

## Зертханалық сабақ 1.

### Микробиологиялық зертханада жұмыс істеу ережелері. Микроскоптау техникасы. Микробиологиялық препараттар дайындау

Микробиологиялық практикада химиялық шыныдан жасалған ыдыс кеңінен қолданылады. Онымен жұмыс істеу кезінде сақ болу керек. Сынған ыдыстың сынықтарын мұқият тазалаңыз. Талдауда сілтілер мен қышқылдардың күшті ерітінділері жиі қолданылады. Олармен үлкен сақтықпен жұмыс істеу керек, өйткені бұл заттар қол мен киімге зиянды әсер етеді. Егер қышқыл кездейсоқ төгілген болса, оны көп мөлшерде сода құйып, бірнеше рет сумен жуу керек. Төгілген сілтіні сұрту керек, ал ол түскен заттарды сірке қышқылының әлсіз ерітіндісімен өңдеу керек. Қышқылдар немесе сілтілер адам терісіне тиген кезде оларды судың көп мөлшерімен жуу қажет.

Микробиологиялық зертханада тірі микроорганизмдермен жұмыс істейді. Негізгі жұмыстар стерильді жүргізіледі, яғни бөгде микробтарды жұқтырмауы тиіс микроорганизмдердің бір дақылы жұмыс істейді. Егу жүргізгеннен кейінгі жұқтырудың алдын алу үшін стерильдеудің арнайы әдістері қолданылады. Сонымен қатар зертханада тазалық сақтау маңызды. Микроорганизмдер дақылдары бар ыдыс ашық қалмауы тиіс. Микроорганизмдердің биомассасы, егер ол талдау үшін қажет болмаса, автоклавта стерилизациядан кейін ғана шығарылады. Микроағзалардың егілуін газ немесе спирт шамының жалынында жүргізеді, сондықтан күйіп қалудан сақтану керек. Егер микробтарды егу кезінде мақта тығын, спиртовка немесе қағаз кездейсоқ жанса, от ылғалды сүлгімен сөндіріледі. Аса ірі жану ошақтарында өрт сөндіргіш құрал қолданылады.

Пайдаланылған пипеткалар, заттық және жабынды шынылар, шпательдер және т.б. дезинфекциялық сұйықтығы бар ыдысқа салынады.

Микробиология бойынша практикалық әдістерді меңгеруден бұрын микробтық культуралармен жұмыс жасаудың техникалық қауіпсіздік бойынша бірнеше қарапайым ережелерін есте сақтау қажет. Оқу зертханасында патогенді микроорганизмдердің культураларымен жұмыс жасалмаса да әрбір студент техникалық қауіпсіздік бойынша барлық талаптарды орындау керек және дұрыс жұмыс жасау тәртібін үйрену қажет.

1. Зертханада жұмыс жасағанда міндетті түрде арнайы киім – халатты киюді ұмытпау керек.
2. Кез келген зертханадағыдай микробиологиялық зертханада да тамақ жеуге, темекі шегуге, айқайлап шулауға, жүгіруге болмайды. Үзіліс кезінде зертхана ғимаратында отырмау қажет.
3. Негізгі қауіп – микроорганизмдердің тірі культуралары. Сондықтан да алдын ала жұмыс орынын дайындап алған соң асықпай тапсырмаларды орындау үшін жұмысқа кірісу керек.
4. Жұмыс орнында отырып және денені жұмыс үстеліне қарай еңкейтпей жасау керек. Зертханалық үстелдің жұмыс жасау бетіне міндетті түрде тура тіке қарап отыру қажет және өзінің қолының қимылын бақылай алу керек.
5. Микробты культуралары бар барлық пробиркалар штативтерде тұру керек. Үстелдің бетіне горизонтальды жайып тастамау керек. Пробиркасы бар штатив жұмыс жасаушы адамның сол жағында (егер солақай адам болса оң жағында) тұруы керек. Пробирканы сол қолмен алып, ал оң қолда негізгі микробиологиялық құрал – бактериологиялық тұзақты ұстау керек.
6. Бактериологиялық тұзақтың көмегімен жұмыс істеген соң қолға қосымша қорғану үшін резіңке қолғапты кию қажет емес.
7. Егер де студент микроорганизмдермен жұмыс жасау барысында қолға микробтық культураның сұйықтығын құйып алса мұғалімге айту керек. Ары қарайғы іс-әрекеттің реті келесі: оқу аудиториясында үнемі болатын дезинфектанттың ерітіндісімен жұмыс жасаған үстелдің бетін (жуу немесе сұрту) өңдеу керек, ал қолды қосымша сабындап сумен жуу керек.
8. Бактериологиялық тұзақты залалсыздандырған кезде тұзақты тек пластмасса ұстағышпен ұстау керек және қолды еш уақытта тұзаққа тигізбеуді ұмытпау қажет. Тұзақ микробтық культура тұратын штативте тұруы керек. Еш уақытта тұзақты микробтық культураның қалдығымен жұмыс үстелінің бетінде қалдырмаңыз – бұл қоршаған ортадағы заттарға және тіпті жұмыс жасаған адамның қасында отырған адамға да жұғатындығы – маңызды факторы. Кез келген іс-әрекеттің алдында және жұмыс жасап біткен соң тұзақты міндетті түрде залалсыздандырыңыз.
9. Микробиологиялық зертханада спирт шамының ашық отында жұмыс жасалатындықты ұмытпау керек. Спирт шамымен жұмыс істеу кезінде шашы ұзын студенттер шаштарын жинау немесе арнайы бас киім кию керек. Спирт шамын тек нақты бір істі жасау кезінде ғана, яғни микроб куль-

турасының үлгісін егуді бастағанда және т.б. жағу қажет. Студенттер әрқашан микроорганизмдермен жұмыс істеп тұрғанын үнемі есте сақтауы тиіс. Сондықтан сабақ соңында студенттер жұмыс орнын ретке келтіріп, қолды сабынмен жууы керек.

Электр желісінің ақаулығы кезінде электр аспаптарын және олардың орталықтандырылған электр қорегін сөндіру қажет.

### **Зертханалық сабақтарды безендіруге және мазмұнына қойылатын талаптар**

Әрбір студент зертханалық сабақтарды жеке дәптерлеріне жазады.

Әр студенттің зертханалық жұмыс дәптері бірінші зертханалық жұмыстан бастап көрсетіледі.

Әрбір зертханалық жұмыс келесі құрылымда болу керек:

- зертханалық жұмыстың аты;
- сабақтың мақсаты;
- керекті материалдар мен құрал-жабдықтар;
- алынған нәтижелер мен талдаулар: а) тапсырманың аты; ә) зертханалық жұмысты жасау

барысында әр студент жеке алған тәжірибелік материал немесе нәтиже тиісті кестелерде көрсетілгендей;

- қорытынды;
- бақылау сұрақтары.

### **Микробиологиялық препараттар дайындау.**

Препараттарды заттық шыныларда дайындайды. Ең алдымен заттық шынының бетін дайындап алу керек. Шынының беті тазаланған немесе майсызданған болуы керек. Майсыздандырудың ең тиімді жолы – шыныларды хром қоспасымен өндеп, су және спиртпен шаю. Ал күнделікті жұмыста құрғақ шыныны сабынмен жуып, таза сүрткішпен сүрту жеткілікті.

#### **Тірі клеткалардың препараттары. «Жаншылған тамшы» препаратын дайындау әдісі.**

«Жаншылған тамшы» препараты микроорганизм клеткаларының пішінін, олардың мөлшерін және орналасуын, спора түзулерін, қозғалғыштықтарын зерттеу үшін қолданылады.

