлора еніп кетпес үшін стерильділік ережелерін қатаң сақтау керек. Микробиологиялық зерттеуге алынатын топырақ келесі өңдеулерден өтуі керек: құрғақ топырақты стерильді келіге салады да келсаппен мұқият майдалайды.

Майдаланған топырақтан 5 г алып, оны спирт шамының жалынында 50 мл стерильді су құйылған колбаға салады да топырақ бөліктерінде жабысып тұрған микроб клеткаларының десорбциялануы үшін 5 минут шайқағышта немесе ақырын колбаны қолмен шайқап араластырады. Содан кейін топырақ суспензиясын 30 минуттай топырақтың ірі бөліктері төменге түсі үшін тыныштық жағдайға қояды да он еселік сұйылту жасайды. Бұнда зерттелетін материалдың бастапқы суспензиясында 10 есе сұйытылғаны 5 г топырақты 50 мл суға сұйылтылғаны да есепке алынады. Микроорганизмдердің санына қарай егу үшін сұйылтулардың сериясын пайдаланыды. Бір тәжірибені жүргізу барысында қате жіберу мүмкіндігін азайту үшін тұрақты коэффициенті сұйылтуды қолданады. Ол үшін бастапқы топырақ суспензиясынан 9 мл ден стерильді құйылған суы бар пробиркаларға стерильді пипеткамен 1 мл құяды. Егер зерттелетін материал бұның алдында 10 есе сұйылтылса онда $1/10^2$ сұйылту алынады. Бұл сұйылтудың суспензиясын мұқият пипеткамен араластырып алып, қайтадан құю арқылы әбден араластырады, осы процедураны 3-5 рет қайталайды. Содан соң осы пипеткамен 1 мл алып келесі 9 мл суы бар пробиркаға құяды. Бұл $1/10^3$ сұйылту болады. Осыған ұқсас келесі $1/10^4$, $1/10^5$ және $1/10^6$ сұйылтуларын дайындайды. Сұйылту деңгейі топырақ үлгілерінде мүмкіндігінше болатын микроорганизмдердің болатын санына байланысты алынады. Сұйылту саны көп болған сайын бастапқы субстраттағы микроорганизмдердің мөлшері көп болады.

Гетеротрофты бактериялардың санын МПА ортасына егу арқылы анықтау

Әдістің мәні зерттелетін суспензияның белгілі бір көлемін МПА ортасы құйылған Петри табақшаларына егуден және одан кейін өсіп шыққан колонияларды санаудан тұрады. Әрбір өсіп шыққан колония - бұл бір клетканың көбею нәтижесі екендігін ескеру қажет. Бұл әдіс тек қана топырақтағы микроорганизмдер саны анықтау ғана емес, сондай-ақ колония морфологиясы бойынша алуантүрлілігін бағалауға, топырақтағы микроорганизмдердің басым түрлерін анықтауға мүмкіндік береді.

Залалсыздандырылған Петри табақшаларына 20-30 мл су моншасында ерітілген ортаны құю керек. Қоректік орта құйылған табақшаларды горизонтальді бетінде ағардың әбден қатқанына дейін қалдырылады, содан кейін қоректік орта құйылған табақшаларды термостатта конденсатты кетіру үшін 40-

50 °С температурада құрғатады. Көп жағдайда ортасы бар табақшаларды 2-3 күн бойы 30 °С температурада ұстап, ортаны кептіріп, оның стерилділігін тексереді. Гетеротрофты микроорганизмдердің жалпы санын анықтау үшін МПА ортасына егу $1/10^4$ сұйылтудан алып 3 табақшаға егу жүргізіледі. Стерильді пипеткамен тиісті сұйылтудан алып (0,05 мл) петри табақшасындағы агарлы қоректік ортанының бетіне құяды. Сосын мұқият стерильді шпательмен орта бетіне жаймалап егеді. Барлық іс-шаралар стерилділік жағдайда жүргізіледі. Егу жүргізілген Петри табақшалары қақпағы төмен қаратылып термостатта 30 ° С температурада 3-4 күнге қалдырады.

Топырақтағы саңырауқұлақтардың санын Сабуро немесе сусло-агарлы ортасына егу арқылы анықтау.

Топырақта саңырауқұлақтардың әртүрлі түрлері спора түрінде де, физиологиялық белсенді мицелий түрінде де өте көп мөлшерде болады. Олардың көбісі топырақтың қалыптасу мен органикалық заттардың минералдану процестерінде маңызды рөл атқаратын сапрофиттер болып табылады. Топырақта саңырауқұлақтардың таралуы және олардың жоғары белсенділігі басқа микроорганизмдермен салыстырғанда қоршаған орта факторларына өте төзімділігіне байланысты болады. Олар кез-келген қышқылдық жағдайға жақсы төзімділік көрсетеді, көпшілігі көптеген бактериялар мен актиномицеттер тіршілік ете алмайтын топырақтағы рН мәні 4-тен төмен болғанда да өсуге қабілетті.

Топырақтағы саңырауқұлақтардың санын анықтау ортаның рН мәні 4,0-40,5 дейін сүт қышқылымен қышқылдандырылған сусло агарлы немесе сабуро ортасында егу арқылы жүзеге асырылады. осындай қышқылдықтағы ортада көптеген бактериялар мен актиномицеттер өспейтіндіктен, мицелиалды саңырауқұлақтар мен ашытқыларды өсіп-дамуына мүмкіндік береді. Егу жүргізу алдында қоректік орталарды ерітіп алып, концентрлі сүт қышқылымен 0,4 % көлемде стерильді пипеткамен алып қосады. Ортаны мұқият араластырады. Егуді үш рет сұйытылғаннан кейін $1/10^3$ пробиркасынан 1 мл ден екі стерильді Петри табақшасына құяды, оның үстінен стерильді пипеткамен 40 мл-ге дейін салқындатылған СА ортасын құяды, араластырады да табақшаларды 30 ° С температурада термостатта 3 - 4 күнге қалдырады.

Денитрифицирлеуші микроорганизмдерді он еселік сұйылту әдісі арқылы анықтау.

Денитрификация – нитраттардың молекулалық азотқа дейін тотықсыздандыратын микробиологиялық процесс. Денитрификаторлардың физиологиялық топтары табиғатта кең таралған, оған әртүрлі туыстардың өкілдері кіреді. Олар хемоорганотрофтар, факультативті анаэробтар.

Денитрификаторларды бөліп алу мен олардың санын анықтау зерттелетін топырақты клетканың биосинтезіне қажетті көміртегінің, нитраттардың және

басқа заттардың көзі бар ортаға егу арқылы жүзеге асырады. Нитрат энергетикалық алмасуда тек электрон доноры ретінде қолданатындықтан конструктивті мақсат үшін азоттың көзі болу қажет. Культураға ауаның кірмеуі үшін қоректік ортаны пробиркаларға биік қабат қылып құяды.

Денитрификаторлардың санын он еселік сұйылту әдісі арқылы анықтайды. Әдістің мәні мынада. Сұйық қоректік орталар құйылған пробиркаларға әртүрлі сұйылтулардан көлемі қатаң өлшенген зерттелетін суспензиялардан құяды. Инкубациялағаннан кейін өсудің бар немесе жоқ екендігін қарайды, нәтижелерді арнайы кестемен өңдейді және денитрификаторлардың санын 1 г бастапқы топыраққа есептейді.

Гильтай қоректік ортасына егу тәжірибеге өсуі барлық параллельді пробиркаларда болатындай, сондай-ақ параллельді пробиркалардың барлығында өсетін, сонымен қоса кейінгі сұйылтуларда параллельді пробиркалардың бірде бірінде өспейтіндей етіп өсіру есебінде бірнеше сұйылтудан жүргізеді. Бұны көздеу мүмкін болмаған кезде, өсіруді бірнеше сұйылтудан егу арқылы жасалады. Егер бірінші тәжірибеде даму шекарасын анықтау мүмкін болмаса, онда қайтадан жаңа сұйылту жасайды да қайталап егу жүргізеді. Егуді мына сұйылтулардан - $1/10^4$, $1/10^5$, $1/10^6$ үш қайталаудан (әр сұйылтудан 3 пробирка) жасайды. Суспензияны пробирканың түбіне құяды. Денитрификаторлардың өсуін бағалау үшін бір пробиркадағы ортаны стерильді бақылау үлгісі ретінде қалдырады. Пробиркаларға егу материалын салған соң стерильді ортаны пробирканың аузына 4-5 см жетпейтіндей етіп құяды. Өсіруді $30\text{ }^\circ\text{C}$ температурада 3-4 тәулік жүргізеді.

2-зертханалық сабаққа тапсырма.

1) Қоректік орталарды (ЕПА, СА, КАА, Эшби, Виноградский) еріту. Стерилділік ережелерін сақтай отырып, 250 мл ЕПА және СА құйып, оны 0,4% сүт қышқылымен қышқылдандырады.

2) Қоректік орталарды Петри табақшаларына (СА-нан басқаларын) құю.

3) Гетеротрофты бактерияларды, саңырауқұлақтар мен денитрификаторларды анықтау және сандық есепке алу үшін қоректік ортаға егу және микробиологиялық зерттеу үшін топырақ үлгісін алу әдістемесін дәптерге жазу.

4) ЕПА ортасы құйылған Петри табақшаларын жиналған конденсатты алу үшін $40\text{--}50\text{ }^\circ\text{C}$ температурада кептіру шкафында құрғату.

5) топырақтың суспензиясының ерітіндісін дайындаңыз және ЕПА (беттік) СА (тереңдік әдіспен), Гильтай ортасы бар пробиркаларға егу жасау.

6) Пробиркалар мен табақшаларды термостатқа $30\text{ }^\circ\text{C}$ температурада қою.

7) стерильді қоректік орталар құйылған Петри табақшаларын келесі сабаққа дейін бокста қалдыру қажет.

8) Стерилизацияға 50 мл су құйылған колбаларды (1), 9 мл су құйылған пробиркаларды (5), шпателдер (2), келі мен келсап (1), 1-2 мл (5) пипеткалар.

9) Тоңазытқыштан топырақ үлгілерін алу қажет.

Қажетті материалдар: стерильді қоректік орталар, ыдыстар, топырақ үлгілері, спирт, мақта, скальпель, спирт шамдары, пробиркаларға арналған штативтер, су моншасы, салмағы бар таразылар, электр плиталары.

Зертханалық сабақ 3.

Элективті жағдайлар жасау арқылы топырақ микроорганизмдерінің әртүрлі физиологиялық топтарын бөліп алу.

Органикалық азот қосылыстарын минерализациялауда үлкен рөл атқаратын спорт түрлерінің, әсіресе аэробты спора түзетін бактериялардың (*Bacillus* туысы) қарқынды дамуы топырақта микробиологиялық процестердің қарқындылығын көрсетеді.

Бактериялардың эндоспоралары – вегетативті клеткалардың өсуін тежелуін, қолайсыз әсерлерге төзімді, тыныштықтық күйдегі клеткалардың түрі. Барлық гетеротрофтылардың споралы және спора түзбейтін болып жіктелінуіне негіз болып табылады.

Материалды қоректік орталарға егу алдында бір реттік қыздыру (пастеризация) барлық вегетативті клеткаларды өлтіреді, ал споралар тіршілікке қабілетті күйінде қалады және спора түзуші бактериялардың саны ары қарай қоректік орталарға егу жүргізілгенде анықталады. Пастеризацияның ұзақтығы мен температура деңгейі материалдың термиялық өңдеуге төзімділігін, оның микроорганизмдермен ластануының болжамды деңгейін және зерттеу мақсатын анықтайды

Аэробты спора түзуші бактерияларды санын анықтау үшін ЕПА және СА (1:1) қоспасында (ЕПА+СА) суспензияның $1/10^3$ сұйылтуынан алып алдын ала 80°C 10 минут ішінде пастеризациялайды, яғни қыздырып алып, 0,05 мл ден пипеткамен алып 2 Петри табақшасының бетіне егу жүргізеді. Содан кейін 30°C температурада 3-4 күн аралығында өсіреді.

Органикалық заттардың аз ғана мөлшері бар іздері, актиномицеттер, бейорганикалық азот көздерін қолданатын гетеротрофдар бар жерде бар. Осы микроорганизмдер тобын анықтау үшін аммоний крахмалының аммиак (КАА) қолданылады. Егіс $1/10^3$ разбавлениядан 2 петри ыдысқа үстірт түрде жүргізіледі. 7-10 күн ішінде $25-28^\circ\text{C}$ температурасында инкубацияланған.

Көптеген топырақ микроорганизмдері атмосферадағы азотты фиксирлеуге қабілетті. Аэробты еркін тіршілік ететін азотфиксаторлардан *Azotobacter* туысының өкілдері топырақты байланыстырылған азотпен байытуда маңызы зор.

Азотобактерді бөлу және сандық есепке алу үшін көптеген әдістер мен қоректік орталар бар. Кең таралған әдістердің бірі Эшби тығыз ортада топырақ түйіршіктерін өсіру әдісі. Қоректік ортаның бетіне топырақтың 50 түйіршігін трафареті (2 табақшаға) бойынша орналастырылады. Ол үшін екі заттық шыныны алады да, оларды фламбирлеу арқылы стерильдейді, бір заттық шыныға топырақ

салады, екіншісіне тазартылған су құйылады. Бактериялогиялық ілмектерді алдын ала от жалынында сәл ұстап, екінші заттық шыныдағы сумен ылғалдап алып, диаметрі 1-2 мм топырақ түйіршіктерін алады да қоректік ортаның бетіне орналастырады. Табақшаларды ылғалды камераға салып, 28-30°C термостатқа қояды.

Клетчатканы ыдырататын микроорганизмдер көміртегі айналымында маңызды рөл атқарады. Бұл процесс аэробты және анаэробты жағдайларда, ортаның сілтілі және қышқыл реакциясында, әртүрлі ылғалдылықта және температурада жүреді. Аэробтық жағдайларда целлюлозаны миксобактериялар, кейбір споралы және споралы емес бактериялар, саңырауқұлақтар мен актиномицеттер ыдыратады. Жетекші рөлді шырышты, шашыраңқы ұштар, түссіз, сары, қызғылт сары немесе қызыл түрінде талшық бар материалдардың бетінде өсетін миксобактериялар алады.

Гетеротрофты бактериялардың, саңырауқұлақтардың және денитрификаторлардың санын анықтау.

Өсіру мерзімі аяқталғаннан кейін ЕПА-дан табақшаларда өскен гетеротрофтардың колонияларының саны есептеледі. Колониялар табақшаларды ашпай санайды. Ыңғайлы болу үшін есептелген колонияны табақшаның түбінің сыртқы жағынан маркермен белгілейді. Ең жақсы сұйылтудан өсіру 50-ден 150-ге дейін колонияға өсіп шыққан табақшаларды алады. Колониялардың орташа санын есептеп, 1 г топыраққа қайта есептейді:

$$a \times 20 \times 10000 = 1 \text{ г топырақтағы бактериялардың саны}$$

мұндағы: А-колониялардың орташа саны, 20 - 1 мл суспензияға қайта есептеу, 10000-өсіру.

Таза дақылдарды одан әрі бөліп алу үшін осы топырақта басым (немесе неғұрлым ерекше қызығушылық туғызатын) колонияны таңдау, оны сипаттау және суреттеу қажет.

Микроорганизмдер тығыз ортаның бетінде дами отырып, осы түрге тән колония құрайды, олардың сипаттамасы идентификациялау кезінде ескеріледі.

Келесі белгілер бойынша сипаттайды:

колония пішіні - дөңгелек, амеба тәрізді, ризоидты, дұрыс емес және т. б.;

колония өлшемдері - диаметрі мм, егер колонияның өлшемдері 1 мм аспаса, онда мұндай колониялар нүктелік деп аталады;

оптикалық қасиеттері - мөлдір, мөлдір емес, жартылай мөлдір, жылтыр, күңгірт, флуоресцирленетін;

түсі - колонияның түсі мен ортаға пигменттің бөлінуі;

беті - тегіс, кедір-бұдырлы, бүктелген, қатпарлы;

профилі - жалпақ, дөңес, кратер тәрізді, агарға еніп өскен және т. б.;

колония шеті - тегіс, толқынды, жалпақ, ризоидты және т. б.;

колонияның құрылымы - біртекті, ұсақ немесе ірі түйіршікті, ағысты;
консистенция - майлы, қамыр тәрізді, тұтқыр, борпылдақ;
эмульгирлеу қабілеті - суда біркелкі немесе түйіршікті суспензия, суда әлсіз немесе мүлдем суспензияланбайды.