Таза, майсыздандырылған заттық шынының ортасына сұйық қоректік ортада өсірілген микроорганизмдер дақылдың үлгісінің тамшысын тамызады да, үстінен жабынды шынымен абайлап жабады. Тамшы жұқа қабатпен жабынды және заттық шыны арасындағы кеңістікті толтырады.

Тығыз қоректік ортада өсірілген микробтар дақылдан препаратты дайындау үшін алдымен заттық шыныға стерильді судың тамшысын тамызады, содан кейін оған зерттелетін микроорганизмдердің аз мөлшерін бактериологиялық тұзақпен салады да, абайлап араластырып, үстінен жабынды шынымен жабады. Содан кейін микроскоп арқылы қарап зерттейді

#### **«Ілінген тамшы» препаратын дайындау әдісі**

«Ілінген тамшы» препараты микроорганизмдердің көбеюін бақылауда, споралардың түзілуін және дамуын зерттеуде, сонымен қатар қозғалғыштықты бақылауда қолданылады. Бұл препаратты дайындау үшін ортасында арнайы ойығы бар заттық шыны қолданылады. Жабынды шынының бетіне вазелин жағады, ал ортасына бактериалды дақылдың тамшысын енгізеді. Одан кейін тамшы ойықтың ортасында тұратындай етіп заттық шыны үстіне жабынды шыныны жабады. Тамшы ойықтың үстінде, ойықтың түбіне де, шетіне де тимей ілініп тұруы қажет. Бұл микробтық жасушалардың қозғалысын бақылауға мүмкіндік береді

#### **«Таңбалы» препарат дайындау.**

«Таңбалы» препарат микроорганизмдердің колонияларында клеткалардың табиғи орналасуын зерттеуде, ал кейде спора формаларын бақылауға қолданылады.

Микроорганизмдер бөлек колониялар немесе газон түрінде өскен агарланған ортадан скальпель арқылы бөлшек кесіп алып, заттық шыныға көшіреді. Бұнда бөлшектегі микроорганизмдер жоғары қарап тұруы қажет. Одан соң газон немесе колонияға таза жабынды шыныны жауып, үстінен тұзақ не қысқышпен аздап басады. Алынған препаратты заттық шыныдағы су немесе метилен көктің тамшысына таңбамен қаратып енгізеді. Таңбаны колония немесе газон бетіне заттық шыныны тигізу арқылы да алуға болады.

#### **Фиксирленген препараттар дайындау.**

*Фиксирленіп боялған клеткалардың препараттары.* Бекітілген немесе фиксирленген препараттар микроорганизмдердің бірқатар морфологиялық ерекшеліктерін зерттеуде, клеткаларды санауда және дақыл тазалығын тексеруде қолданылады.

Майсызданған заттық шыныға тамшы су тамызып, тұзақпен зерттеу материалын енгізеді. Алынған суспензияны біркелкі, жұқа жұғынды алу үшін тұзақ арқылы жаяды. Жұғындыны бөлме температурасында ауада кептіреді. Егер жұғындының кебуі жай болса, онда жұғындыны от жалынының үстінде жылы ауада ұстайды.

Препараттарды бірнеше мақсатпен бекітеді: микроорганизмдердің тіршілігін тоқтату; клеткалардың шыныға жабысуын қамтамасыз ету; жұғындыны бояуға сезімтал ету, себебі тіршілігін жойған клеткалар тірі клеткаға қарағанда жақсы боялады. Бекітудің кең тараған әдісі – жылумен өңдеу. Ол үшін препаратты жұғындыны жоғары қаратып, оттың жалынының ең ыстық бөлігінен бірнеше рет өткізеді.

Микроорганизм клеткаларын бояу үшін, көбінесе фуксин, геницианды көгілдір, метиленді көк бояулары пайдаланылады. Жұғындыға бояуды тамызып, 1-3 минут ұстайды. Бояу аяқталғаннан кейін препараттарды ағып жатқан су түссізденгенше шаяды. Одан кейін препаратты кептіріп, микроскоп арқылы бақылайды.

### Қажетті материалдар мен құралдар:

Әртүрлі микроорганизмдер, заттық шыны, жабынды шыны, микробиологиялық тұзақ, қажетті бояулар, микроскоптар.

#### Бақылау сұрақтары:

1. Микробиология зертханасында жұмыс істейтін студенттер үшін қауіпсіздік ережелері қандай?
2. Микробиологиялық зертханада қандай құрал-жабдықтар пайдаланылады?
3. Биологиялық микроскоп құрылысымен және онымен жұмыс істеу жолдары қандай?
4. «Жаншылдан тамшы», «Ілінген тамшы» және «Таңбалы» препараттарды дайындау жолдары қандай?
  1. Бекітілген препараттар дегеніміз не және оны қандай мақсатта пайдаланады?
  2. Микроорганизмдерден «Бекітілген препарат» препараттарды дайындау жолдары қандай?

## Зертханалық сабақ 2.

### Микроорганизмдердің алуантүрлілігі. Бактериялар мен ашытқылырдың морфологиясы.

Микроорганизмдердің бұл тобы табиғатта кеңінен таралған және үлкен өнеркәсіптік мәнге ие.

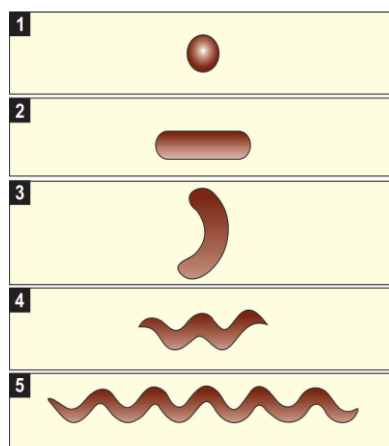
Бактериялардың көпшілігі – сфералық, таяқша тәрізді немесе бұрылған пішінді бір жасушалы организмдер. Бактериялар арасында жіпшелі формалары аз. Бактериялардың көлемі өте майда болады, шар тәрізді бактериялардың диаметрі 1-2 мкм. Бактериялар екіге бөлінумен көбейеді (қолайлы жағдайда бөлу 20-80 минуттан кейін жүреді). Кейбір бактериялардың клеткалары қозғалғыш келеді. Қозғалу қабілеті ерекше – талшықтары немесе қылшықтары және т. басқа органеллаларының болуына байланысты. Пішіні бойынша ең қарапайым шар тәрізді бактериялар (коккалар). Олар кеңістікте жеке-жеке орналасқан немесе бір-бірімен тізбектеліп байланысқан шарлар түрінде кездеседі. Жасушалар бөлінгеннен кейін шар тәрізді бактериялар монококкаларға (жеке коккаларға), тетракоктерге (4-тен біріктірілген), сарциналарға (8-ден біріктірілген), **стафилококкаларға** (жүзім шоғыры түрінді), **стрептококкаларға** (моншақ тәрізді тізбектелген) бөлінеді (39-сурет).

Таяқша тәрізді бактериялар – бактериялардың ең көп тобы.