Колониялардың жиегі мен құрылымын микроскоптың кіші ұлғайтқышында, колонияның консистенциясын - оның бетіне бактериялогиялық ілмектердің жанасуымен анықтайды.

Саңырауқұлақтардың санын анықтау инкубациядан кейін СА ортасы құйылған Петри табақшаларындағы өскен колонияларды есептей отырып жүргізеді. табақшалардағы саңырауқұлақтардың орташа санын есептейді және олардың 1 г топырақтағы санын анықтайды.

$$a \times 1000 = 1 \text{ г топырақтағы саңырауқұлақтар саны,}$$

мұнда: А-саңырауқұлақтардың орташа саны, 1000 - өсіру.

Топырақта ең кең таралған мицелиалды саңырауқұлақтар, үш классқа - фикомицет, аскомицет және жетілмеген саңырауқұлақтар жатады. Сусло-агарда немесе Сабуро ортасында олар жұмсақ, субстратқа еніп өспейтін, дөңгелек немесе ортаның бетінде кең таралатын, үлпілдек, жіп тәрізді, өрмектәрізді мақтаға ұқсас немесе борпылдақ колонияларды құрайды. Көптеген түрлердің вегетативті мицелийі боялған емес, тек споралы мицелийлері ғана пигменттелген, сондықтанда жас колониялар ақ немесе сұр түсті болып келеді. Колонияның споралы мүшелерінің дамуына қарай жасыл, сары, қоңыр, қызыл, қызғылт немесе қара түсті болады. Кейбір саңырауқұлақтарда пигменттер ортаға бөлінеді. Саңырауқұлақтардың басым және қызығушылық туғызған колонияларын сипаттайды және суретін салады.

Бақылау нәтижелерін колонияның пішіні мен бетінен, мицелийдің (вегетативті және споралы) бояуын, пигменттің ортаға бөлінуін белгілей отырып 1-кестеге белгілеп көрсетеді. Колонияның сыртқы түрінің суретін салады.

Кесте 1. Колониялардың тмакроморфологиясының көрінісі.

Колония №	Колония пішіні	Колония диаметрі см	беті	Эксудаттың болуы	Мицелийлердің боялуы		Ортаға пигмент бөлуі	Колония суреті
					вегетативті	споралы		

Денитрификаторлардың санын анықтау сұйық Гильтай ортасында он еселік сұйылту әдісімен жүргізіледі. Инкубацияланғаннан кейін денитрификаторларға тән белгілері бойынша микроорганизмдер өсуінің бар немесе жоқ екенін ортаның

лайлануы, газды көп бөлуі (көбіктің пайда болуы), ортаның сілтіленуі (жасыл түстен көгілдір түске өзгерісі) атап көрсетеді. Барлық бақылауларды стерильді ортаның көрсеткіштерімен салыстырады және 2-кестеге белгілеп енгізеді.

Кесте 2. Денитрифирлеуші бактериялардың Гильтай ортасында өсу көрсеткіштері

Сұйылту	Қайталаулар	Газдың бөлінуі	Ортаның рН мәні	Ортаның лайлануы
---------	-------------	----------------	-----------------	------------------

Клеткалардың ең ықтимал көлем бірлігіндегі санын анықтайды да вариациялық статистика әдістерінің негізінде әзірленген Мак-Креди кестесін пайдалана отырып, 1 г топыраққа қайта есептеуді жүргізеді. Ең алдымен үш санды қамтитын сандық сипаттаманы құрайды. Сол жақтағы бірінші сан соңғы өсірудегі пробиркалардың санын көрсетеді, одан егу кезінде барлық егілген пробиркаларда өсім байқалады. Келесі екі сан келесі екі өсіруден тұратын егілген кезде өсу көрсеткен пробиркалар санын білдіреді. Содан кейін кесте бойынша сандық сипаттаманың осы мәніне сәйкес келетін микроорганизмдердің неғұрлым ықтимал санын табады. 1 г топырақтағы микроорганизмдердің саны сандық сипаттаманың бірінші санын алу үшін алынған өсуге көбейтілген осы санға сәйкес келеді.

Ең қарқынды өсуі көрсетілген дақылдардан "жаншылған тамшы" тірідей дайындалатын препаратын жасайды; материал пробирка түбінен алынады. Микроскоптан клеткалардың пішінін, кеңістікте орналасу сипатын, қозғалғыштығын көрсетеді. Микроскоптан көрген көріністің суретін салады.

3-зертханалық сабаққа тапсырма:

1) ЕПА+СА, КАА, Эшби, Виноградский ортасына топырақтағы микроорганизмдерді өсіру әдісін жазу.

2) топырақ суспензиясынан сұйылту дайындап $1/10^3$ МПА+СА қоспасына, $1/10^3$ КАА, $1/10^1$ және $1/10^2$ сұйылтуларынан Виноградский ортасына егу; топырақ түйіршіктерін Эшби ортасына трафаретпен орналасатыру.

3) КАА және ЕПА+СА-ға егілген табақшаларды 30°C термостатқа, Эшби және Виноградский ортасы бар табақшаларды 28°C температурада ылғалды камераға қою

4) Пробиркаларда ЕПА ерітіп құйып қиғаш агар дайындау.

5) Топырақтағы гетеротрофты бактерияларды, саңырауқұлақтарды және денитрификаторларды санын анықтау әдісін жазу.

6) ЕПА-ға өскен гетеротрофты бактериялардың санын анықтау. Схема бойынша топырақтың осы үлгісінде басым бір колонияны сипаттау.

7) Қышқылданған СА ортасында мицелиалды саңырауқұлақтардың санын анықтау, 2 басым өсіп шыққан колонияны сипаттау. 1 кестені толтыру.

8) денитрификаторлардың физиологиялық тобының санын он еселік сұйылту әдісімен анықтау.

Қажетті материалдар: топырақ үлгілері, стерильді орталар құйылған Петри табақшалары (ЕПА+СА, КАА, Эшби, Виноградский); 9 мл суы бар стерильді пробиркалар (5), 50 мл суы бар колбалар (1), стерильді келі мен келсап, зарарсыздандырылған сүзгі қағаздары (4), шпательдер (2), пробиркаларға арналған штативтер, микроскоптар, заттық және жабынды шынылар, иммерсиондық май, бактериялогиялық тұзақтар (ілемектер), спирт шамдары, таразылар, су моншасы, 100°C термометр, кесте Мак-Креди.

Зертханалық сабақ 4.

Әртүрлі физиологиялық топтарға жататын микроорганизмдердің санын есептеу

Аэробты спора түзуші бактерияларды ЕПА + СА орталарының 1:1 қоспасында 3-4 күн аралығында саналады.

$A \times 20 \times 1000 = 1$ г топырақта аэробты споратүзушілердің саны.

Таза дақылдарды бөліп алу үшін таңдап алған бір колонияның морфологиясын сызба бойынша сипаттайды, бұл ЕПА-ға өскен гетеротрофтты микроорганизмдердің колониясын сипаттауға ұқсас жасалынады.

КА-ға 7-10 күнге өскен микроорганизмдердің жалпы санынан тек актиномицеттердің колониялары ғана есепке алынады және олардың 1 г топырақтағы мөлшерін анықтайды.

$a \times 20 \times 1000 = 1$ г топтағы актиномицеттің саны.

Көптеген актиномицеттердің колониялары үлпілдек барқыт немесе ұнға ұқсас қақ тәрізді, көбінесе қоңыр, қара, сары, қызыл және т.б. түстерге боялған. Бактериялардың колонияларына қарағанда актиномицеттердің колониялары қоректік ортаға еніп өседі және ылғалды топырақтың иісі тән болады. Актиномицеттерге тән колонияларды микроскоптың ең төменгі ұлғайтқышында қарау керек. Субстраттық және әуе мицелиясының гифтерін көруге болады, тармақталған, қалқасы жоқ, әуе мицелиясы жіптерінің ұшында споралар жақсы көрінеді - тікелей, толқынды, спиральді немесе мутовчатый тәрізді споралардың құрылымы - актиномицеттердің түрін анықтау үшін негізгі талдаулық белгілердің бірі. 3-кестеде бақылауды белгілей отырып, 2 басым колонияны сипаттайды және суреттейді. Крахмал-аммиакты агар ортасында актиномицеттік колониялардың пайда болуын көрсетеді.

Кесте 3. Крахмал-аммиакты агар ортасында актиномицеттердің өсуі

Колония №	Колония пішіні	Диаметр, см	беті	Колония түсі	Ортаға пигменттің бөлінуі	Спораларының құрылысы	Колониялардың суреті
-----------	----------------	-------------	------	--------------	---------------------------	-----------------------	----------------------

Аэробты азотфиксациялайтын микроорганизмдерді санын анықтау үшін құрамында азоты жоқ Эшби ортасында топырақ түйіршіктерін 5-6 тәулікке өсіру әдісімен жүргізіледі. Азотобактер жасушалары болған жағдайда топырақ кесектерінің айналасында колония түзіп өседі. Әр түрлі топырақтарда азотобактерімен салыстырмалы бағалау үшін табақшалардағы түйіршіктердің жалпы санынан азотобактериялар өскен топырақ түйіршіктерінің пайыздық мөлшерін анықтайды.

Егер шырышты дөңес немесе созылмалы колониялар уақыт өте келе қызыл-қоңыр немесе тіпті қара түске ие болса, оларды *Az. chroococcum*, егер олар сары-жасыл пигментті түзсе, онда *Az. agile* бактериясына жатқызылады. Колониядан бекітілген боялған препаратты дайындайды да микроскоптың иммерсиялық жүйесімен қарайды. *Az. chroococcum* бактериясының жас клеткалары екі-екіден жұптасқан ірі, қысқа ұштары дөңгелек таяқшалар болады. Даму уақытына қарай олар дөңгелек, шырышты капсулалармен жиі қоршалыды. *Az. agile* клеткалары тығыз қоректік орталарда сарциналар тәрізді топтасады. Эшби ортасында азотобактериялардан басқа микроорганизмдер де дамиды, бірақ олар азотобактерияларға қарағанда азот қосылыстарының аз мөлшерін ғана қажет етеді немесе азотты тұтынады. Олар "олигонитрофилдер" деген ортақ атаумен біріктіріліп, Эшби ортасында тамшы тәрізді, шырышты мөлдір колониялар құрайды. Олигонитрофильді ашытқылар - *Lipomyces* шырышты, ақ түсті колониялар түзеді. Азотобактериялар бар топырақ түйіршіктерінің санын санайды да пайыздық мөлшерін көрсетеді, әртүрлі колониялардағы клетка морфологиясын белгілеп, микроскоптан көрген көріністің суретін салады.

Аэробты целлюлоза ыдырататын микроорганизмдердің санын санау өсіру мерзімі өткеннен кейін жүргізіледі, әр табақшадағы сүзгі қағаздарында өскен колониялардың санын есептеп, 1 г топыраққа есептеп санау жүргізеді.

Микроорганизмдердің қандай топтарының колониялары сүзгілерде басым екенін анықтайды. Миксобактерияның басым колониясын сипаттайды, едәуір көбірек тән белгілерін (өлшемі, пішіні, түсі, шырышы, клетчатканың ыдырау дәрежесі) атап көрсетеді. Осы колониядан бекітіліп боялған клеткалардың препаратын дайындайды және иммерсиялық жүйемен қарайды. Миксобактериялар жасушалары - басқа бактерияларға қарағанда клеткалары бояғыштармен әлсіз боялатын ұсақ, сәл иілген, ұштары үшкір таяқшалар. Көптеген миксобактериялардың күрделі даму циклі бар: таяқшалы клеткалары уақыт өте келе қолайсыз әсерлерге төзімді сфералық пішіндегі тыныштық жасушалары - микроцистерге айналады. Шырышпен қоршалған

микроцисталардың жиналуы жиі көзге көрінетін жалған жеміс денелерін құрайды. Микроскопиялық суретті салады.

Кох әдісімен бактериялардың таза культураларын бөліп алу. Бактериялардың таза дақылдарын Кох әдісімен тығыз қоректік ортада - ЕПА және ЕПА+СА бөліп алады. Бұл әдіс бір жасушаның даму нәтижесі деп санайтын жеке колониядан таза дақылдарды алуға негізделген. Таза дақылдарды алу үшін ЕПА және ЕПА+СА қоректік орталарында басым болғандықтан бөлініп алған колонияларды материал ретінде алады, олардың морфологиялық ерекшеліктері схема бойынша сипатталады. Осы колониялардың әрқайсысы стерильділіктің барлық ережелерін сақтай отырып, тығыз ЕПА ортасының бетіне екі пробиркаға штрихпен егіледі. Агардың беті конденсат болмауы тиіс, әйтпесе тұтас жайылып өсу болады. Штрих ортаның бүкіл бетінен дәл өткізілгені маңызды - бұл мәдениеттің штрих бойынша өсу сипатын атап өтуге мүмкіндік береді. Дақылдарды термостатқа 30 °С 3-4 күнге орналастырады. Содан кейін бөлінген дақылдардың тазалығын тексеруге кіріседі.

Бөліп алған бактериялардың культуралары тірі және бекітілген препараттардың микроскопиясы.

Таза дақылдарды бөліп алу үшін таңдалып сипатталған екі колониялардан тірі және бекітілген боялған препараттарды дайындау үшін материалды стерильді алады. Дәрі-дәрмектерді иммерсиямен қарайды. Жасушалардың пішіні мен үйлесімін белгілейді. Қалған морфологиялық белгілерді келесі сабақтарда анықтайды. Микроскопиялық суретті түсіреді.

Кесте 4. Зерттелген бактериялардың жасушалық морфологиясының ерекшеліктері

№ колони и	Микроскопиялық сурет	Клетка пішіні	Клеткалардың бірігуі	қозғалысы	Спорасының болуы	Грам бойынша боялуы
------------	----------------------	---------------	----------------------	-----------	------------------	---------------------

Культураларды зертеу бойынша бақылаулардың барлығы кестеге толтырылады.

4-Зертханалық сабаққа арналған тапсырма

1) МРА + SA-де өсірілген аэробикалық спора жасайтын бактериялардың сандық есебін жүргізу. Диаграмма 1-ге сәйкес басым колонияларға сәйкес сипаттаңыз.

2) Таза культуратерді оқшаулау үшін МРА және МРА + SA бар колониялардың инсультымен икемді агармен ауырады.

3) МРА және МРА + SA-ден оқшауланған тірі және тіркелген препараттар дайындау. Микроскопты орындап, нәтижелерді кестеге келтіріңіз.

4) Денитрация жасушаларының кумулятивтік культуранің микроскопиясын жүргізу, эскиз.

5) Petri ыдысындағы кішкентай микроскоптың үлкеюі бойынша саңырауқұлақтарды спортивациялау органдары мен эскизін зерттеу.

6) АСА, аэробты азотты ұстаушы агенттері және олигонитрофилдер бойынша актиномицеттерді тіркеу келесі сабақта жүргізілуі тиіс; аэробты целлюлоза бұзатын микроорганизмдерді есепке алу 10-14 күн ішінде жүргізілуі керек.

7) МПА-ны шақпақтарда дайындаңыз және зарарсыздандыруға рұқсат беріңіз.

8) Стерилизацияға дайындаңыз: Петри ыдыс-аяғы (10), тамшуырлар (2), спатулалар (2), 10 мл сумен сыналған түтіктер (2).

Қажетті материалдар: керамикалық ыдыс-аяқтар (10), пипеталар (2), Петри ыдыстары мен культура түтіктері, микроорганизмдер, микроскоптар, сырғалар мен қақпақтар, метилен көк және фуксин бояғыштары, сынақ түтіктері (2), массасы бар таразылар, МРА үшін 0,5 л шыны, шыныдағы сия, МРА - ет гидролизатына арналған компоненттер, пептон, тұз, агар агар, 30% сілтілі, фенолфталеин, эмбебап индикатор.

№ 5 Зертханалық жұмыс.

Бөлініп алынған микроорганизмдер дақылдарының тазалығын тексеру.