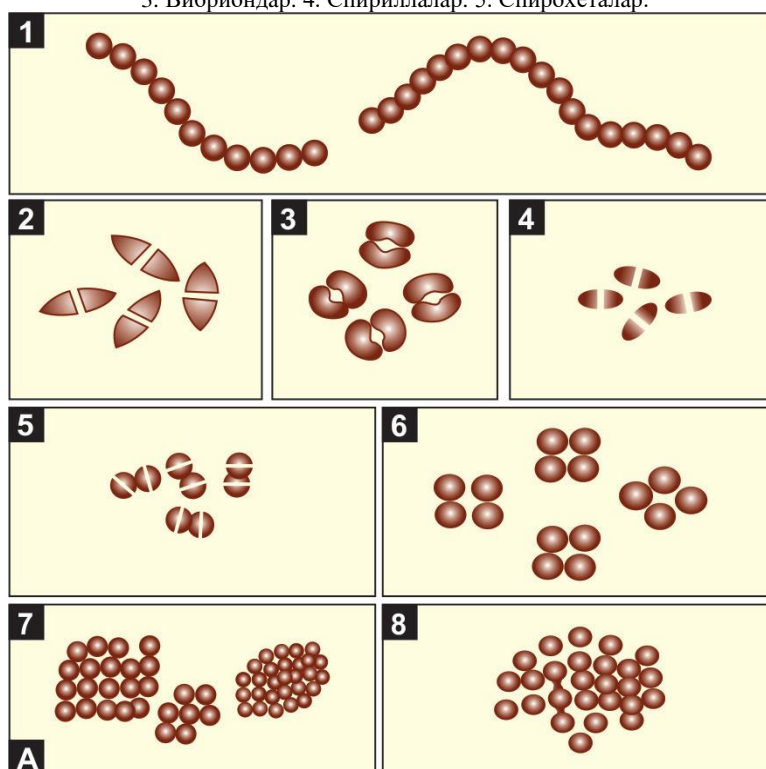
Олар дөңгелек немесе өткір ұштары бар жасушалардың цилиндрлік пішіні бар және ұзындықтың еніне қатынасы бойынша ерекшеленеді. Олар жеке орналасуы мүмкін немесе қысқа немесе ұзын тізбектерді құрайды. Таяқшалар әртүрлі ұзындықта болуы мүмкін, әдетте бірнеше мкм, ал ені 1 мкм.

Кейбір таяқша тәрізді бактериялар жасушаның ішінде немесе сыртында ерекше құрылымдар – споралар түзеді. Әрбір клетка бір спора түзеді, ол қолайсыз жағдайларда бактерияның тіршілігін сақтап қалу үшін қызмет атқарады. Қолайлы жағдайларда спора (температура, ылғалдылық, қоректік заттар) қайтадан вегетативті клеткаға айналады. Бактериялардың спораларының тұрақтылығы кез келген тірі ағзалардың төзімділігінен асып түседі. Мысалы, *Bacillus subtilis* таяқшасының спорасы 100 °С температураға 3 сағат бойы шыдайды. Бұндай төзімділік кейбір жұқпалы аурулардың қоздырғыштарымен күресуде орасан зор қолайсыздықтар туғызуы мүмкін.

Іілген таяқшалар микроорганизмдердің клеткаларының иілу дәрежесі бойынша және орамдардың саны бойынша ерекшеленеді. Олар вибриондарға, спириллаларға және спирохеталар деп бөлінеді. Егер бактерияда бір спираль бар болса, онда ол вибрион деп аталады. Егер бактерияның бірнеше спираль тәрізді оралымдары болса, онда оны спирилдер деп атайды, ал өте көп оралымдары болса спирохеталар деп аталады.



38-сурет. Бактериялардың морфологиясы: 1. Коккалар. 2. Бациллалар. 3. Вибриондар. 4. Спириллалар. 5. Спирохеталар.

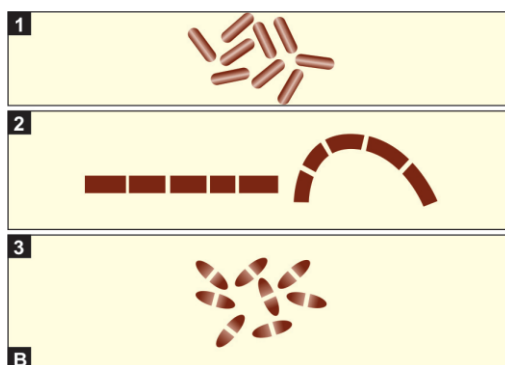


39-сурет. Коккалар: 1. Тізбектелген коккалар – стрептококкалар (*Streptococci*). 2-4. Жұптасып орналасқан коккалар – диплококкалар (*Pneumococci*, *Gonococci*, *Meningococci*). 5-7. Сарциналар (*Neisseria catarrhalis*, *Sarcina*). 8. Жүзімнің шоғырына ұқсас жинақталған коккалар – стафилакоктар.

Жіпшелі бактериялар – цилиндрлік немесе диск тәрізді жасушалардан тұратын жіптер. Кейбір түрлердің жіптері темір гидроксидімен немесе марганец тұздарымен сіңірілген шырышты қабыққа салынған. Ерітінділерден ауыр металдарды шоғырландыру процесінде кейбір темір бактериялардың жасушаларында жүреді. *Beggiatoa* клеткаларына күкірт жинақталады. Жіпшелі бактериялар әдетте теңіз және тұщы суларда мекендейді, сондай-ақ ыдырайтын органикалық қалдықтарда, жануарлардың ішектерінде кездеседі (38-40-сурет).

Цианобактерияларға фотосинтез жасай алатын прокариотты клеткалы құрылымын біріктіретін организмдердің үлкен тобы жатады. Цианобактериялар жасушаларының пигменттері а хлорофилінен (жасыл түсті) басқа фикоцианин – көк түсті пигменттер бар. Бұл белгі бойынша бұрын олар көк жасыл балдырлар деп аталды. Олардың көпшілігі – көп клеткалы ағзалар, ол ұзын, жиі тармақталмаған жіптер (трихомалар) түрінде болады. Жіптердегі клеткалар жалпы сыртқы қабырғамен біріктірілген. Көбеюі жіптің жекелеген аймақтарының ыдырауы арқылы жүзеге асы-

рылады. Кейбір түрлері жылжып немесе сырғып қозғалады (*Spirulina* туысының өкілдері) (38-сурет, 5)



40-сурет. Таяқшалар: 1. Жеке-жеке орналасқан бациллалар – бактериялар.  
2. Тізбектелген бациллалар – стрептобактериялар (*B. anthrax*). 3.  
Екіден жұптасқан бациллалар – диплобактериялар (*K. pneumoniae*).

**Жұмыстың мақсаты:** бактериялардың жекелеген өкілдерін микроскоп арқылы зерттеу.

**Қажетті материалдар:** оптикалық микроскоптар, заттық шынылар, бактериологиялық тұзақтар, спиртовкалар, бояулар, микроорганизмдер дақылдары.

**1-тапсырма.** *Micrococcus agilis* (*micro* – кішкентай, *soccus* – шарик, *agilis* – жылжымалы) фиксирленіп, фуксинмен боялған препаратын дайындау. Препаратқа иммерсиялық майын тамызыңыз. Иммерсиялық жүйесі бар микроскоппен қарастырады. Микрококтарға тән жеке жатқан шар тәрізді жасушаларды табу, олардың суретін салу.

**2-тапсырма.** Фуксинмен бекітілген, боялған, *Azotobacter chroocum* клеткасынан бекітіліп боялған препаратты дайындау. Туыстық атау оның атмосфералық азотты сіңіру қабілетін, түрлік – қоңыр пигментті (*chroo* – қоңыр) және шар тәрізді пішінді өндіру қабілетін көрсетеді. Дайын препаратқа иммерсиялық майды тамызып, оны микроскоптың иммерсиялық жүйесінде қарау керек. Жұптасып орналасқан клеткаларды тауып суретін салыңыз.

**3-тапсырма.** *Sarcina flava* клеткасынан бекітіліп боялған препарат дайындау. Иммерсиондық жүйесі бар микроскоппен 4-тен, 8-ден, 16-дан немесе 32-ден орналасқан клеткаларды құрайтын дұрыс куб түрінде жинақталған түрі бар сарцина клеткаларын қарастыру, олардың суретін салу.