Табақшалы әдіспен әрқашан таза дақылдардың колониясын алу мүмкін емес. Бұның себебі, өсіп келе жатқан колонияның бір бөлігі біз ойлағандай бір клеткадан емес, кейде мүлдем әртүрлі түрлерге тиесілі бір-біріне жабысқан бірнеше клеткадан түзіледі, содан кейін аралас колония пайда болуы мүмкін. Сондықтан бөлінген дақылдардың тазалығы бірден бірнеше тәсілмен тексерілуі тиіс: көзбен көру арқылы, микроскоптау және Петри табақшаларына агарлы ортаның бетіне егу. Тығыз ортаға егу-дақылдың тазалығын тексерудің ең сенімді тәсілі. Стерильді 10 мл пробиркадағы құбыр суына тұзақпен дақылдың суспензиясын дайындайды. Табақшаларға екі тәсілмен - шпательмен және тұзақпен сарқылатын егу жүргізеді. Екі жағдайда да егіс материал нысаны – тұзақ суспензиясы ("айна").

Шпательмен егу - тұзақ "айнасын" бірінші табақшадағы қатқан ЕПА ортасына жағады, оны стерильді шпательмен ортаның барлық бетіне жаяды, содан кейін осы шпательмен тағы екі табақшада ортаның бетінен жүргізеді. Табақшаларда егіс материалының сарқылуына қарай, олардың біртектілігі бойынша дақылдың тазалығын көрсететін колониялардың аз саны өсуі тиіс.

Тұзақпен егу - тұзақ "айнасын" ЕПА бетінде оның шетіне жақын жағады және тұзақпен егіс материалын шамамен табақшаның ортасына дейін штрихпен

жағады; тұзақтыспиртшам жалынында күйдіреді, табақшаның қақпағының ішкі бетін суытады, табақшаны 90°бұрады және тағы да алдын ала егілген табақшаның төрттен бір бөлігін басып алатындай штрихпен егуді жүргізеді; табақшанытағы 90° бұрып стерильді тұзақпен штрихты егуді жүргізеді. Тәртіпті шатастырмау үшін табақша түбінде егудің бастапқысын белгілеп алады. Табақшалардың соңғы секторында олардың біртектілігі бойынша дақыл тазалығы туралы айтуға болатын колониялардың ең аз саны өсуі тиіс. Екі тәсілмен егілген табақшалардың қақпағын төменге қаратып 30°C термостатқа қояды. Өсіру ұзақтығы 5-7 тәулік.

№ 5 жұмысқа тапсырма

1) ЕПА ерітіп, Петри табақшаларына құю және қатқаннан кейін 60°C термостатта кептіру.

2) Дақылдың тазалығын тексеру үшін микроорганизмдерді ЕПА-ға егу әдістемесін жазу.

3) Зерттелетін дақылды екі тәсілмен егу: сарқылатын егу 3 табақшаға шпательмен және тұзақпен 2 табақшаға егу.

4) Пробиркаларға ЕПА ортасын құйып, стерилизацияға өткізу.

5) КАА ортасындағы актиномицеттер санағын жүргізу. Басым колонияны сипаттап, микроскоп астында споротасымалдаушы морфологиясын анықтап, нәтижесін кестеге енгізу.

6) Эшби ортасындағы азотобактер мен олигонитрофилдерді санап, тірі препаратты микроскопиялап, суретін салу.

Қажетті материалдар: стерильді Петри табақшалары, пипеткалар, шпательдер, бактериалды суспензия дайындауға арналған суы бар пробиркалар, колбадағы ЕПА, тұзақтар, спиртшамдар, пробиркалар, заттық және жабындық шынылар, метилен көгі, иммерсионды май, пробиркаларға арналған штатив, 60°C термостат, қиғаш бактериалды дақылдар, актиномицеттер мен азотфиксаторлар дақылдары.

БӨЛІНІШ АЛЫНҒАН БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ҚАСИЕТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

№ 6 Зертханалық жұмыс.

Микроорганизмдерді сипаттауға және сәйкестендіруге қажетті белгілер

Кез келген субстрат микрофлорасын сапалы зерттеудің соңғы нәтижесі - микрофлораның түрлік құрамын анықтау. Бұл анықтама табылған бактериялардың түрлерін бұрын сипатталған және белгілі бір таксономиялық топтардың құрамына кіретін түрлермен идентификациялаудан (сәйкестендіруден) тұрады. Бактерияларды дәл сәйкестендіру үшін көптеген жағдайларда зерттеу сипаты бар және диагностикалық белгілердің көп санын жинақтауға бағытталған бірқатар күрделі және жиі ұзаққа созылатын операциялар жасауға тура келеді.

Микроорганизмдерді сәйкестендіру үшін әртүрлі белгілерді қолданады: морфологиялық, дақылдық, физиологиялық-биохимиялық, олардың қатары цитология, биохимия және микроорганизмдердің генетикасы саласындағы білімнің тереңдеуіне қарай кеңейеді.

Жасушалар морфологиясының ерекшеліктеріне мыналар жатады.

Жасушалардың формасы мен қосылуы. Тірі немесе боялған жасушалардың препараттарын микроскоптау кезінде анықтайды; біріншісін құрғақ жүйеде (15x40 ұлғайту), екіншісін - иммерсиялық жүйемен қарайды.

Жасушалардың мөлшерлері. Микроскоппен окулярлық сызғыштың немесе окулярлық бұрандалы микрометрдің көмегімен анықтайды. Кокктардың диаметрі өлшенеді, басқа пішіндерде - клетканың ұзындығын еніне өлшейді. Өлшеу нәтижелері микрометрлермен көрсетіледі.

Қозғалғыштығы. "Ілінген тамшы" препаратынан байқалады. Егер жасушалар қозғалатын болса, онда олар жанданып, микроскоптың көру өрісіне түрлі бағыттарда қозғалады. Уақыт өте келе белгілер қозғалғыштығын жоғалтады, сондықтан жас дақылды бақылау керек.

Спораның болуы. Тірі жасушаларды микроскоптау кезінде, цитоплазма мен споралардың дифференциалды боялуы және пастерлеуден кейін жасушалардың суспензиясымен инокуляцияланған ортадағы өсуі бойынша анықтауға болады.

Грамммен бояуға қатынасы. Маңызды таксономиялық белгі болып табылады. Барлық бактериялар йоды бар трифенилметандық қатардағы бояғыштармен боялу қабілеті бойынша грам оң және грам теріс екі үлкен топқа бөлінеді. Жасушалардың Грамммен боялу қабілеті олардың жасына байланысты, сондықтан жас (тәуліктік) дақылдардың жасушаларын бояу және бір мезгілде Грамм бойынша бояуға қатысы алдын ала белгілі микроорганизмдердің жасушаларын бояу керек.

Дақылдық белгілер-тығыз және сұйық қоректік орталарда микроорганизмдердің өсу сипаты.

Тығыз ортада өсу. Микроорганизмдер тығыз қоректік ортаның бетінде дами отырып, осы түрге тән колонияны түзеді. Сондықтан колониялардың сипаттамасы-зерттелетін микроорганизмді сәйкестендіру үшін қажетті белгілердің бірі. Сипаттама жиі қиғаш тығыз қоректік ортаның бетінде штрих бойынша өсу сипаттамасымен толықтырылады.

Сұйық ортада өсу. Тығыз ортадағы өсумен салыстырғанда үлкен әртүрлілігімен сипатталады және ортаның лайлануымен, үлдірдің немесе шөгіндінің пайда болуымен бірге жүреді. Көбінесе сұйық ортада микробтардың өсуін сипаттау үшін ет-пептон сорпасы қолданылады.

Микроорганизмдерді сипаттау және сәйкестендіру үшін олардың метаболизмінің кейбір ерекшеліктерін кеңінен қолданады, зерттелетін ағзаның қазіргі уақытта қабылданған диагностикалық ортада өсу және осы ортаның құрамына кіретін заттардың қандай да бір түрленуін туғызу қабілеті бойынша анықталады.

Бактериялардың систематикалық жүйесін анықтау кезінде қажетті физиологиялық-биохимиялық белгілерге мыналар жатады.

Көмірсулар мен қант-спирттерді пайдалану. Микроорганизмдер көміртегі мен энергияның жалғыз көзі ретінде әртүрлі көмірсулар мен спирттерді пайдаланудың біртекті емес қабілеттілігімен сипатталады. Гетеротрофты микроорганизмдерді сәйкестендіру үшін қандай көмірсулар мен спирттер зерттелетін ағзаның өсуін қамтамасыз ететінін және ортаның қандай өзгерістерімен оның өсуін қамтамасыз ететінін анықтау қажет. Микроорганизмдердің көмірсулар мен спирттерді пайдалануы органикалық қышқылдардың, бейтарап өнімдердің, газдардың жиналуына әкелуі мүмкін. Қышқылдардың пайда болуы ортаның белсенді қышқылдығының өзгеруі бойынша, газдың пайда болуы - ортаның бетінде көбік пайда болуы және ортаны қалтқыдан ығыстыру бойынша тіркеледі.

Желатинді сұйылту. Ортаға протеолитикалық ферменттерді бөлетін микроорганизмдер желатинді сұйылтуға қабілетті. Бұл қабілеттілікті анықтау үшін зерттелетін микроорганизмдерді ет пептонды желатинді ортаға (ЕПЖ) егеді.

Аммиактың түзілуі. Амин қышқылдарын дезаминдендіретін микроорганизмдерге тән. Бұл қабілет ет-пептон сорпасында (ЕПС) өсіп тығыны мен пробирканың мойны арасында қысылған қызғылт лакмус қағазының көгеруімен анықталады.

Күкіртсутегінің түзілуі. Метаболизм процестерінде күкіртті амин қышқылдарын қолданатын микроорганизмдерге тән. Бұл қабілеттілік ЕПС пробиркаларында егуден кейін орта үстінен сіркеқышқылды қорғасын ерітіндісімен өңделген қағаз қиындысын қойып өсіргенде байқалады. Күкіртсутегінің бөлінуін қорғасын сульфиді түзілуі нәтижесінде қағаздың қараюынан анықтайды.

Синтетикалық ортада өсуі. Азот көзі ретінде минералды тұздар азотын пайдаланатын және қоректік ортаға дәрумендер мен басқа да өсу факторларын қосуды талап етпейтін микроорганизмдерге тән.

Сүтке әсер етуі. Сүт қанты лактозаның ашуымен, казеин протеолизімен немесе осы екі процестің бір уақытта болуымен байланысты болуы мүмкін.

Бөлініп алынған бактерия дақылдарының тазалығын тексеру.

Өсіру мерзімі өткеннен кейін Петри табақшаларында екі тәсілмен сарқылатын егу нәтижесінде өскен оқшауланған колонияларды қарайды және олардың белгілерін бұрын бөлінген таза дақылдар белгілерімен салыстырып тексереді. Колониялардың біртектілігі және белгілердің сәйкес келуі-дақыл тазалығының дәлелі.

Бөлінген дақылдардың тазалығына микроскопиялық бақылау жүргізеді, тірі жасушалардың препараттарын қарайды. Микроскоп астындағы дақылдардың морфологиялық біртектілігі, сондай-ақ бұрын бөлініп сипатталған жасушалар морфологиясымен ортақталуы олардың тазалығын көрсетеді. Дақылдың тазалығына көз жеткізіп, әрбір дақылдың оқшауланған колониясын қиғаш ЕПА бетіне екі пробиркаға егеді. Пробиркаларды 30°C термостатқа 4-5 тәулікке орналастырады. Өскен дақылдар тоңазытқышта немесе бөлме температурасында сақталады.

Дақылдардың боялуға қатынасын Грам бойынша анықтау.

Зерттелетін дақылдардың Грам бойынша боялуға қатынасын анықтау үшін бір майсыздандырылған заттық шыныда әр түрлі микроорганизмдердің жұғындысын жасайды: ортасында – зерттелетін дақылдың жұғындысын, сол және оң жағында – бақылау микроорганизмдері (Грамм + және Грамм -). Жұғындылар жұқа болуы керек, өйткені бояу нәтижелері жұғындының қалыңдығына байланысты. Жұғындыларды ауада кептіреді, фламбирлеумен бекітеді, 1-2 минут карболды-венцианвиолетпен бояйды, бояғышты жуады және препаратты жумай, оны Люголь ерітіндісімен қарайғанға дейін 1-2 минут өңдейді. Люголь ерітіндісін төгеді және 96° этанолмен 0,5-1 минут түссіздендіреді. Спиртті жұғындыға құйып, шыныны сәл шайқап, оны бірнеше рет өзгертеді. Препаратты сумен шаяды және қосымша 1-2 мин сулы фуксинмен бояу қажет. Бояғышты төгіп, препаратты сумен шаяды, кептіреді және иммерсиямен микроскоптайды. Дұрыс бояу кезінде Грамм оң бактериялар көк-күлгін, Грамм теріс-фуксиннің қызыл түсіне боялады. Бақылау жұғындысын зерттелетін дақылмен салыстырады және оның Грамм бойынша боялуға қатынасын анықтайды.

№ 6 жұмысқа тапсырма:

1) Микроорганизмдердің бөлінген дақылдарын сәйкестендіру үшін қажетті негізгі белгілерді жазу.

2) Сарқылатын егу бойынша табақшалардағы колониялардың біртектілігі бойынша бөлінген дақылдардың тазалығын белгілеу.

3) Қиғаш агарға дақылдарды штрихпен қайта егу.

4) Бөлінген дақылдардың Грам бойынша боялуға қатынасын анықтау

5) Виноградский ортасындағы аэробты целлюлоза түзуші микроорганизмдердің санын ескеру. Сүзгіштегі микобактериялардың өсу сипатын сипаттау, тірі препараттың микроскопиясын жүргізу, бояу.

Қажетті материалдар: Петри табақшаларындағы микроорганизмдер дақылдары, қиғаш агарлы стерильді пробиркала (4), тұзақтар, спиртшамдар, микроскоптар, заттық және жабындық шынылар, карболды генцианвиолет, Люголь ерітіндісі, сулы фуксин, 96° спирт, метилен көгінің сулы ерітіндісі, пробиркаларға арналған штативтер, фильтр қағазы кесінділері, Грам+және Грам- бақылау микроорганизмдерінің дақылдары.

№ 7 Зертханалық жұмыс.

Микроорганизмдердің зерттелетін дақылдарын дифференциалды диагностикалық ортаға егу.

Зерттелетін бактериялық дақылдардың суспензиясын дайындау үшін қиғаш агардан дақылды тұзақпен алады және стерильді су құбырымен суспензиялайды. Сұйық ортаға (ЕПС, сүт, көмірсутегі бар орта) 0,1-0,2 мл суспензияны егу жүргізіледі. ЕПС-да дақылдарды екеннен кейін дақылдың дезаминдейтін қабілетін анықтау үшін орта үстіндегі пробирканың тығыны мен мойынының арасындақызыл лакмустың стерильді жолағынқысып, сірке қышқылы қорғасынының ерітіндісімен сіндірілген қағаз жолағын күкірт сутегін түзу қабілетін анықтау үшін орналастырады. Күкіртті сутегіаммиагының ұшып кетуін қиындату үшін тығынды целлофанмен орайды. 3-4 тәулік стационарлық жағдайда өсіреді.

Синтетикалық ортаға дақылдарды егу штрихпен жүргізіледі. Егуге арналған материал қиғаш өсірілген дақылдардан алынады. ЕЖХ егу инемен жүргізіледі. Бактерияларды бөлме температурасында 7-10 тәулік бойы ЕПЖ ортасында дақылдайды.

Зерттелетін дақылдардың қозғалғыштығын анықтау.

Қозғалысты бақылау үшін жас сорпалық дақылды (тәуліктік) алады, себебі жасы ұлғая келе жасуша қозғалғыштығын жоғалтады. "Ілінген тамшы" препаратын дайындайды - жабынды шынының ортасына зерттелетін микробтардың шағын суспензия тамшысын жағады, шыны тамшысын төмен қаратып, тамшының шетіне де, шұңқырдың түбіне де тимейтіндей етіп шұңқыры

бар арнайы заттық шыныға орналастырады. Алдымен микроскоптың аз ұлғайтуында тамшы шетін табады, содан кейін жасушаларды үлкен ұлғайтуда фокустайды және қозғалғыштықты бақылайды. Егер жасушалар қозғалатын болса, онда олар микроскоптың көру өрісінде әртүрлі бағытта жанданады.