**4-тапсырма.** Спора түзуші таяқша тәрізді клеткасы бар *Bacillus mycoides* бекітіліп фуксинмен боялған препарат дайындайды. Бұл жерде клеткалардың фуксинмен қалай боялғандығына көңіл бөлу қажет. Оларда цитоплазмадан әлдеқайда тығыз спорогенді аймақ қалыптасады және ол бояуды нашар қабылдайды. Сурет салу кезінде жасушалар тізбек (стрептобациллалар) құрайтынын көрсету керек.

**5-тапсырма.** *Leptothrix* (бактериялардың жіпшелі формалары) клеткасынан «жаншылған тамшы» препарат дайындау. Темір бактериялардың клеткалары бар препаратты жабынды шынымен жауып, иммерсиялық майын тамызады. Иммерсиялық жүйесі бар микроскоптан қарау. Препараттың суретін салу.

#### Бақылау сұрақтары:

1. Шар тәрізді пішінді бактериялардың жасушалары қалай орналасуы мүмкін?
2. Микроккалар, диплококкалар, стрептококкалар, тетракоккалар, сарциналардың жасушалары қалай орналасады?
3. Бактериялардың таяқша тәрізді түрлері. Оларда жасушалар қалай орналасуы мүмкін?
4. Бактериялардың споралары қандай функцияны атқарады? Бактерия жасушасында қанша споралары болады?
5. Вибриондар спиралалар спирохеталардан қалай ерекшеленеді?
6. Табиғатта қандай процестерді вибриондар, спиралалар, спирохеталар тудырады?

### Зертханалық сабақ 3.

#### Микроорганизмдердің алуантүрлілігі. Зең саңырауқұлақтары, көк-жасыл балдырлардың және актиномицеттердің морфологиясы.

**Зертханалық сабақтың мақсаты** микроорганизмдердің (микроскопиялық саңырауқұлақтар мен актиномицеттердің) құрылысы мен морфологиялық ерекшеліктерін зерттеу.

**Зертханалық сабақтың міндеті** – әртүрлі туысқа жататын микроскопиялық саңырауқұлақтар мен актиномицеттердің клетка морфологиясын зерттеу.

**Қажетті материалдар:** оптикалық микроскоптар, заттық және жабынды шынылар, бактериологиялық ілмектер, спиртовкалар, бояғыштар, микроскопиялық саңырауқұлақтардың дақылдары.

**Актиномицеттер** – микроорганизмдердің үлкен тобы, олардың клеткалары тармақталуға қабілетті. Көптеген актиномицеттер қоректік ортаға еніп өсетін субстратты мицелий түзеді. Ауалы мицелийдің гифтерінің ұшында споралар немесе споралар бар спорангийлер қалыптасады. Актиномицеттер спора арқылы, клеткалардың бөлінуі немесе тармақталуы арқылы көбейеді.

Спора түрін, спора формасын зерттеу үшін актиномицеттердің колониясынан таңбалы препарат дайындайды. Таңбаны ауада кептіріп, **от** жалынында бекітеді де, фуксинмен бояп, сумен **шаяды**. Микроскоп арқылы препаратта мицелийдің бөліктері, спора түзу түрі, споралардың формалары көрінеді.

Бұл топ өкілдерінің едәуір бөлігінің клеткалары бұтақталуға қабілетті, осы белгілері олардың саңырауқұлақтарға ұқсастығын көрсетеді. Алайда актиномицеттердің тармақталған жіптерінің ұзындығы бірнеше миллиметрге жетеді, ал саңырауқұлақтардың мицелия ұзындығы бірнеше сантиметрге жетеді. Саңырауқұлақтардың гифтері әдетте актиномицет жіптерінің қалыңдығы бірнеше есе қалыңдау болады. Морфологиясы мен дамуы бойынша актиномицеттер жоғары және төмен түрлерге бөлінеді. Жоғарғыға жақсы дамыған септирленген немесе септирленбеген мицелий және ерекше споралы мүшелері бар организмдер жатады.

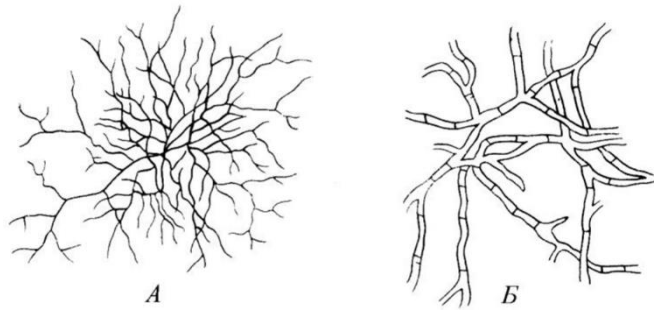
Споралары ауалық мицелийінің арнайы споралы гифаларында тізбек түрінде қалыптасады.

Споралы мүшелердің құрылымы әртүрлі түрлерінде әркелкі болады: ұзын немесе қысқа, тік немесе спираль тәрізді (**30-32-сурет**). Мицелийдің болуы және споралы мүшелердің құрылысы бойынша жоғары актиномицеттер мицелиялық саңырауқұлақтарға ұқсайды. Кейбір актиномицеттер жас культураларында ғана мицелий бар, ол **өсе келе** таяқша тәрізді және шар тәрізді жасушалардың пайда болуымен ыдырайды.

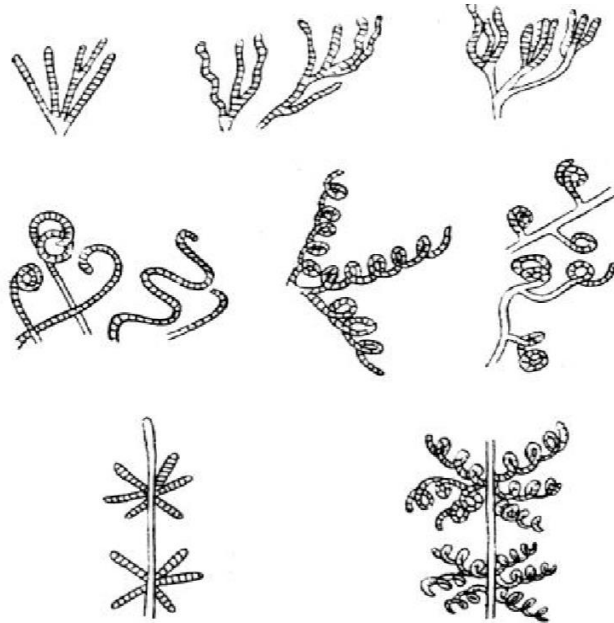
Актиномицеттердің төменгі формаларында шынайы мицелия жоқ. Мицелийдің пайда болу қабілеті оларда тек жасушалардың тармақталу үдерістерінде ғана көрінеді. Төменгі актиномицеттерге, мысалы, *Mycobacterium* туысының түрлері жатады, олар өсу жасына байланысты жасушалардың пішінін өзгерту қасиеті бар. Бұл қасиет плеоморфизм деп аталады.

Жоғары актиномицеттердің арасында табиғи ортада саны бойынша ***Streptomyces* туысының** түрлері жетекші орын алады. Актиномицеттер топырақ түзілу және топырақ құнарлылығын құру процестерінде үлкен рөл атқарады. Актиномицеттер көптеген басқа микроорганизмдерге қол жетпейтін күрделі органикалық қосылыстарды (целлюлоза, гумус, хитин, лигнин және т.б.) жояды. *Streptomyces* туысының барлық дерлік түрлері антибиотиктік заттарды бөлу қасиетіне ие. Кейбір түрлер – өсімдіктер, жануарлар және адам ауруларының қоздырғыштары.