Зерттелетін дақылдардың спораларын анықтау.

Дақылдардың спора түзу қабілетін табуды ескі дақылдарда жүргізу жақсы. Спора қабығы көп қабатты және өте қиын өткізгіш, сондықтан жасушалардың қарапайым бояу кезінде споралар боялмайды. Спораларды бояудың барлық тәсілдері-дифференциалды және бастапқы да күшті бояумен қыздырып бір мезгілде жасуша мен спораны бояуға негізделген. Содан кейін жасушаның протоплазмасын түссіздендіріп, спораны боялған күйінде қалдырады. Осыдан кейін протоплазманы басқа, көбінесе қанық түспен қосымша бояйды.

Ожешко әдісі. Майсыздандырылған заттық шыныда дақылдың жұқа жұғындысын дайындайды, оны ауада бекітпестен кептіреді, тұз қышқылының 0.5% ерітіндісін құяды және бу пайда болғанға дейін спиртшамның үстіне жоғары ұстап 2 мин бойы қыздырады. Қышқылды төгіп, препаратты сумен шаяды, жұғындыны фильтр қағазымен жабады және Цилдің карболды фуксині құйылады. Спирт шамның үстінде бу пайда болғанға дейін қыздырып 5 мин бойы бояйды. Бояғыштың булануына қарай, препаратты құрғатпай, оны мезгіл-мезгіл қосады. Препаратты қайтадан сумен шаяды және 2 мин бойы 1%-дық күкірт қышқылының ерітіндісімен түссіздендіреді. Препарат тағы да сумен шайылып, 10-15 мин бойы метилен көгі (1:40) ерітіндісімен боялады. Бояғышты төгіп, препаратты сумен шаяды, кептіреді және иммерсиялық жүйесімен микроскоптайды. Дұрыс боялу кезінде бактериялық жасушалар көк, ал споралар қызыл болуы керек.

Бактериялар жасушаларының спора түзуге қабілеттілігі аэробты спора түзуші бактерияларды анықтау және сандық есепке алу кезінде пастерлеу әдісімен жанама анықталады.

Зерттелетін микроорганизмде спора түзу қабілеті анықталған кезде спораның пайда болу түрін (бациллярлы, клостридиальді, плектридиальді), спораның жасушада орналасуын (орталық, эксцентральды, полярлық) атап өту қажет. Бақылау нәтижелерін "Зерттелетін бактерия дақылдарының жасушалары морфологиясының ерекшеліктері" кестесін еенгізу.

№ 7 жұмысқа тапсырма

- 1) Қоректік ортаға егу үшін зерттелетін дақылдардың суспензиясын дайындау.
- 2) Әрбір дақылды ЕПС, сүт, көмірсулар бар пробиркаларға, синтетикалық ортаға штрихпен, ЕПЖ бар пробиркаларға инемен егу.
- 3) Дақылдарды қиғаш агар штрихпен ауыстырып егу.
- 4) Жас сорпалық дақылдағы бактериялардың қозғалысын анықтау.

5) Зерттелетін бактерияларда споралардың болуын Ожешко әдісімен анықтау.
Қажетті материалдар: зерттелетін микроорганизмдердің қиғаш дақылдары, қоректік ортасы (ЕПС, ЕПЖ, сүт, синтетикалық орта, көмірсутегі бар орта) бар стерильді пробиркалар, стерильді суы бар пробиркалар, пипеткалар, тұзақтар, спиртшамдар, стерильді лакмус қағазы, сіркеқышқылды қорғасынмен сіңірілеген фильтр қағазы кесінділері, целлофан, пинцеттер, ойы шынылар, стекла с лункой, заттық және жабындық шынылар, фильтр қағазы, тұз қышқылының 0,5% ерітіндісі, Цильдің карболды фуксин еріндісі, метилен көгі (1:40), күкірт қышқылының 1% ерітіндісі, иммерсионды май.

№ 8 зертханалық сабақ.

Зерттелетін дақылдардың физиологиялық-биохимиялық қасиеттерін сипаттау.

ЕПС-да өсіру. ЕПС-да өсу сипатын стационарлық жағдайда өсірілген 4-7-тәуліктік дақылдарды пайдалана отырып сипаттайды. ЕПС-да микробтардың өсуі ортаның лайлануымен жүреді.

Штрих бойынша ЕПС-да өсу. Штрих бойынша өсу қарқындылығы – аз, орташа, көп деп белгіленеді, және оның қасиеттеріне – бетінің тұтастылығы, тегіс немесе иректелген шетінің болуы, оқшауланған колониялардың тізбегі түрінде, диффузды, кеуекті, сүрек тәрізді немесе ризоидты болуы жатады. Штрихтың оптикалық қасиеттерін, оның түсін, бетін және консистенциясын сипаттайды.

ЕПЖ-да өсу. Желатиннің бұзылуы немесе оның болмауы визуалды түрде белгіленеді. Егер желатин сұйылтылса, сұйылту қарқындылығы мен нысаны көрсетіледі. Ол қабатты, шұңғыма тәрізді, қап сияқты, көпіршікті болады. МПЖ-мен немесе МПА-дан пробиркаға укол арқылы екенде дақылдың өсуі бойынша микроорганизмдердің оттегіге қатынасы туралы айтады. Аэробтар уколдың жоғарғы бөлігінде дамиды-шеге түрінде өсу. Факультативтік анаэробтар – барлық укол бойынша біркелкі, анаэробтар-оның төменгі бөлігінде.

Сүтте өсу. Микробтардың сүтке әсер ету нәтижелері себілгеннен кейін 3-7 тәуліктен кейін тіркеледі. Қышқылдардың түзілуімен лактозаны қолдану индикатор түсінің өзгеруімен (көк лакмус қағазының қызаруы) белгіленеді. Егер қышқылдану дәрежесі жеткілікті жоғары болса, онда жиі сарысудың бөлінуімен бірге болатын казеиннің коагуляциясы (ұйыған түзілуі) байқалады. Лактозаны пайдалану процесінде көмірқышқылының пайда болуы ұйыған кезде жақсы көрінеді, ол бұл жағдайда көпіршіктермен өтеді. Сүт казеиніне микроорганизмдердің әсері де коагуляция тудырады, бірақ ол ортаның бейтарап немесе әлсіз сілтілік реакциясы кезінде орын алады және казеинолитикалық ферменттердің микробтары түзілуінің нәтижесі болып табылады. Бұл ферменттердің жоғары белсенділігінде пептонизация деп аталатын сүттің ағартылуы байқалады, бұл казеин протеолизімен байланысты.

Аммиактың түзілуі лакмус қағазының бояуының өзгеруі бойынша анықталады - қызғылт лакмус ЕПС-да дақылы бар пробиркада көк.

Күкіртті сутегінің түзілуі ЕПС бар пробиркада қорғасын сульфидінің пайда болуынан сірке қышқыл қорғасын ерітіндісімен сіңірілген қағаздың қараю бойынша анықталады.

Көмірсулар мен спирттері бар ортадағы өсу органикалық қышқылдардың, бейтарап өнімдердің, газдардың жиналуына әкелуі мүмкін. Қышқылдардың түзілуі ортаның белсенді қышқылдығының өзгеруі, демек, бромтимолблау индикаторының түсінің өзгеруі бойынша; газдың пайда болуы - ортаның бетінде көбік пайда болуы және ортаны балқытудан ығыстыру бойынша тіркеледі. Ортаның лайлануы, қабықшаның пайда болуы, тұнбаның түзілуі барлық пайдаланылатын көмірсулар мен спирттер бар ортада өсуін немесе оның болмауын көзбен шолып көрсетеді. Нәтижелерді бақылау ортасымен, яғни құрамында көмірсулар мен спирттер жоқ ортамен салыстырады. Барлық бақылау 5-кестеге енгізіледі.

5-кесте. Көмірсутектері мен спирттері бар орталарда зерттелетін микроорганизмдердің өсу көрсеткіштері

Көмірсу, спирт	Ортаның лайлануы, қабықша, тұнба	Газдың түзілуі	Ортаның рН-ы		
			қышқылдандыру	сілтілендіру	Өзгеріссіз

Алынған деректер негізінде зерттелетін ағзаны қандай көмірсулар мен спирттер пайдаланатыны, оны пайдалану қышқылдың жиналуымен немесе газдың пайда болуымен сипаттала ма деген қорытынды жасайды.

Синтетикалық ортада өсу.Қиғаш синтетикалық ортада өсірудің 7-10 тәулігінен кейін сыналатын микроорганизмдердің өсуіне немесе жоқ болуына визуалды түрде бақылау жасайды. Егер өсу болса, оның ерекшеліктерін сипаттайды.

№ 8 – зертханалық жұмысқа тапсырма

- 1) ЕПС-дағы дақылдардың өсу сипатын сипаттау
- 2) Штрих бойынша МПА-дағы дақыл өсімінің сипатын сипаттау
- 3) ЕПЖ-дағы дақылдардың өсу сипатын сипаттау
- 4) Дақылдардың сүтке әсер ету сипатын анықтау
- 5) Дақылдардың аммиак, күкіртсутекті қалыптастыру қабілетін анықтау
- 6) Дақылдардың түрлі көмірсулар мен спирттерді ашыту қабілетін анықтау
- 7) Синтетикалық ортада дақылдардың өсу қабілетін анықтау

- 8) Бактериялардың бөлінген дақылдарына тән қасиеттері мен белгілерін көрсететін жиынтық кесте жасау
- 9) Бактерияларды анықтағыштар бойынша идентификация принциптерімен танысу

Қажетті материалдар: өсірілген бактерия культуралары бар пробиркалар, бактериялар мен актиномицеттерді анықтағыш (Н.А.Красильников), Берги бактерияларын қысқаша анықтағыш.

№ 9 – зертханалық сабақ.

Бактериялардың бөлінген дақылдарын сәйкестендіру (идентификациялау)

Практикумның осы бөлімі бойынша жазбаша есеп жасау.

№ 9 сабаққа тапсырма

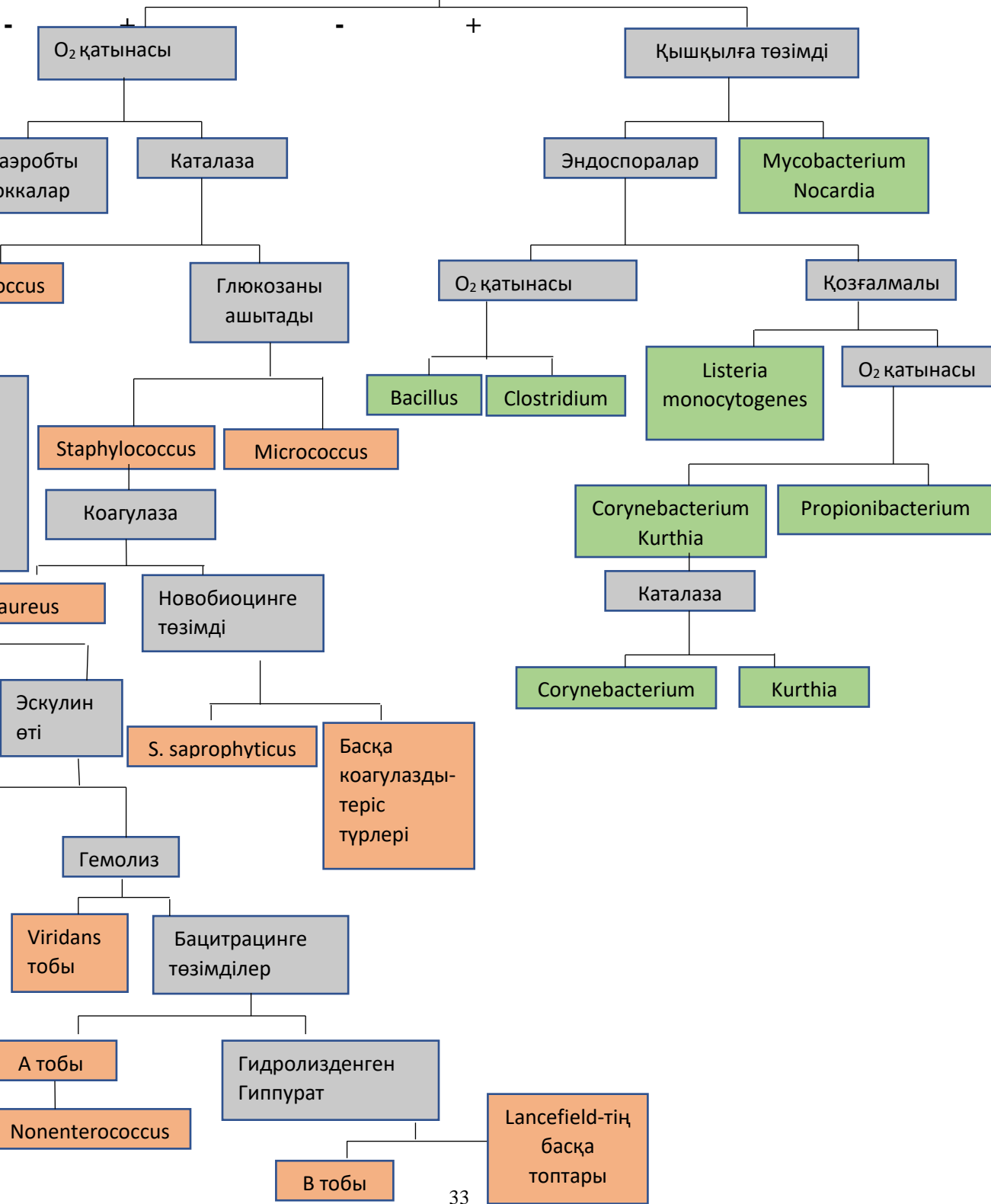
- 1) Зерттелген дақылдарды сәйкестендіруді жүргізу.
- 2) Жазбаша есеп жасау.
- 3) Оқытушыға есеп пен бактериялардың таза дақылдарын тапсыру.
- 4) Қажетті материалдар: микроорганизмдерді анықтағыштар.

Бактерияларды идентификациялау (цит. по Dr. Abdelraouf A. Elmanama, GeneralMicrobiologyManual, 2009)

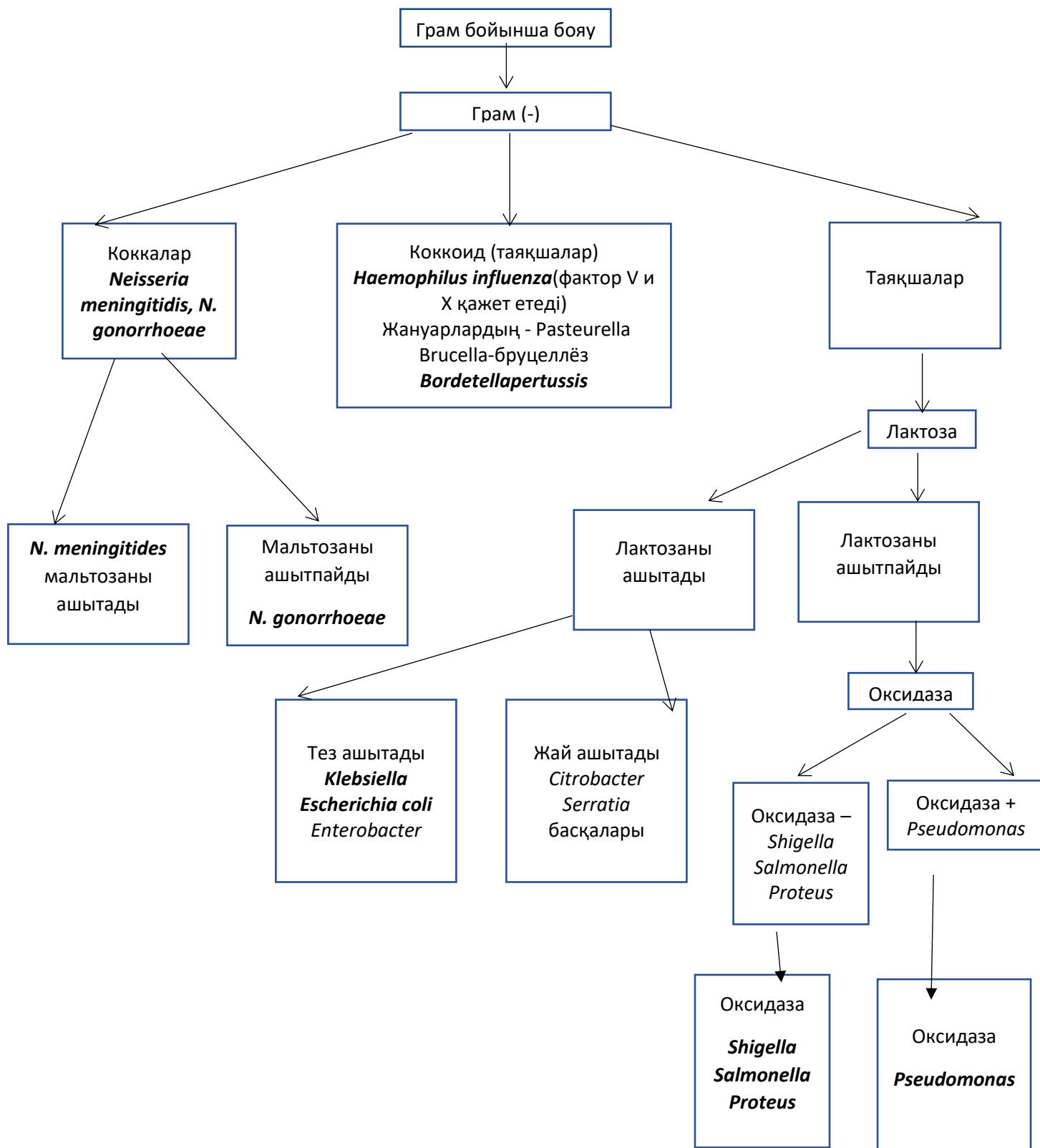
Коккалар
Бациллалар

Грамм оң бактериялар

Формасы



Грамтеріс бактериялар – лабораториялық алгоритм



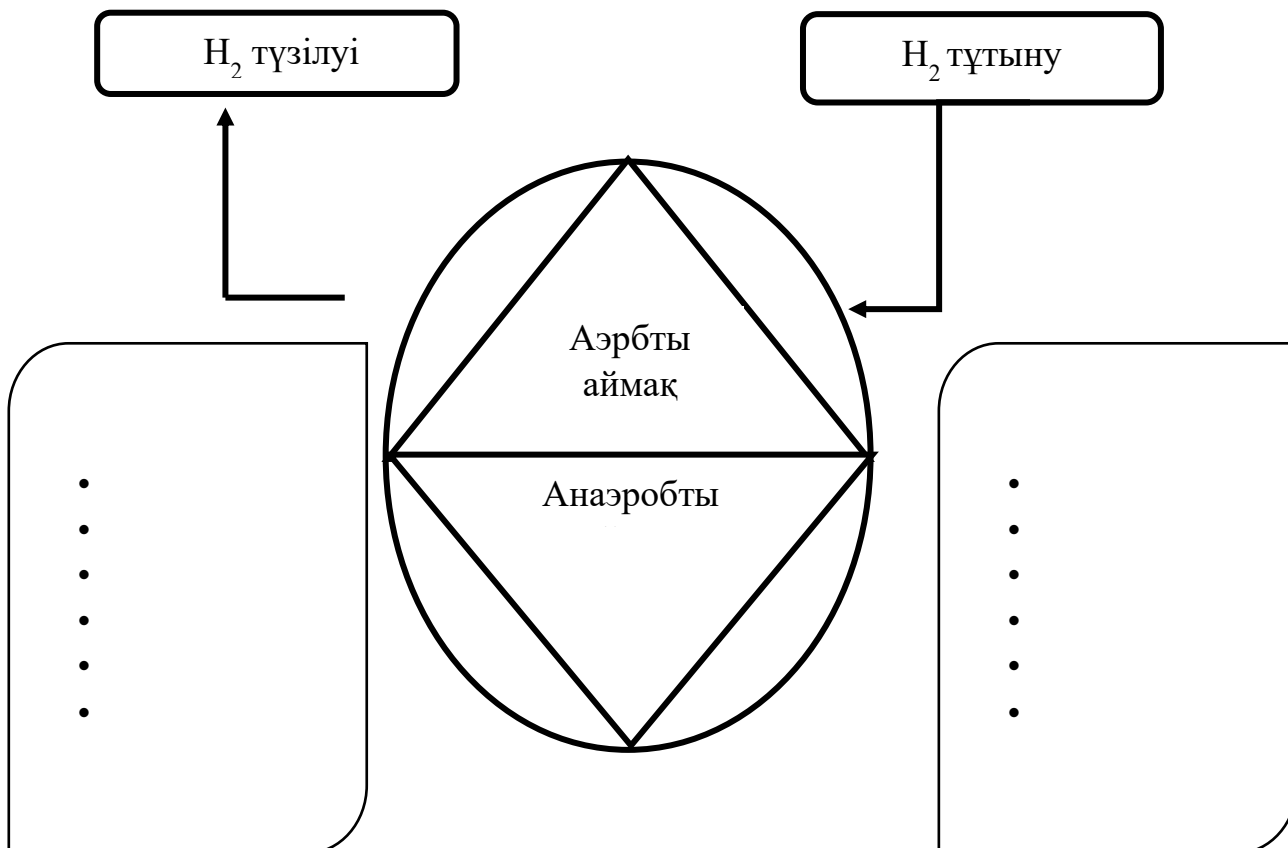
Қалың шрифтпен маңызды патогендер белгіленген.

Сурет 1. Грам + және Грам- бактериялардың идентификациясының схемасы

1- тақырыпқа тапсырма

Тапсырма 1. Ұсынылған микроорганизмдерге сүйене отырып сызбаны толтырыңыз.

Схема: Биогенді сутегі көздері мен тұтынушылары



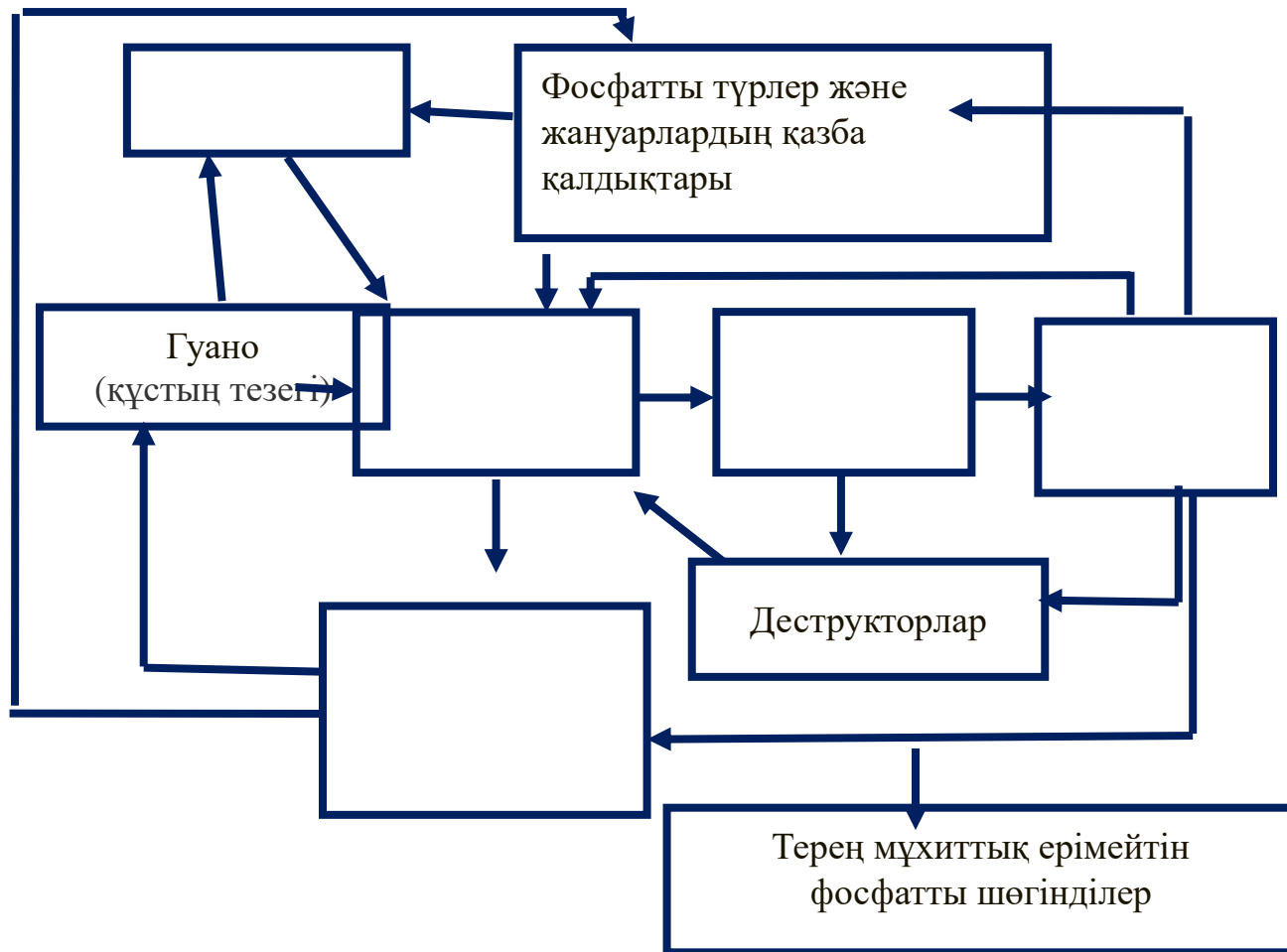
Микроорганизмдер: балдырлар және фототрофты бактериялар, сутекті бактериялар, цианобактериялар, азотфиксаторлар, энтеробактериялар, ацетат түзушілер, сульфатредуцирлейтін, бастапқы анаэробтар, метаногенді бактериялар.

Тапсырма 2. Кестені толтырыңыз.

Кесте: Көптеген микроорганизмдер топтарындағы сутегінің түзілу механизмдері

	Хемотрфты бактериялар	Азотфиксаторлар	Балдырлар және цианобактериялар
Негізіндегі процесс			
Процеске қатысатын ферменттер			

Тапсырма 3. Табиғаттағы фосфор айналымының схемасын толтырыңыз.



Тапсырма 4. Майлы қышқылды ашытуды қысқаша сипаттаңыз.

Төменде келтірілген кестеде сүт қышқылды ашытудың қоздырғыш - микроорганизмдерін, пайдаланылатын субстраттарды және ашытудың соңғы өнімдерін көрсетіңіз.

Микроорганизмдер	Субстраттар	Соңғы өнімдер

Тапсырма 5. Сүт қышқылды ашытуға жалпы сипаттама беріңіз, "гомоферментативті ашыту" және "гетероферментативті ашыту" ұғымдарын түсіндіріңіз, сүт қышқылды ашытудың әр түрінің негізгі сипаттамасын көрсетіңіз.

Гомоферментативті

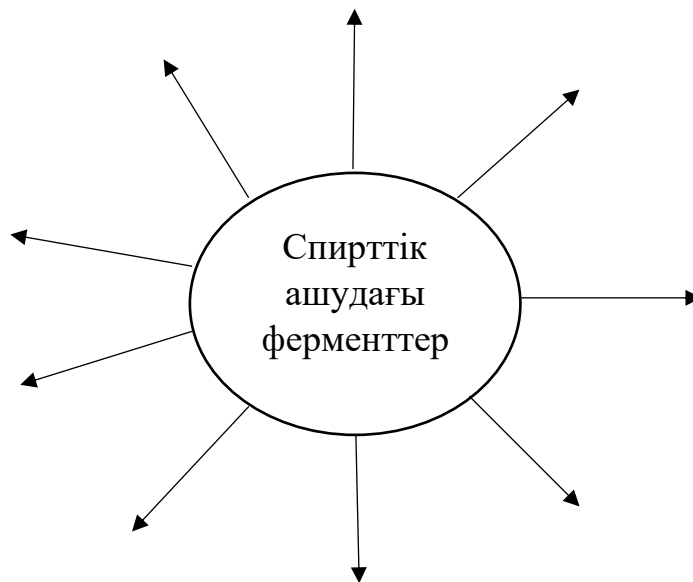
Гетероферментативті

Тапсырма 6. Спиртті ашытуға микроорганизмдердің қатысуын сипаттаңыз, спиртті ашытудың жиынтық реакциясын көрсетіңіз. Спиртті ашытуға қатысатын ферменттерді атаңыз.

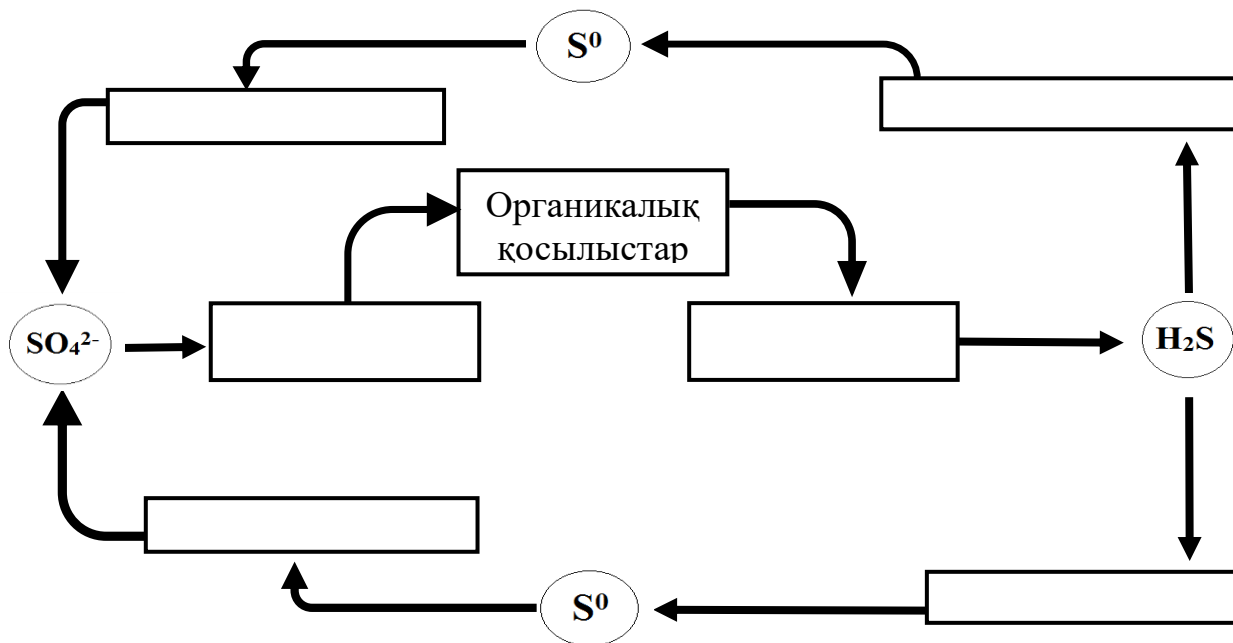
Табиғатта ашытудың бұл түрі мүмкін бе? Егер солай болса, онда қайда?

Спиртті ашытудың жиынтық реакциясы

$\text{_____} \rightarrow \text{_____} + \text{_____}$
--



Тапсырма 7. Күкірт айналымында микроорганизмдер жүзеге асыратын негізгі процестерді сипаттаңыз.



Тапсырма 8. Күкірт тотығуын жүзеге асыратын микроорганизмдерді, сондай-ақ бастапқы және соңғы тотығу өнімдерін атаңыз.

	Микроорганизмдер	Тотығудың бастапқы өнімі	Тотығудың соңғы өнімі
Аэробты жағдайда тотығу	Тионды бактериялар	S^0 и H_2S	SO_4^{2-}
Анаэробты жағдайда тотығу			

Тапсырма 9. Табиғатта микроорганизмдерді қолдануға қабілетті күкірт көздерін және түрлеріне мысалдар келтіріңіз.



ТАҚЫРЫП 2

Микроорганизмдердің өсуіне және дамуына физико-химиялық факторлардың әсері.

Мақсаты: Қоршаған орта факторларының микроорганизмдердің өсуі мен дамуына әсерін зерттеу.

Тіршілік жағдайлары микроб жасушасына тұрақты әсер етеді. Кейбір микроорганизмдер әртүрлі факторлардың кең ауқымында өмір сүре алады.