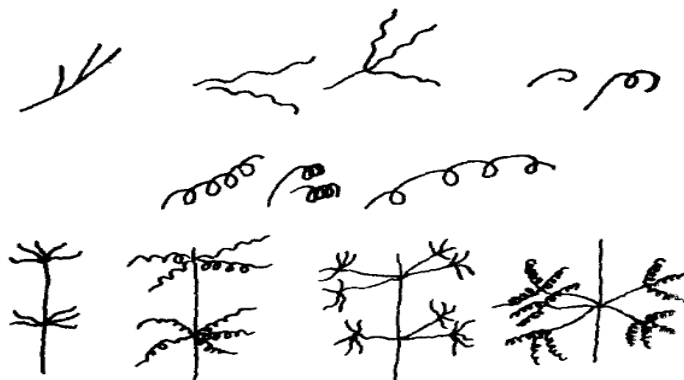
**Саңырауқұлақтар** эукариотты организмдерге жатады, мицелиалды құрылымға ие. Олар жынысты және жыныссыз жолмен көбейеді. Саңырауқұлақтарды зерттеу кезінде «жаншылған тамшы» препараты қолданылады. Заттық шыныдағы су тамшысына сірке қышқылын тамызып, оны араластырады. Сірке қышқылын саңырауқұлақтардың конидийлері сумен нашар суланатындықтан қосады. Бактериологиялық иненің көмегімен колониялардың агарсыз аймағын алады да, тамшыға салып, мицелийлерін ақырын жаяды, жабынды шынымен жауып, 8x, 40x объективтерімен, микроскоппен қарайды. Колонияларды микроскоптау кезінде мицелийдің бөлінуіне, спорангийлердің құрылысына, спора пішініне назар аударады және мицелий диаметрін анықтайды (**33-35-сурет**).



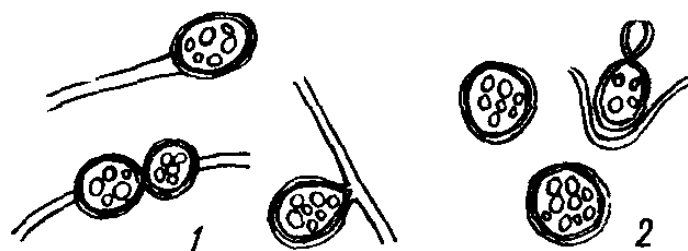
**30-сурет.** Актиномицеттер мен саңырауқұлақтардың мицелийінің бірдей үлкейтілімдегі көрінісі



**31-сурет.** Актиномицеттердің спорангийлері

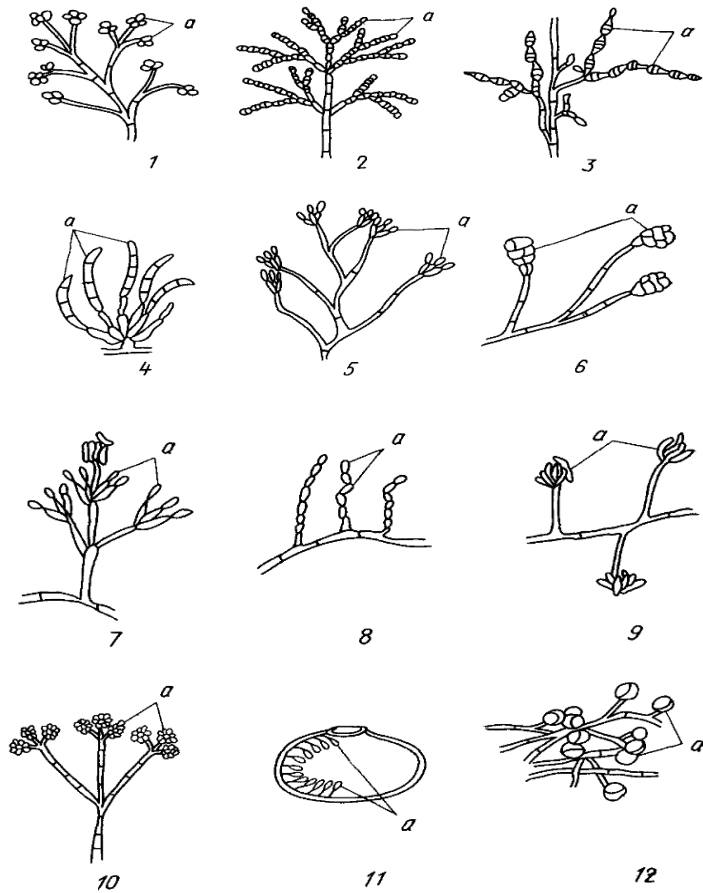


**32-сурет.** Актиномицеттердің ауалық мицелийлері

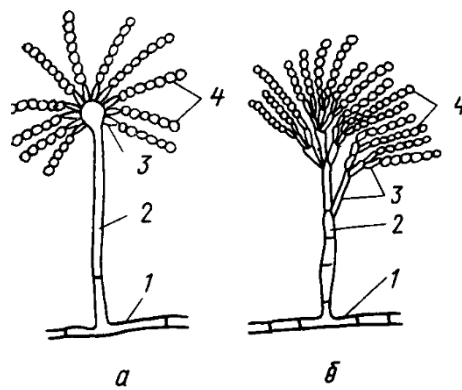


**33-сурет.** Ашытқы саңырауқұлақтарының хламидоспоралары:

1 – гифалардағы мицелийлер; 2 – мицелийсіз гифалар;

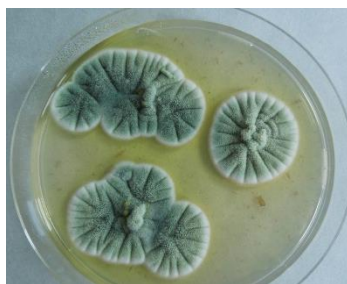


**34-сурет.** Жетілмеген саңырауқұлақтардың конидиносептері мен конидийлері: 1 – *Trichoderma*; 2 – *Cladosporium*; 3 – *Alternaria*; 4 – *Fusarium*; 5 – *Stachybotris*; 6 – *Stemphylium*; 7 – *Verticillium*; 8 – *Oospora*; 9 – *Cephalosporium*; 10 – *Botrytis*; 11 – *Phoma*; 12 – *Mycogone*; а – конидийлер.

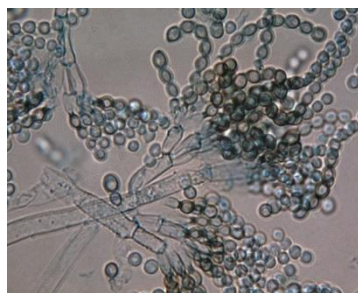


**35-сурет.** *Aspergillus* (а) және *Penicillium* (б) туысы саңырауқұлақтарының конидийлері: 1 – вегетативті мицелий; 2 – конидифоралар; 3 – стеригмалар; 4 – конидийлер

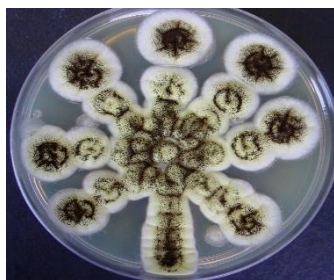




Тығыз қоректік ортада өскен *Penicillium* зең саңырауқұлағының колониясы



*Penicillium* саңырауқұлағының микрокөрінісі



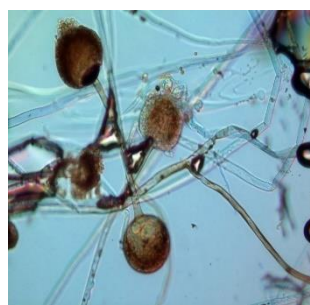
*Aspergillus* зең саңырауқұлағының тығыз қоректік ортадағы колониясы