Микробтық клеткаға сыртқы әсерлердің нәтижесі фактор әрекетінің механизмі мен ұзақтығына, микроорганизмдердің түрлік тұрақтылығына, олардың әсер ету қарқындылығына (дозасына, концентрациясына), сондай-ақ ортаның физикалық және химиялық жағдайларына байланысты болады.

Микробиологиялық практикада микроорганизмдердің өсу қарқындылығы бағдарлы көрсеткіштермен : сұйық ортада –лайлану дәрежесімен, агарлы ортада дақылдың өсу тығыздығымен көрінеді. Дәлірек анықтау үшін сандық әдістерді пайдаланады: ортада өскен клетка санын анықтау (тікелей микроскоппен немесе өскен колониялардың саны бойынша), сондай-ақ ортадағы дақылдардың жалпы биомассасын анықтау.

Метаболизмді жүзеге асыруда судың белсенділігі маңызды рөл атқарады a_w , ол ерітіндінің бу қысымы мен таза су буының қысымына тең болды. Судың белсенділігі оның өзіне, яғни құрғату дәрежесіне, сондай-ақ онда ерітілген заттардың санына байланысты. Кейбір микроорганизмдер қатты ортада өсе алмайды, ал басқалары (ксерофиттер) a_w төмен мәндерінде өседі.

Микроорганизмдер қоршаған ортадан жартылай өткізгіш мембранамен бөлінген болғандықтан, гипотониялық ерітінділерде су ерітілген заттардың концентрациясының градиенті бойынша клеткаға түсуін болдырмау үшін белгілі бір күш (осмотикалық қысым) салу керек. Грамоң бактерияларда осмотикалық қысым сұйылтылған ерітінділерде 20 атм немесе одан да көп болуы мүмкін. Гипертониялық ерітінділерде плазмолиз тудыратын кері құбылыс (клеткадан судың "сорылуы") орын алады.

Қант және тұздың жоғары концентрациясы тағам өнімдерінде консервілеу үшін қолданады. Табиғатта әртүрлі тұздың жоғарғы концентрациясы Өлі теңізде, тұзды көлдерде, және тағы да басқа тұзды жерлерде кездеседі. Заттардың жоғары концентрациясы бар ерітінділерде өмір сүре алатын микроорганизмдер осмофилдер деп аталады. Олардың кейбіреулері тұзбен және қантпен консервіленген тамақ өнімдерінің бұзылуы, сондай-ақ тағамдық ауруларының қоздырғыштары болып табылады.

Ортада ерітілген заттардың жоғары концентрациясы кезінде және жоғары осмостық қысымда көптеген микроорганизмдерде клетканың плазмолизі басталады - протоплазма су бөледі және тығыздалады; бұл ретте зат алмасу процестері тежеледі және клетка анабиоз жағдайына ауысады. Плазмолиз

құбылысы кейбір тамақ өнімдерін ас тұзымен және қантпен консервілеудің негізіне алынған.

Ең көп зерттелген микроорганизмдер тұздардың жоғары концентрациясында (NaCl) кездеседі, оларды галофильдер деп атайды.

Өсудің оңтайлы рН мәндеріне қатысты микроорганизмдер ацидофильді (0-5,5), нейтрофилді (5.5-8.0) және алкалифильді (8.5-11.5) болып бөлінеді. Көптеген бактериялар мен қарапайым нейтрофилдер және саңырауқұлақтар мен балдырлар, рН-тың төмен мәндерінде өседі, ал цианобактериялар жоғары рН-да өседі. Алкалифильді және ацидофильді микроорганизмдерде цитоплазманың рН мөлшері 7,5 деңгейінде сақталады.

Температураның прокариотты организмдердің өсуіне әсерін зерттеу кезінде температуралық диапазон ең төменгі және ең жоғары температуралармен шектелген, сондай-ақ ең жоғары өсу жылдамдығымен оңтайлы температура аймағы бөлінеді. Осы көрсеткіштердің негізінде прокариоттар үш негізгі топқа бөлінеді: мезофилдер, психрофилдер және термофилдер. Белгілі түрлердің көпшілігі мезофилдерге жатады, оларда оңтайлы өсу температурасы 30 және 40 °С арасында жатыр, ал мүмкін өсетін температуралық диапазон 10 және 45-50 °С аралығында болады. Мезофильдерге қарапайым *E.coli*-дің төменгі өсу шекарасы +10 °, жоғарғы +49 °, құрамы бай ортада оңтайлы өсу температурасы +37 °С тең.

Психрофилдердің өсу температурасы - 10 - нан + 20 ° - ге дейін және одан жоғары болады. Өз кезегінде психрофилалар облигаттық және факультативтік болып екіге бөлінеді. Психрофильді микроорганизмдерге *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Cytophaga*, ашытқы, мицелиалды саңырауқұлақтар, балдырлардың кейбір топтары жатады.

Көптеген микроорганизмдер максималды даму температурасынан асып кетсе өсу қарқындылығы төмендейді. Микробтардың жылу тұрақтылығы түрлердің сипаттамаларына және тіршілік формаларына байланысты өзгереді: вегетативті клеткалар тезірек өледі, споралы клеткалар ұзақ сақталады. Сонымен, спорасыз бактериялар, спора түзетін бактерияларының вегетативті клеткалары, мицелиалды саңырауқұлақтар мен ашытқы 15-30 минут ішінде 60-70 ° С температурада 10-15 мин ішінде, ал 80-100 ° С-та бірнеше секунд немесе 1-3 минут ішінде өледі. Микроскопиялық саңырауқұлақтардың споралары 65-80 ° С температурада өледі. Көптеген бактериялардың споралары әлдеқайда тұрақты: олар бірнеше сағат бойы 80-100С дейін қыздырған кезде жойылады, ал 120 ° С температурада автоклавта - 20 минут ішінде жойылады.

Оттегіге қатысты барлық микроорганизмдер екі үлкен топқа бөлінеді: O₂ қатысуымен өсетін аэробтар (облигатты, факультативті аэробтар мен микроаэрофилдер) және оттегінің қатысуынсыз өсетін анаэробтар (аэротолерант, облигатты).

Аэробты микроорганизмдер үшін ортаның және газ фазасының ең жоғары жағдайын жасайды, себебі суда O₂ ерігіштігі аз. Анаэробтар үшін, керісінше,

оттегі ортасынан алып тастау және одан әрі анаэробты жағдайларды сақтау маңызды.

Ортасында оттегінің болу көрсеткіші Eh -тотықсыздану потенциалы болуы мүмкін, ол -500-ден +800 мВ-ға дейін өзгереді. Оның теріс мәні неғұрлым көп болса, қоршаған орта қалпына келеді (анаэробты жағдайлар).

Электромагниттік сәулелену толқын ұзындығына қарай иондаушы сәулеге (λ - және рентген сәулелері $\lambda < 200$ нм), ультракүлгін сәулеге, көрінетін аймаққа, инфрақызыл сәулеленуге және радио толқындарға бөлінеді. Сәулелену әсерінің сипаты бойынша олар төмендегідей бөлінеді: 1) физиологиялық әсері бар; 2) летальді және мутагендік әсері бар; 3) жылу және механикалық әрекетті бар.

Физиологиялық әсер ультракүлгін, жарық және инфрақызыл сәулелермен әсер етеді (350 - 400 - 800 - 1100 нм). Бұл, ең алдымен, фотосинтез - күн энергиясын химиялық энергияға айналдыру процесі. Әр түрлі фототрофты микроорганизмдер әр түрлі толқын ұзындығын алады. Электромагниттік толқындар фототаксистің көрінісі үшін маңызды. Фотосинтетикалық емес микроорганизмдерде фотосинтезге тәуелділері де кездеседі (мысалы, микобактерияларда каротиноидтардың пайда болуы).

Ультрафиолет толқын ұзындығы мен дозасына байланысты летальді де, мутагенді де әсер етуі мүмкін. Бұл ретте, ең алдымен ДНҚ молекулаларының зақымдануы байқалады (әсіресе $\lambda = 260$ нм кезінде).

Иондаушы сәуле жоғары энергиясы бар өте қысқа толқындармен ұсынылған. Мұндай сәулеленудің төмен деңгейі микроорганизмдерде мутация тудыруы мүмкін, ал жоғарғысы әрдайым өлімге әкеп соқтырады.

Ферменттерді зақымдайтын және зат алмасуының бұзылуына әкелетін микроорганизмдерге микробоцидті әсер ететін химиялық заттар тобына ауыр металл иондары, көміртегі оксиді, цианидтер, кейбір белсенді тотықтырғыштар – калий перманганаты, сутегі пероксиді, хлорлы әк, йод және басқалар жатады.

Антибиотиктер – (антибиотикалық заттар) - микроорганизмдердің, өсімдіктер мен жануарлардың метаболизмінің төмен молекулалық өнімдері немесе модификациялары, олардың өсуін тежейтін немесе басқа микроорганизмдердің дамуын толық тежейтін болып келеді. Қазіргі уақытта белгілі антибиотиктердің көпшілігі микроорганизмдердің клеткаларымен қалыптасады.

Тапсырма: микроорганизмдерге жоғары температураның, рН ортасының әртүрлі мәндерінің, ультракүлгін сәулелердің, осмотикалық қысымның және антибиотиктердің әсерін анықтау.

Зертханалық жұмыс 1.

Микроорганизмдерге жоғары температураның әсері

Спорасыз бактерияларға жоғары температураның әсері.

Су моншасын 80 °C-ға дейін қыздырады. Қатырылған ет-пептонды агары бар Петри табақшасын түбі жағынан үш секторға сызады, олар дақылдың қызуы уақыты бойынша (0-10-30) белгіленеді. Физиологиялық ерітіндіде (NaCl 0,85% ерітіндісі) 0 секторға бактериологиялық тұзақпен алдын ала дайындалған спорасыз бактерияларды (*Escherichia coli*) егеді, яғни қыздырусыз. Егу агардың бетінде штрих әдісімен жүргізіледі. Дақылы бар пробирканы су моншасына салып, 10 мин жылытады, одан кейін 10 секторға дақыл себеді. Шыны түтікті су моншасына қайта орналастырады, қосымша 20 мин жылытады және дақылдарды 30 секторына (жалпы дақылды жылыту уақыты) себеді. Петри табақшаларын 37°C температурада термостатқа салады.

Споралық бактерияларға жоғары температуралардың әсері.

Бұл бактериялардың ыстыққа төзімділігі (*Bacillus subtilis*) спорасыз бактериялардың термиялық төзімділігін анықтауға ұқсас анықталады.

Зең саңырауқұлақтарының өсуіне жоғары температуралардың әсері.

Бұрын дайындалған сусло-агары қатып қалған Петри табақшаларының түбінің жағынан – 5, 25, 40 (белгілер саңырауқұлақ өсіру температурасына сәйкес келеді) жазады және табақшаларды жоғары қаратып орайды. Алдын ала дайындалған пробирканы сулы суспензиясы бар зең саңырауқұлақтарының спорасын алады және табақшаның ортасында сусло-агардың бетіне суспензия тамшысын бактериологиялық тұзақтармен егеді. Егілген Петри табақшаларын тиісті температураларда (5, 25 және 40°C) дақылдарды өсіру үшін түбін жоғары қаратып қояды.

Нәтижелерді талдау. Термотұрақты-спорасыз және споралы бактерияларды анықтау үшін табақшалардың секторларын қарайды, өсудің болмауын немесе болуын анықтайды; өсу қарқындылығын тығыздығы бойынша және қабат ауданы бойынша көзбен шолу әдісімен анықтайды, бұл ретте мынадай белгілерді пайдаланады: "-" өсудің болмауы, "+" әлсіз өсу, "++" қалыпты өсу, "+++" жақсы өсу. Дақылдардың біртектілігін бақылау үшін барлық секторлардың дақылдарынан (бір табақшада бірнеше жағынды) фуксинмен боялған препараттарды дайындайды, микроскопиялайды және бояйды. Тәжірибе нәтижелерін 1-кестеге енгізеді.

1-ші кесте.

Жоғары температураның микроорганизмдерге әсері

Культураның аты	80 °C–тан кейінгі өсу деңгейі , мин			қорытынды
	0	10	30	
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Bacillus subtilis</i>				
Ескерту: "-" өсудің болмауы, "+" әлсіз өсу, "++" қалыпты өсу, "+++" жақсы өсу.				

Зең саңырауқұлағының дамуына температураның әсері мынадай көрсеткіштер бойынша зерттеледі: колониялар диаметрінің шамасы (табақшаның түбі жағынан миллиметрлік қағаз сызығымен өлшенеді) және споралардың болуы (колонияның боялған аймағының шамасы). Нәтижелер 2-кестеде сипатталады.

2-ші кесте.

Зең саңырауқұлағының дамуына температураның әсері

Дақылдарды температурасы, °C	өсіру	Саңырауқұлақтың қарқынды даму көрсеткіштері, мм	
		Колонияның диаметрі	Спора
40			
55			

Зертханалық жұмыс 2.

Ет-пептон сорпасында бактериялардың өсуіне рН ортасының әр түрлі мәндерінің әсері (МПБ)

Құрамында рН 3, 5, 7, 9 мәні бар стерильді ет-пептонды сорпа бар шыны пробиркаларды дайындайды. Әрбір пробиркаға стерильділік ережелерін қатаң сақтай отырып, бактериялық тұзақпен бактериялық дақылдарды (*Bacillus subtilis* немесе *Escherichia coli*) егеді. Пробиркаларды 37 °C температурада термостатқа салады.

Нәтижелерді талдау. Пробиркаларда өсудің болмауын немесе болуын анықтайды. Өсу қарқындылығы жасушалардың тығыздығы бойынша көзбен шолып бағалайды, бұл ретте келесі белгілерді пайдаланады: "-" "өсудің болмауы," + "әлсіз өсу," ++ "қалыпты өсу," +++ "жақсы өсу. Тәжірибе нәтижелерін кестеге енгізеді.

Дақыл біртектілігін бақылау үшін фуксинмен боялған, барлық пробиркалардан (бір заттық шыныда бірнеше жағынды) препараттар дайындайды, микроскопиялайды және суретін салып алады.

3-ші кесте.

Бактериялардың өсуіне ортаның әртүрлі рН мәндерінің әсері

Культураның атауы	рН орталар				Қорытынды
	3	5	7	9	
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Bacillus subtilis</i>					

Ескерту: "-" өсудің болмауы, "+" әлсіз өсу, "++" қалыпты өсу, "+++" жақсы өсу.

Зертханалық жұмыс 3.

Ультракүлгін сәулелердің (УФЛ) микроорганизмдерге әсерін зерттеу

МПА қоректік ортасы бар Петри табақшаларына 1 тамшы бактерия культураны тамызып, Дригаль шпательінің көмегімен жаймалайды. Содан кейін микроорганизмдердің тұтас газонының орталық бөлігіне стерильді трафарет салынады және ашық табақшаны сәулелендіру көзінен 10-20 см қашықтықта 20-30 мин кварц шамының сәулелендіру құралына қояды. Содан кейін трафаретті алып тастайды, табақшаларды жабады және 28 °С температурада инкубациялайды. Тәжірибе нәтижелері 5-7 тәуліктен кейін бақыланады. Микроағзалардың өсуі ультракүлгін сәулелердің әсерінен трафаретпен жабылған агар учаскесінде ғана көрінеді. Ортаның қалған бөлігі стерильді болады. Сәулелердің әсері сәулеленуге ұшыраған микроағзаның қашықтығына, уақытына және түріне байланысты болып келеді.

Нәтижелерді талдау. Микроағзалардың әртүрлі культураларына УК-сәуленің әсерін салыстыру. Бақылау нәтижелерін кестеге енгізу және сурет салу.

4-ші кесте.

Бактериялардың өсуіне УК-сәулелерінің әсері

Дақылдың атауы	УК- сәулемен сәулелену уақыты, мин		Қорытынды
	0	20	
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Bacillus subtilis</i>			

Ескерту : «-» өсу байқалмайды, «+» өсу бар.

Зертханалық жұмыс 4.

Ортадағы осмотикалық қысымға байланысты ашытқылардың орнын зерттеу

Ашытқы клеткасындағы плазмолиз

Тағамдық ашытқыларды дистилденген суда суспензияның шамалы лайлығына дейін сұйылтылады. Суспензия тамшысын заттықшыныға салып, оған ас тұзының бірнеше кристаллдарын енгізеді. Бірнеше минуттан кейін микроскопияланады (40X объективімен). Плазмолизденген клеткаларда протоплазма қабығынан бөлініп, шайылады. Микроскопиялық суретті салу керек.

Ас тұзы концентрациясының бактерияларға әсері

Құрамында әртүрлі концентрациядағы (0; 5; 10 және 20%-дық) NaCl бар МПБ бар үш пробиркаға бактериялар себеді. Түтіктерді 37 °С температурада термостатқа салады.

Нәтижелерді талдау. Пробиркаларда өсудің болуын немесе болмауын анықтайды; суспензия тығыздығы бойынша өсу қарқындылығын көзбен анықтайды. Өсу қарқындылығы клеткалардың тығыздығы бойынша көзбен шолып бағалайды, бұл ретте келесі белгілерді пайдаланады: "-" "өсудің болмауы," "+" "әлсіз өсу," ++ "қалыпты өсу," +++ "жақсы өсу. Тәжірибе нәтижелерін кестеге енгізеді.

Дақыл біртектілігін бақылау үшін фуксинмен боялған, барлық пробиркалардан (бір заттық шыныда бірнеше жағынды) препараттар дайындайды, микроскопиялайды және суретін салады.

5-ші кесте .

Ас тұзы концентрациясының бактерияларға әсері

Кульураатауы	NaCl, %				Қорытынды
	0	0,5	10	20	
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Bacillus subtilis</i>					
Ескерту: "-" өсудің болмауы, "+" әлсіз өсу, "++" қалыпты өсу, "+++" жақсы өсу.					

Зертханалық жұмыс 5.

Антибиотиктердің микроорганизмдерге диско-диффузиялық әдіспен және сериялық сұйылту әдісімен әсер етуін бағалау

In vitro бактерияларының антибиотик сезімталдығын анықтаудың негізгі әдістері: агарда (қағаз дискілер) диффузия, сериялық сұйылту әдістері, бета-лактамаза өнімдеріне, in vivo – микробсыз жануарлардың үлгілеріне қабілетін анықтау, қан мен несептегі антибиотиктердің концентрациясын анықтау.

Агардағы диффузия әдісі белгілі бір концентрацияда әр түрлі антибиотиктер сіңірілген стандартты дискілерді (терапиялық дозаға байланысты және ДДҰ ұсынымдарына сәйкес келеді), стандартты қоректік орта мен әдістерді пайдалануға негізделген. Нәтижелерді бағалау дискілер айналасындағы зерттелетін культуралардың өсуін бәсеңдету аймағының мөлшері мен тиісті антибиотиктердің (микроорганизмдердің сезімталдығы) минималды бәсеңдеткіш концентрациясының (МБК) мәндерінің арасындағы тәуелділіктің болуымен байланысты. Нәтижелерді бағалауға арналған арнайы кестелер бар, соған сәйкес культураларды сыналатын антибиотиктарға сезімтал, орташа тұрақты және тұрақты (резистентті) ретінде анықтайды.

Антибиотиктерді сериялық сұйылту әдісі МБК-ны дәл анықтауға мүмкіндік береді, бірақ қолайсыз болғандықтан сирек қолданылады.

Бета-лактамазды тест (бета-лактамазаның пайда болу қабілетін анықтау) гидролиз кезінде дискілердің түсін өзгертетін нитроцефин-цефалоспоринмен дискілер әдісімен жиі анықталады. Оң тест барлық бета-лактамаза - сезімтал пенициллиндерге бактериялардың резистенттілігін куәландырады.

Химиялық заттардың антибактериялық әсерін зерттеу үшін диско-диффузиялық әдіс қолданылады. Сенімді нәтижелер алу үшін стандартты дискілер мен қоректік ортаны қолдану қажет, оларды бақылау үшін тиісті микроорганизмдердің эталондық штамдары пайдаланылады.

Диск әдісі микроорганизмдердің агар полипептидті антибиотиктерге нашар диффундирленетін антибиотиктерге (мысалы, полимиксин, ристомицин) сезімталдығын анықтау кезінде сенімді деректер бермейді. Егер осы антибиотиктерді емдеу үшін пайдалану ұйғарылса, сериялық сұйылту әдісімен сезімталдықты анықтау ұсынылады.

Антибиотикті агарлы ортаға диффузия жасау әдістері

Классикалық диффузия әдісі. Жаңа дайындалған және 20 мин бойы кептірілген орта 37°C кезінде жаңа өскен колониялардың біркелкі қабатымен себіледі. Ол сіңірілгеннен кейін тескішпен шұңқырлар жасайды, оларға 0,1 мл-ден сыналатын микробқа қарсы препараттардың ерітіндісін енгізеді және табақшаның түбін жоғары қаратпай, абайлап термостатқа ауыстырады. 18

сағаттан кейін антибиотиктердің белсенділігін тест-микробтың өсуін бәсеңдету аймағының диаметріне қарай, олар бар шұңқырлардың айналасында анықтайды.

Диско-диффузиялық әдіс. Петри табақшасындағы агардың бетіне белгілі бір тығыздықтағы бактериялық суспензия жағылады (әдетте McFarland бойынша 0,5 лайылық стандартына эквивалентті) Дайындалған суспензияның тығыздығы 1-2·10⁸ КОЕ/мл *Escherichiacoli* концентрациясына сәйкес болуы тиіс. Бұл концентрация Макфарленд бойынша 0,5 оптикалық тығыздығына сәйкес келеді. Мұндай тығыздықты Л. А. Тарасевич ГИСК стандартының оптикалық тығыздығы 5 бірлік болатын бактериялық суспензияны 2 рет сұйылту кезінде алуға болады. Дайындағаннан кейін 15 минут ішінде газон алу үшін суспензияны агардың бетіне себеді. Осы мақсатта ұстағышта стерильді мақта тампондарын пайдалануға болады. Тампонды бактериялық суспензияға бір рет салып, сұйықтық үстіне пробирканың ішкі бетіне сығады. Содан кейін әр жолы табақшаны 60°С-қа бұра отырып, тампонмен агардың барлық бетіне үш рет штрих әдісімен себеді. Соңында сол тампонмен агардың бетін табақша қабырғасына айналдыра себеді. Бөлме температурасында табақшаларды 15-20 мин бойы ұстағаннан кейін стерильді анатомиялық пинцетпен ортаның бетіне табақшаның шетінен 2,0-2,5 см қашықтықта 5-6 индикаторлық диск салу керек. Диск пинцеттің ұшымен, диск пен ортаның арасында ауа кеңістігі болмауы үшін сәл қысылады. 30 минут бойы табақшаларды бөлме температурасында қайтадан ұстайды, содан кейін төңкерілген күйінде 18-24 сағатқа термостатқа салады.

Нәтижелерді талдау. Культуралардың сезімталдығы 10-кесте бойынша стерильді аймақтардың диаметрлерін мм өлшеуден кейін бағаланады.

11-кесте.

Микроорганизмдердің антибиотиктерге сезімталдығын дискілер мен сериялық сұйылту әдістерімен анықтау нәтижелерін бағалау

Антибиотик	Диск әдісі: өсудің тежелу аймағының диаметрі			Сериялық сұйылту әдісі: ең аз тежегіш концентрациясы мкг / мл	
	Тұрақты	Орташа тұрақты	Сезімтал	Тұрақты	Сезімтал
Бензилпенициллин	≤ 20	21-28	≥ 29	-	≤ 0.1
Ампициллин	≤ 20	21-28	≥ 29	-	≤ 0.2
Карбенициллин	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 32	≤ 16
Метициллин	≤ 13	14-18	≥ 19	-	≤ 3
Оксациллин	≤ 15	16-19	≥ 20	-	≤ 3
Цефалексин	-	-	-	≥ 32	≤ 10
Цефалотин	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 32	≤ 10
Стрептомицин	≤ 16	17-19	≥ 20	≥ 15	≤ 6

Неомицин	≤ 12	13-16	≥ 17	-	≤ 10
Канамицин	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 25	≤ 6
Мономицин	≤ 13	14-17	≥ 18	-	≤ 10
Гентамицин	≤ 15		≥ 16	≥ 6	≤ 4
Тетрациклин	≤ 16	17-20	≥ 22	≥ 12	≤ 2
Эритромицин	≤ 17	18-21	≥ 22	≥ 8	≤ 2
Линкомицин	≤ 19	20-23	≥ 24	≥ 8	≤ 2
Левомецетин	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 16	≤ 8
Рифампицин	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 8	≤ 2
Полимиксин	≤ 11	12-14	≥ 15	≥ 50 Ед/мл	-
Ристомицин	≤ 9	10-11	≥ 12	-	≤ 5

11-кестені пайдалана отырып, алынған нәтижелер мен мәліметтерді бағалау 12-кестеге енгізу.

12 кесте.

Зерттелетін культуралардың антибиотикке сезімталдығын бағалау

№ п/п	Антибиотиктің атауы	Өсудің кідіріс диаметрі (мм)	Тұрақты	Орташа тұрақты	Сезімтал
1					
2					

Зертханалық жұмыс 6.

Пенициллин мен стрептомициннің әртүрлі концентрацияларының *Escherichia coli* және *Bacillus subtilis* өсуіне әсері

Тығыз ортадағы титрлеу (сериялық сұйылту) әдісі

Антибиотиктердің сериялық сұйылтуын дайындау. Ол үшін 1000000 бірліктен стрептомицин мен бензилпенициллин тұзын (тиісінше 1 г және 0.5 г ұнтақты) 10 мл судан тұратын пробиркаларда еріту керек. Антибиотиктердің концентрациясы - 100000 бірлік/мл. Содан кейін алдыңғы сұйылтудан әрбір антибиотиктің 1 мл ерітіндісінен стерильді пипеткамен алып, 10 мл стерильді су қосылған пробиркаларға енгізу, осылайша антибиотиктердің концентрациясы 10000 бірлік/мл құрайды. Бұдан әрі келтірілген схема бойынша антибиотиктерді концентрациясы - 1000 бірлік/мл, 100 бірлік/мл және 10 бірлік/мл сұйылтуды дайындау.

4 мл-ден балқытылған және салқындатылған агаризацияланған ортадан тұратын пробиркаларға стерильді пипеткамен (10000 бірлік/мл, 1000 бірлік/мл, 100 бірлік/мл, 10 бірлік/мл) енгізу, пробиркаларды агар қатқанға дейін ору.

Тұзақпен тығыз ортаның бетіне *Escherichiacoli* және *Bacillussubtilis* культураларының жүзіндісін себу.Егістерді 18-20 сағат өсіру.Антибиотиктердің әр түрлі концентрациясында микроорганизмдердің өсу қарқындылығын белгілеу. Өсу қарқындылығын жасушалардың тығыздығы бойынша көзбен шолып бағалайды, бұл ретте келесі белгілерді пайдаланады: "- "өсудің болмауы," + "әлсіз өсу," ++ "қалыпты өсу," + + + " жақсы өсу".Тәжірибе нәтижелерін кестеге енгізеді.

13 кесте.

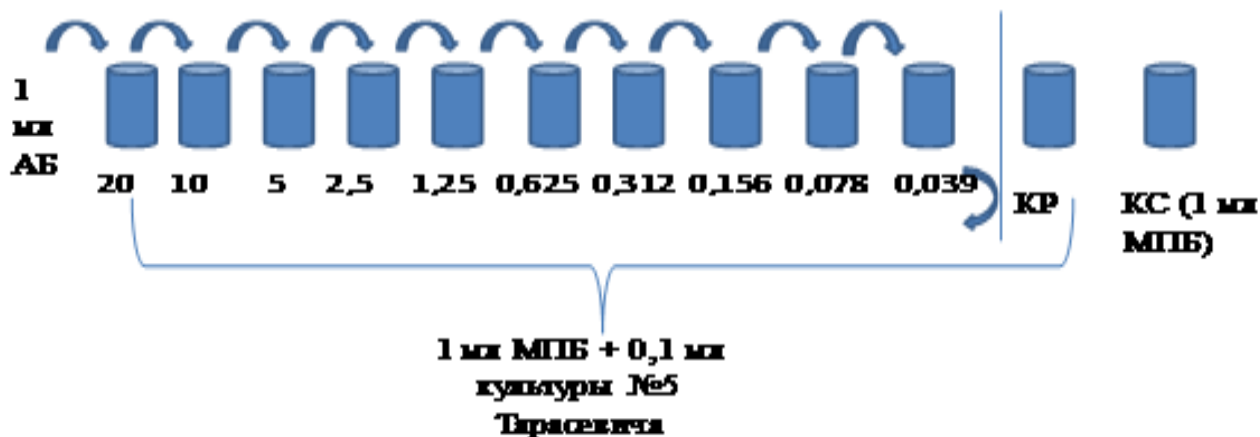
Пенициллин мен стрептомициннің әртүрлі концентрацияларының микроорганизмдерге әсері

антибиотик	концентрация	<i>Escherichiacoli</i>	<i>Bacillussubtilis</i>
стрептомицин	10000		
	1000		
	100		
	10		
бензилпенициллин	10000		
	1000		
	100		
	10		
Ескерту: "- "өсудің болмауы," + "әлсіз өсу," ++ "қалыпты өсу," + + + " жақсы өсу"			

Сұйық ортада титрлеу (сериялық сұйылту) әдісі

Осы әдіспен зерттелетін бактериялар культурасының (*Escherichiacoli* и *Bacillussubtilis*) өсуін тежейтін антибиотиктің минималды концентрациясын анықтайды. Алдымен антибиотиктің белгілі бір концентрациясы бар негізгі ерітіндіні (мкг/мл немесе Ед/мл) арнайы еріткіште немесе буферлік ерітіндіде дайындайды. Одан кейін сорпада (1 мл көлемінде) барлық келесі сұйықтарды дайындайды, одан кейін әрбір сұйылтуға 1 мл-де 10⁶-10⁷ бактериялық жасушалары бар зерттелетін 0,1 мл бактериялық суспензия қосылады. Соңғы пробиркаға 1 мл сорпа және 0,1 мл бактериялардың суспензиясы (культураларды бақылау) енгізіледі. Егістерді келесі күнге дейін 370С-та инкубациялайды, содан кейін культураны бақылаумен салыстыра отырып, қоректік ортаның лайлануы бойынша тәжірибе нәтижелерін атап өтеді. Мөлдір қоректік ортасы бар соңғы пробирка бактериялардың зерттелетін культурасының өсуінің тежелуін (*Escherichiacoli* және *Bacillussubtilis*), құрамындағы антибиотиктің минималды

тежейтін концентрациясының (МТК) ықпалымен көрсетеді.



Сурет 2. Антибиотиктің минималды тежегіш концентрациясын (МТК) анықтау.

Материалдар мен жабдықтар: МПА, Сабуро бар Петри табақшалары; МПБ пробиркалары; стерильді құбыр суы бар пробиркалар; бактерия және ашытқылар суспензиясы, лайлану стандарттары; антибиотикты дисктар; бактериялық тұзақ; 1 мл пипеткалар; Дригальский шпателі; стерильді мақта тампондары; пинцеттер; стрептомицин және бензилпенициллин тұзы, спирт шам.

Зертханалық жұмыстарды орындау жоспары:

1 сабақ. Микроорганизмдерге жоғары температуралардың әсерін бағалау үшін тәжірибе қою.

2 сабақ. Микроорганизмдерге жоғары температуралардың әсерін бағалау бойынша тәжірибеге талдау жүргізу, кесте құру.

3 сабақ. Ортаның әртүрлі рН мәндерінде және ультракүлгін сәулелердің әсерінде бактериялардың өсуін зерттеу бойынша тәжірибе қою.

4 сабақ. Бактерияларға ультракүлгін сәулелер мен ортаның рН әсерін зерттеу бойынша тәжірибеге талдау жүргізу. Алынған нәтижелерді кестеге енгізу.

5 сабақ. Микроорганизмдердің өсуіне осмотикалық қысымның әсерін анықтау мақсатында тәжірибе қою

6 сабақ. Осмотикалық қысымның микроорганизмдердің өсуіне әсерін анықтау бойынша алынған нәтижелерді кестеге енгізу. Алынған деректерге салыстырмалы талдау жүргізу, есеп дайындау.

7 сабақ. Пенициллин мен стрептомициннің *Escherichiacoli* және *Bacillus subtilis*-диффузиялық әдіспен өсуіне әсерін анықтау бойынша тәжірибе қою.