*Aspergillus* саңырауқұлағының микрокөрінісі



*Mucor* зең саңырауқұлағының тығыз қоректік ортадағы колониясы

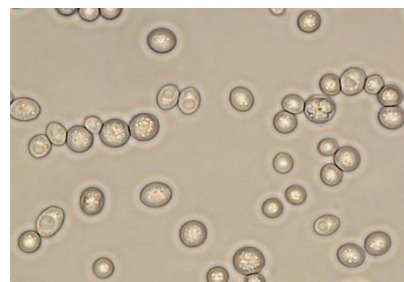


*Mucor* саңырауқұлағының микрокөрінісі

**36-сурет.** Зең саңырауқұлақтарының колониясы мен клеткасының көріністері



*Saccharomyces cerevisiae* саңырауқұлағының колониясы



*Saccharomyces cerevisiae* саңырауқұлағының клеткасының микрокөрінісі



*Candida auris* саңырауқұлағының колониясы



*Candida auris* саңырауқұлағының клеткасының микрокөрінісі



*Rhodotorula* саңырауқұлағының колониясы



*Rhodotorula* саңырауқұлағының клеткасының микрокөрінісі

**37-сурет.** Микроскопиялық саңырауқұлақтардың колониясы мен клеткасының көріністері

**1-тапсырма.** *Saccharomyces cerevisia* нан ашытқысының сұйық дақылынан «жаншылған тамшы» препаратын дайындау. Оны иммерсиялық жүйесі бар микроскоппен көру. Препаратта ашытқы екі түрі көрінеді: біріншісі дөңгелектенген жасушалар, екіншісі – бұтақталған бүршіктер түзетін ұзын-цилиндрлік жасушалар. Препаратта көрген көріністің суретін **салады**.

**2-тапсырма.** *Mucor mucedo* препаратын «жаншылған тамшы» төмендегідей дайындаңыз. Бірінші тұзақпен абайлап, мицелийдің аз мөлшерін кесіп алып, оны инемен заттық шыныдағы су тамшысына қою керек. Жабынды шынымен жабыңыз. Микроскоптан иммерсиялық жүйені қолданбай-ақ х8 және х40 объективпен көру қажет. Препаратта мукордың тегіс «бастарын» (оның эндогенді споралары бар) табу керек. Препаратта көрген көріністің суретін **салады**.

**3-тапсырма.** *Aspergillus niger* колониясының қара және қоңыр қара аймақтарынан бактериологиялық тұзақпен аздаған мицелийлерінен алады да, «жаншылған тамшы» препаратын дайындайды. Препаратты иммерсиясыз (х8 объективінде) зерттейді. Мицелийдің зерттелетін үлгісінің шеттеріне басты назар аударады. Мицелийдің қолайлы аймағы табылған кезде х8 объективтен х40-қа ұлғайтылымдағы объективке ауыстырады. Экзогенді орналасқан конидийлері бар **конидиеносецтің** көріністерінің суретін салады.

**4-тапсырма.** *Penicillium expansion* препаратын *Aspergillus niger* препараты сияқты дайындалады. Микроскоппен алдыңғы жағдайдағыдай қаралады. Бақылау кезінде **конидиеносецтердің** құрылымына назар аудару керек. Бір нүктеден шығатын конидийлерінің әрбір жеке шоғыры сурет салатын қылқаламдарға өте ұқсас. Микроскоптан көрген көріністерінің суретін салады.

### **Қажетті материалдар мен құралдар:**

Ет-пептонды агар және Сабуро ортасы құйылған Петри табақшалары, залалсыздандырылған тұзақтар, заттық шыны, жабынды шыны, микробиологиялық тұзақ, қажетті бояулар, микроскоптар.

### **Бақылау сұрақтары:**

1. Жетілмеген саңырауқұлақтар, олардың конидиосецтері мен конидийлерінің ерекшеліктері қандай?
2. Ашытқы саңырауқұлақтары және олардың морфологиялық ерекшеліктері қандай?
3. Актиномицеттер, олардың ерекшеліктері қандай?
4. Бөліп алған микроорганизмдердің (әртүрлі туысқа стрептомицеттер мен микроскопиялық саңырауқұлақтар) культуралар мен коллекциядағы штамдардың клетка морфологиясын салыстыру, ұқсастықтары мен айырмашылықтары қандай?
5. Эукариоттар прокариоттардан несімен ерекшеленеді?
6. Ашытқы клеткасының түрлері, өлшемдері және көбеюі қандай?
7. Табиғаттағы ашытқылардың қызметі және олардың адам өміріндегі рөлі неде?
8. Микроскоптың иммерсионды жүйесінде препаратты қараған кезде ашытқы жасушаларында микроқұрылымдарды ажыратуға бола ма?
9. Микроскопиялық саңырауқұлақтардың вегетативтік және жыныстық көбеюі қандай?

## **Зертханалық сабақ 4.**

**Бактерияларға сыртқы орта факторларының әсері. Микроорганизмдерге жоғарғы температураның және ортаның рН әсерін анықтау. Бактериялардың УК-сәулелерінің әсерін анықтау. Микроорганизмдерге антибиотиктер мен химиялық заттардың әсерін анықтау.**

### **Микроорганизмдерге жоғары температураның әсері**

#### **Спорасыз бактерияларға жоғары температураның әсері.**

Су моншасын 80 °С-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. Дақыл 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 37оС 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 40оС) 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 °С–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, °С	өсіру	Саңырауқұлақтың қарқынды даму көрсеткіштері, мм	
		Колонияның диаметрі	Спора
40			
55			

**Зертханалық жұмыс 5.**

**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 °С 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.

## Ультракүлгін сәулелердің (УФЛ) микроорганизмдерге әсерін зерттеу

МПА қоректік ортасы бар Петри табақшаларына 1 тамшы бактерия культурасын 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.			

## 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 сабақ 6.

**Микроорганизмдердің қоршаған ортада таралу. Ауа микрофлорасы. Оқу ғимаратындағы ауаның микрофлорасын зерттеу. Кох әдісі бойынша ауа микрофлорасын есептеу.**

### 1. Ауа микрофлорасын зерттеу.

Су және топырақ сияқты ауа микроорганизмдер тіршілік ететін орта болып саналады. Бактериялар көп мөлшерде ауаға шаң-тозаңмен түседі, олардың сандық және сапалық құрамы топырақ микрофлорасымен тығыз байланысты болып келеді. Микроорганизмдер ауада тіршілік еткенімен, ауа олардың көбею ортасы бола алмайды, яғни олар күн сәулесінің әсерінен тіршілігін жояды. Ауа микрофлорасы негізінен климаттық жағдайларға, жыл және тәулік мезгіліне, тұрғылықты жерлерге байланысты өзгеріп отырады. Жаңбырлы күнде микробтар шаңмен қоса топырақтың бетіне шөгіп, ауа тазарады. Ауаның жоғары қабаты микробтардан едеуір таза болып келеді. Адамдар көп жерлерде, ластанған аймақтардың ауасында микроорганизмдер көп мөлшерде кездеседі. Зерттеу міндеттеріне байланысты ауа микрофлорасын зерттеу кезінде түрлі тәсілдер қолданылады. Бөлмелердегі ауа ластануына баға беру үшін Кох тәсілі кең қолданылады. Ол үшін зерттелетін бөлмеге қатты қоректік орта құйылған Петри табақшаларын 5-10 минутқа ашық қалдырып, уақыт аяқталған соң табақшаның бетін жауып, термостатқа  $28^{\circ}\text{C}$  орналастырады. 2-3 тәуліктік инкубациядан соң ауа микрофлорасына сандық есептеу жүргізеді. Бөлме ауаларында көбінесе бактериялардың кокка тәрізді формалары, оның ішінде *Sarcina flava*, споралы таяқшалар, зең саңырауқұлақтары кездеседі.

Әр түрлі бөлмелерге қойылған Петри табақшаларындағы микроорганизмдердің  $1\text{ м}^3$  аудағы санын анықтап, салыстырмалы түрде талдау жасау, колонияларды сипаттап, препараттар дайындап, ауа микрофлорасымен танысу, суреттерді салып, түсініктеме беру.

### 2. Адам микрофлорасын зерттеу (ауыз қуысының микрофлорасы).

Әр студент өзінің тіс жиегінен жұғынды дайындап, фиксациялайды да, бекітілген препарат жасап қарайды. Ауыз қуысында көбінесе коктар, таяқшалар, актиноциеттердің кейбір түрлері кездеседі.

Тіс жиегінен жұғынды дайындап, бекітілген препарат жасап, бактериялардың морфологиясын сипаттау, суреттерін салу.

### Қажетті материалдар мен құралдар:

Ет-пептонды агар және Сабуро ортасы құйылған Петри табақшалары, залалсыздандырылған тұзақтар, заттық шыны, жабынды шыны, микробиологиялық тұзақ, қажетті бояулар, микроскоптар.

### Тапсырмалар:

1. Әр түрлі бөлмелерге қойылған Петри табақшаларындағы микроорганизмдердің  $1\text{ м}^3$  аудағы санын анықтап, салыстырмалы түрде талдау жасау.
2. Ауа микрофлорасымен танысу, колонияларды сипаттау,
3. Препараттар дайындап, суреттерді салып, түсініктеме беру

### Бақылау сұрақтары

1. Микроорганизмдердің табиғатта таралуы
2. Ауада микроорганизмдердің таралуы және онда қандай микроорганизмдер тіршілік етеді?
3. Адам микрофлорасы, адам организмінде қандай микроорганизмдер тіршілік етеді және олардың маңызы қандай?

## Зертханалық сабақ 7.

**Микроорганизмдердің қоршаған ортада таралу. Топырақ микрофлорасын зерттеу. Әртүрлі экологиялық топтарға жататын микроорганизмдердің жалпы санын анықтау. Қорытынды жасап есеп өткізу.**

### Топырақ микрофлорасын зерттеу.

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.

**Әртүрлі экологиялық топтарға жататын микроорганизмдердің жалпы санын анықтау.**

**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 ағарлы 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-ағарлы 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 суsло 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 салқындалатын 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 бакылау үлгісі ретінде қалдырады. Пробиркаларға егу материалын салған соң стерильді ортаны пробирканың аузына 4-5 см жетпейтіндей етіп құяды. Өсіруді 30 °С 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 -50 ° С 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 °С 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), шпательдер (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.

### **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  $80\text{ }^\circ\text{C}$  10 минут ішінде пастеризациялайды, яғни қыздырып алып, 0,05 мл ден пипеткамен алып 2 Петри табақшасының бетіне егу жүргізеді. Содан кейін  $30\text{ }^\circ\text{C}$  температурада 3-4 күн аралығында өсіреді.

Органикалық заттардың аз ғана мөлшері бар іздері, актиноциеттер, 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  $25\text{-}28\text{ }^\circ\text{C}$  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,  $28\text{-}30\text{ }^\circ\text{C}$  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 актиноциеттер 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, сондықтан да 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		

**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 гетеротрофты 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
-----------	----------------	-------------	------	--------------	---------------------------	-----------------------	----------------------

### Зертханалық сабақ 8.

**Адам организмінің микрофлорасы Ауыз қуысының микрофлорасы. Грам тәсілі бойынша бояу.**

#### 2. Адам микрофлорасын зерттеу (ауыз қуысының микрофлорасы).

Әр студент өзінің тіс жиегінен жұғынды дайындап, фиксациялайды да, бекітілген препарат жасап қарайды. Ауыз қуысында көбінесе коктар, таяқшалар, актиномицеттердің кейбір түрлері кездеседі.

Тіс жиегінен жұғынды дайындап, бекітілген препарат жасап, бактериялардың морфологиясын сипаттау, суреттерін салу.

#### Грамм әдісімен бактериялардың бойынша бояу.

Бактериялардың клетка қабықшасы (0,01-0,04 мкм) қорғаныс қызметін және клеткаға пішін беріп тұрады. Оның құрамына пептидогликан, сонымен қоса тейхой қышқылдары, липопротеидтер, липополисахаридтер және фосфолипидтер болады. Микроорганизмдердің арасында микоплазмаларда клетка қабықшасы болмайды. Археяларда клетка қабықшасының құрамы әртүрлі болып келеді: бір бактериялардың клетка қабықшасының құрамында псевдомуреин, ал кейбіреулерінде липополисахаридтер және тағы басқа қосылыстар болады. Олардың клетка қабықшасының молекулалық ұйымдасу деңгейі мен химиялық құрамын клетка қабықшасының Грамм тәсілімен боялуын байланыстырады. Грамм тәсілімен бояуды дат микробиологы *Грамм* (1884 ж.) бактерияларды ұсынған, бұл әдіс бойынша барлық бактериялар 2 топқа бөлінеді: *грам оң және грам теріс*. Грамм оң бактериялар препаратты спиртпен өңдеу кезінде генициан көгілдірдің йодпен қосылысын ұстап қалады да, көгілдір түске боялады. Фуксинмен бояған кезде қызыл түсті қабылдамайды. Грамм теріс бактериялар бұндай қабілетке ие емес, сондықтан спиртпен өндегенде түссізденеді. Одан кейін фуксинмен бояғанда олар ашық қызыл түске боялады.

*Грамм әдісі бойынша бояу тәртібі:*

Заттық шыны бетіне зерттелетін бактерия клеткасының бекітілген препаратын дайындап алады. Содан кейін бактериялардың бекітілген препаратын келесі тәртіп бойынша бояйды.

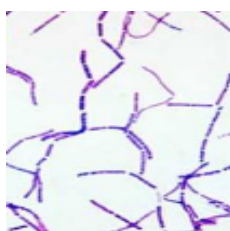
1. Бекітілген жұғындыны кристалды көгілдірмен немесе геницианвиолетпен бояп, 1-2 мин ұстайды да, бояуды төгіп тастайды.
2. Люгольдің ерітіндісін тамызып, 1-2 минуттан кейін ерітіндіні төгеді.
3. Препаратты этил спиртімен 30 секунд өңдеп түссіздендіреді.
4. Препаратты сумен шаяды.
5. Сулы фуксинмен 1-2 минут бояйды.
6. Сумен шаяды
7. Препаратты кептіріп құрғатады да, микроскоптан қарайды.

Микроскоптан қараған кезде **грам оң** бактериялар қою көгілдір немесе күлгін түске, ал **грам теріс** бактериялардың клеткалары ашық қызыл түске боялады (43-сурет).

Грамм әдісімен бояу нәтижесі дақылдың жасына байланысты болады: ересек дақылдардағы өлі клеткалар граммтеріс боялады. Сондықтан жас тәуліктік дақылдарды қолданған жөн. Алынған нәтижелерді кестеге толтырады.