8 сабақ. Пенициллин мен стрептомициннің *Escherichiacoli* және *Bacillus subtilis*-диффузиялық әдіспен өсуіне әсерін бағалау. Пенициллин мен

стрептомициннің әртүрлі концентрацияларының Escherichiacoli және Bacillussubtilis өсуіне әсерін анықтау мақсатында тәжірибе қою.

9 сабақ. Бактериялар культураларының өсуін тежейтін (Escherichiacoli және Bacillussubtilis) антибиотиктердің минималды концентрациясын анықтау.

Бақылау сұрақтары:

1. Табиғатта микроорганизмдердің таралуына ортаның қандай факторлары әсер етеді?
2. Қандай физикалық және химиялық факторлар микроорганизмдерді неғұрлым қатты басады?
3. Стерильдеу, дезинфекция жүргізу кезінде қандай мақсаттар қойылады?
4. Молекулалық оттеке микроорганизмдердің қатынасы қандай?
5. Антимикробты заттар әсер ету механизмі бойынша қалай ерекшеленеді?

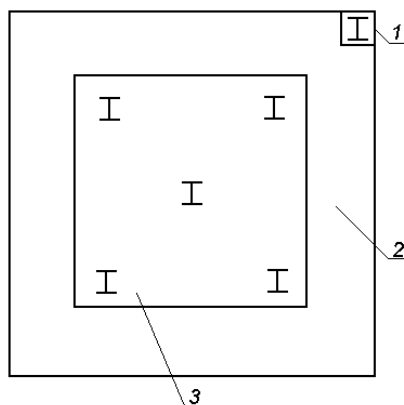
Зертханалық жұмыс 7.

Топырақтың биологиялық белсенділігін аппликациялық әдіспен анықтау

Әдіс принципі белгілі бір мерзімге (1,2,3 ай) тікелей далалық жағдайларда топыраққа салынған целлюлоза массасының жоғалуын анықтауға негізделген.

Ақ мақта-мата целлюлозасының немесе топырақта сүзгіш қағаздың ыдырау белсенділігін анықтау бойынша тәжірибе қою.

Ақ мақта-матаны (крахмал емес) немесе сүзгіш қағазды қажетті көлемде (5 10, 10 15 см және т.б.) қайшымен кесу. Әрбір жолақты қарапайым қарындашпен бұрыштары мен ортасында нөмірлеу (8 сурет), техникалық таразыларда өлшеу және журналда массасын жазып алу керек. Шыны пластинкаларды, жуылған рентген пленкасын немесе эмульсиялық қабаттан босатылған фотопластинканы, өлшемі 6×16, 13×18 см және т.б., яғни мата немесе қағаз жолақтарынан сәл артықтау етіп алу. Әрбір шыныға немесе пленкаға өлшенген матаның немесе қағаздың жолағын салып, оны шыныға немесе пленкаға капрон жіптермен байлау. Матадан немесе қағаздан бос шыны немесе пленканың бұрыштарына, матаның немесе қағаздың тілімінің нөмірі бар қағаздың шағын квадратын, изолентамен бекіту (8 сурет). Осылай дайындалған матамен немесе қағазбен пластиналарды, көлемі шыныдан немесе пленкадан сәл артық (3-4 см) сирек торы бар шыны матасынан жасалған қаптарға салу және 120°C-та 1 сағат кептіргіш шкафта стерильдеу. Егер микроорганизмдердің толық түрлік құрамын зерттемесе, онда мата жолақтары немесе сүзгіш қағазы бар және стерилизациясыз пластинкаларды қоюға болады, бірақ міндетті түрде оларды үтікпен басып алу қажет. Шыны маталы қаптарға салмауға болады.



Сурет 8. Матаның немесе сүзгіш қағаздың жолағын нөмірлеу және оларды шыны немесе фотопленкаға бекіту: 1 – шыныда және матаның өзін де матаның жолағын нөмірлеу; 2 – шыны немесе фотопленка; 3 – матаның немесе сүзгіш қағаздың жолағы.

Содан кейін целлюлозасы бар бұл пластинкалар зерттеушіге қажетті тереңдіктермен жаңа қазылған топырақ қималарының қабырғаларында жасалған тік орналасқан саңылауларға немесе қуыстарға, жыртылған немесе жыртылмаған қабатқа салынады. Әр қабатқа тегістелген қабырғаға кемінде 5 матамен немесе сүзгіш қағазбен пластинкаларды салу, пластиналар осы учаскеге қойылған кезін және нөмірлерін жазу. Мата қиманың енсіз қабырғасына қаратылып, зерттелетін топыраққа тығыз жанасуы тиіс. Ол үшін барлық қабырғаларды (немесе тек біреуін) топырақ пышағымен тегістейді, оны топырақтың ұқсас қабатына 3-4 рет батыру арқылы алдын ала зарарсыздандырады. Егер сүзгісі немесе матасы бар пластинкалар 0-10см қабатқа қойылса, онда пышақты да осы жерде стерильдейді, ал егер жыртылған қабатқа қойылса, онда пышақты да осы жерде стерильдейді. Пластинаны топырақ тілігіне қойған кезде шыны матадан жасалған қаптың бір бөлігі топыраққа салынатын матадан немесе қағаздан қарама-қарсы жаққа қарай бүгіледі.

Пластинаның сыртқы жағындағы тілікті одан алынған топырақпен бітейді. Алаңның гектарлық ауданындағы жүз метрлікті таңдап, оған пластинкаларды диагональ бойынша немесе конвертпен қояды. Матамен немесе сүзгілермен пластинкаларды зерттеу мақсатына байланысты 1, 2 айға және одан да көп уақытқа топырақта қалдыруға болады немесе кез келген нүктеде (диагональ немесе конверт бойынша) ай сайын 5 қайталаудан алып тастауға және целлюлозаның уақыт бойынша ыдырау қарқындылығын белгілеуге болады.

Пластинкаларды алғаннан кейін қағаздың немесе матаның жағдайын, түсін, қоныстану қарқындылығын, өсіп шыққан микроорганизмдер колонияларының түрі мен түсін сипаттау қажет.

Содан кейін матаны немесе қағазды шыныдан немесе пленкадан бөліп, мұқият топырақ бөлшектерінен тазартып, тұрақты массаға дейін кептіреді, массадағы жоғалтуларды, целлюлозаның бастапқы массасынан ыдырау пайызын

анықтайды. Қағаз немесе мата бар пластинкалардың бір данасын ай сайын бақылау үшін қалдырады. Демек, егер бақылау мамыр айынан қыркүйек айына дейін жүргізілсе, әр учаскеден 4 пластина қалуы тиіс: мамыр, маусым, шілде және тамыз.

Ұсынылған тест өсімдік қалдықтарымен топыраққа түсетін клетчатканы бұзу сияқты жаһандық үдерістің қарқындылығын өте жақсы көрсетеді, өйткені бұл клетчатканың ыдырау өнімдерін қоректену және энергия көзі ретінде пайдаланатын микроорганизмдердің көптеген топтары үшін негізгі процесс. Бұл процестің қауырттылығын біле отырып, басқа да микробиологиялық процестер туралы, яғни топырақтың биологиялық жай-күйі туралы түсінік алуға болады.

Матасы бар пластинкалар ұзақ мерзімде топырақта болғандықтан, алынған деректер топырақтың уақыттағы биологиялық жағдайын сипаттайды, бұл қандай да бір жауапты кезеңде топырақтың биологиялық белсенділігі туралы нақты түсінік алуға мүмкіндік береді, мысалы, агроценоздағы өсімдіктердің белгілі бір даму фазасында. Белгілі бір учаскенің топырағында матаның немесе қағаздың белсенді ыдырауы кезінде оны өсімдіктердің минералдық қоректену элементтерімен қамтамасыз етілген деп есептеуге болады.

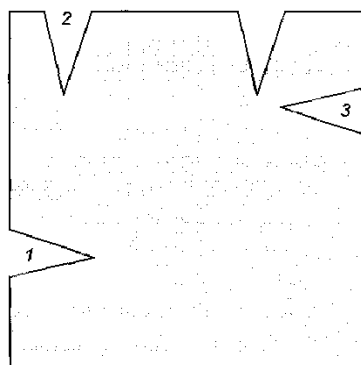
Сүзгілері немесе матасы бар барлық пластинкаларды скотчпен қағаз парағына бекітіңіз, зерттеу жүргізген кездегі тегіңізді, культураны және бақылау кезеңін жазыңыз. Институттағы сабақтарда микроорганизмдерге талдау жасап, топырақтың биологиялық белсенділігі туралы қорытынды жасау керек.

Топырақтың ферментативті белсенділігін анықтау (протеолитикалық белсенділік).

Протеолитикалық ферменттердің белсенділігін анықтау үшін негативті фотоматериалдар қажет: фотоқағаз, рентгенопленка немесе фотопленка. Протеазды белсенділік көрсетілген материалдар эмульсиясының бұзылу дәрежесі бойынша бағаланады, өйткені эмульсияның негізгі жабыстырғыш материалы желатин болып табылады. Әдіс принципі протеолитикалық ферменттердің әсерінен құрамында азотты желатин бар заттар массасының азаюын анықтауға негізделген.

Тәжірибе қою. Көрінбеген фотопленканы, рентген пленкасын немесе басқа фотоматериалдарды пайдалану. Түрлі көлемдегі көрінген фотоматериалдарды да алуға болады. Жиі 5×10 или 5×15 кесінділерін қолданады. Екінші жағдайда пленка ауданы 75 см^2 -тең. Ондағы таза желатиннің салмағы 750 мг.

Пленканы қайшымен бірдей жолақтарға кесу (5×15 см немесе топырақ қабатының көлемі бойынша), нөмірлеу, бүйір және жоғарғы жағынан кесінділер жасау керек. Жоғарғы жағындағы бір тілік 10, жоғарғы оң жақ бүйірінде - 1, пластинканың сол жақ бөлігінде төменнен 100 білдіреді. Мысалы, төменгі сол жағындағы 1 тілік - 100, жоғарғы жағындағы 2 тілік - 20, оң жақ бүйіріндегі бір тілік - 1. 121 нөмірін аламыз (9 сурет).



Сурет 9. Протеолитикалық белсенділікті анықтау үшін пайдаланылатын фотоқағаз, фотопенка немесе рентгенопенка: 1 - жүзді білдіретін сол жақтағы тілік; 2 – жоғарыдан ондықты білдіретін тілік; 3 - бірлікті білдіретін оң жақ жоғарыдан тілік.

Пленканы белгілі бір мерзімге (7 немесе 10 күн) топырақ қимасының қажетті қабатына қою керек. Содан кейін ісіп қалған желатина қабатынбұзбай, пленканытопырақтаналыптастау қажет. Пленканың бір жағынан топырақ қабатын қайырып, фотопенканы немесе рентгенопенканы мұқият алып тастау қажет. Егер мүмкіндік болса, осындай тәсілмен дайындалған фотоматериалдарды топырақтың төгілуінің алдын алу үшін барлық ұшынан тігілген дәке немесе капрон қаптарда топыраққа қоюға болады. Кейін мұндай пластинкаларды өңдеу және топырақтан тазарту оңай.

Зертханада тәжірибеден кейін жабысып қалған топырақты пленкадан мұқият алып тастау қажет. Сонымен қатар ферменттің әсеріне ұшыраған желатина қабаты да артта қалады. Пленкада қалған топырақты кранның астында сумен шайып, пленкаларды бөлме температурасында кептіреді және ауа-құрғақ күйінде аналитикалық таразыларда өлшейді. Тәжірибеге дейінгі және одан кейінгі массадағы айырмашылығы бойынша ферменттің белсенділігі немесе ақуыздардың минералдануының қарқындылығы туралы айтады. Ферменттің белсенділігін ыдыратылған желатиннің миллиграммаларында және оның пленкадағы бастапқы құрамының пайызында есептейді.

Салыстырмалы түрде осы микробиологиялық тест бойынша бағалауды визуалды да пайдалануға болады, сондай-ақ топырақтан пленкалар алынғаннан кейін бірден топырақтың қол жетімді азотпен қамтамасыз етілуін бағалауға болады. Бұл пленкаларды бір мезгілде қою және оларды әр түрлі ауыспалы алаңдардан немесе әр түрлі өңдеу нұсқаларынан алу кезінде маңызды.

Бұл тест құрамында азот бар органикалық заттардың ыдырау процестерінің кернеулігін сипаттайды. Ол целлюлозаның ыдырауы бойынша тест сияқты қасиеттерге ие, орындаудың үлкен қарапайымдылығымен ерекшеленеді және микроорганизмдердің ақуыздарды сіңіруге жоғары және кең таралған қабілеттерінің салдарынан қысқа болса да уақыт бойы жақсы жұмыс істейді.

Рентген пленкасының желатинасының ыдырауы қарқынды жүріп жатқан жерде топырақ қол жетімді аммоний азотымен жақсы қамтамасыз етілген деп есептеуге болады.

Жалпы қаралған микробиологиялық тесттер агроценозда немесе көміртегі мен азоттың фитоценозында айналысуға байланысты үдерістердің кернеулігін, күрделі органикалық заттардың ыдырау белсенділігінің деңгейін (клетчатканың ыдырауы және протеолитикалық белсенділік) және осы заттардың минералдану процестерінің деңгейін (топырақтан көмірқышқыл газының бөлінуі) сипаттайды. Атап өтілгендей, олар салыстырмалы түрде жұмыс жүргізу үшін, мысалы, ауыспалы егіс алқаптарын, суарудан кейінгі топырақ жағдайын, топырақтың эрозиялану дәрежесін, топырақты өңдеудің әртүрлі нұсқаларын бағалау үшін ұсынылады.

Топырақтан алынған фотопленканы, рентген пленкасын немесе фотоқағазды тығыз қағаз парағына скотчпен бекітіңіз. Алаңның атауын (культурасын), өз тегіңізді жазып алыңыз және оны практикалық сабақтарда пайдалану үшін институтқа алып келіңіз.

ҚОРЫТЫНДЫ

Микроорганизмдердің қазіргі заманғы экологиясы-микроорганизмдер жасушаларының құрылымдық-морфологиялық ерекшеліктері, оларды жүйелеу, прокариоттардың метаболизмі, сондай-ақ биосфераның бөлігі ретіндегі микроорганизмдер әлемінің әртүрлілігі, оның тұрақты дамуындағы олардың рөлі туралы ғылым. Микроорганизмдер экологиясының негіздерін білу олардың тіршілік ортасындағы тіршілік әрекетін реттеуге, әртүрлі микроорганизмдер арасында және басқа организмдермен өзара қарым-қатынаста туындайтын қарым-қатынаста бағдарлануға мүмкіндік береді. Экология негіздерін меңгеру микробиологияны әрі қарай өз бетінше зерттеу мүмкіндігін қамтамасыз етеді, студенттердің микроорганизмдердің сапрофитті культураларымен эксперименттік жұмыс істеу дағдылары мен біліктерін дамытуға ықпал етеді.

Бұл пән студенттерде микроорганизмдерге химиялық, физикалық және биологиялық факторлардың әсер ету механизмдері және антибиотикорезистенттілікті қалыптастыру механизмдері, микроорганизмдердің метаболизмі және оны реттеу, прокариоттардың іс-тәжірибедегі негізгі физиологиялық заңдылықтарын пайдалану, адам өміріндегі және табиғаттағы микроорганизмдердің маңызы туралы білім жүйесін қалыптастыруға көмектеседі; ғылымның негізгі эксперименталды әдістерін, әртүрлі прокариоттар топтарын өсіру ерекшеліктерін анықтау.

Қолданылған әдебиеттер

1. Нетрусов А.И. Введение в биотехнологию. М., «Академия», 2014.
2. Шигаева М.Х., Цзю В.Л. Общая микробиология. Алматы. Изд-во Казак университеті. 2008. 320с.
3. Игнатова Л.В., Бержанова Р.Ж., Мукашева Т.Д. Основы физиологии. Алматы. Изд-во Казак университеті. 2013. 120с.
4. Пилькевич Н.Б., Виноградов А.А., Боярчук Е.Д. Основы микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений. - Луганск: Альма-матер, 2008. - 192 с.
5. Dr. Abdelraouf Elmanama. General Microbiology Manual. - 2009. – 137.