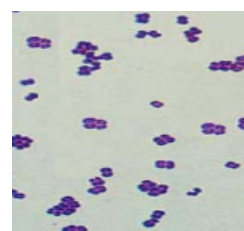


*Clostridium perfringens*



*Bacillus subtilis*

Грамм оң бактериялар



*Micrococcus luteus*



*Escherichia coli*



*Pseudomonas aeruginosa*

Грамм теріс бактериялар

43-сурет. Грамм әдісімен бактериялардың клетка қабықшасының боялу сипатын анықтау

**Микроорганизмдердің клетка қабықшасының грамм-типін экспресс-әдіс арқылы анықтау.** Бактерияларды клетка қабықшасының құрамы бойынша **грам оң** және **грам теріс** топқа жіктеу үшін Грамм тәсілімен бояу әдісімен қатар, клетка қабықшасының грамм-типін ажыратуды экспресс-әдіс арқылы анықтауға болады. Ол үшін заттық шыныдағы КОН 3 % ерітіндісінің тамшысына бактерия культураларының клеткаларын (1-2 тәуліктік) микробиологиялық тұзақпен салып, 5-6 секунд айналдырған соң тұзақты жылдам жоғары көтереді. **Грамм теріс** бактериялардың суспензиясын тұзақты көтергенде созылмалы шырышты болады. **Грамм оң** бактериялардың суспензиясы сілтінің тамшысында біркелкі жайылады (судағы сияқты). Егер де сілтідегі бактерия суспензиясы 60 секунд бойы созылмалы шырышты болса, теріс реакция болып есептеледі. Созылмалы шырыштың түзілуі граммтеріс бактериялардың клетка қабырғасының КОН сілтілі ерітіндісіндегі лизисінен ДНҚ босап шығуынан болады. Бұл әдісті **грам теріс** және **грам оң** бактерияларға бастапқы жіктеуді салыстырмалы түрде жүргізу барысында қолдануға болады (7-кесте).

7-кесте

#### Бактерия клеткаларын бояу әдістері

Бояу әдісі	Бактерия клеткасында бақылайтын құрылым	Грамм тәсілімен боялуы	Суретін салу

**Қажетті материалдар мен құралдар:**

Ет-пептонды агар және Сабууро ортасы құйылған Петри табақшалары, залалсыздандырылған тұзақтар, заттық шыны, жабынды шыны, микробиологиялық тұзақ, қажетті бояулар, микроскоптар.

### **Тапсырмалар:**

Препараттар дайындап, суреттерді салып, түсініктеме беру

### **Бақылау сұрақтары**

4. Микроорганизмдердің табиғатта таралуы
5. Адам микрофлорасы, адам организмінде қандай микроорганизмдер тіршілік етеді және олардың маңызы қандай?

## **Зертханалық сабақ 9.**

### **Микроорганизмдердің антагонистік қатынастарын зерттеу. Антибиотиктердің әсерін дискі-диффузиялы әдістер мен сұйылту әдістерін қолдану арқылы зерттеу**

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, ристомидин) 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 1-2·10<sup>8</sup> 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°C-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 10**  
**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 егу. Тұзақпен тығыз ортаның бетіне *Escherichia coli* және *Bacillus subtilis* культураларының егу. 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.

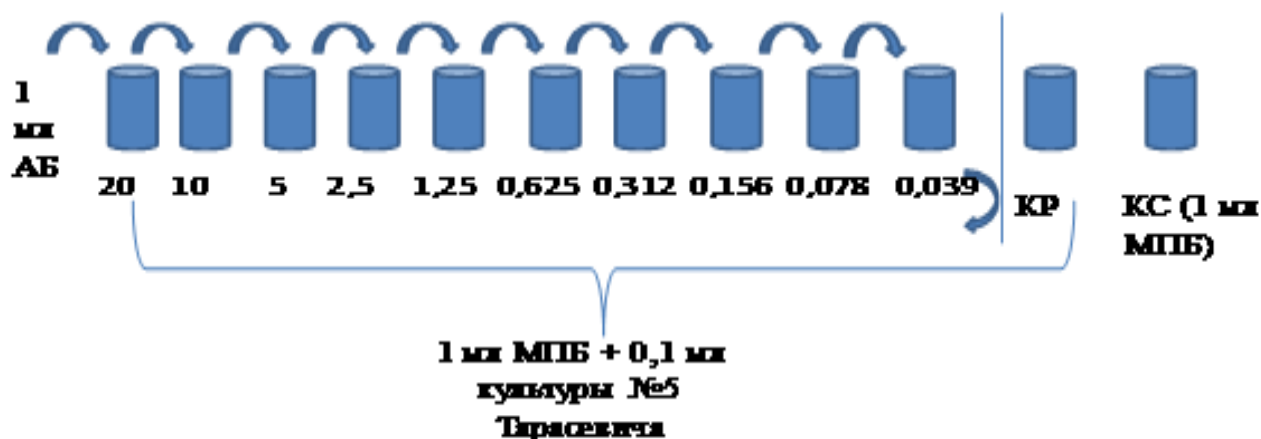
Пенициллин мен стрептомициннің әртүрлі концентрацияларының микроорганизмдерге әсері

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  $10^6$ - $10^7$  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 37<sup>0</sup>С-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 (*Escherichia coli* және *Bacillus subtilis*), 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.

**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 сабақ 11.**

**Нитрифицирлеуші және денитрифицирлеуші микроорганизмдердің жинақтаушы культураларын алу және азоттұтқыш микроорганизмдерді топырақтың түйіршікті әдісі арқылы бөліп алу.**

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  $30^{\circ}\text{C}$  термостатқа, Эшби және Виноградский ортасы бар табақшаларды  $28^{\circ}\text{C}$  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 (ілмектер), спирт шамдары, таразылар, су моншасы,  $100^{\circ}\text{C}$  термометр, кесте Мак-Креди.

### **Зертханалық сабақ 12.**

#### **Азот, күкірт және көміртегі айналымына қатысатын микроорганизмдерді бөліп алу және зерттеу.**

Аэробты азотфиксациялайтын микроорганизмдерді бөліп алу 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 дөнес 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 қоршалады. *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 - *Liprotusces* 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.

**Сабақтың тақырыбы:** Сірке қышқылды бактериялар

**Сабақтың мақсаты:** Сіркеқышқылды бактериялардың жинақтаушы культураларын бөліп алу.

СҚБ – этил спиртінің сірке қышқылы мен суға дейін ыдырауын қамтамасыз ететін сіркеқышқылды ашу процесін жүзеге асырады.

Бұл бактериялар табиғатта кең таралағандықтан піскен жеміс-жидектерде, тұздалған капустадан, ашыған шарап пен сырадан бөліп алуға болады. СҚБ –спора түзбейтін майда таяқшалар. Біреулерінің клеткалары қозғалғыш, біреулерінікі қозғалмайды. Олар сапрофиттер, аэробтар, құрамында спирті бар ортаның беткі жағында қабықша түзіп өседі. Қалыпты өсу температурасы 25-35 °С. Басқа бактериялармен салыстырғанда олар СҚ-на және спиртке төзімділігі жоғары болып келеді.бұл қасиет олардың элективті жағдай жасауына негіз болады.

**Қажетті материалдар:**

Сыра, шарап, көлемі 100-150 мл болатын конус тәрізді колба, иод ерітіндісі, 10% сода ерітіндісі, хлорлы темір ерітіндісі.

**Зертханалық жұмыс жасау барысы.**

1. СҚБ –дың жинақтаушы культураларын бөліп алу үшін қоректік орта ретінде сірке қышқылымен қышқылдандырылған пастерленбеген сыра және шарап қолданылады.Ол үшін сыра мен шараптың көлеміне байланысты 10 % мөлшерінде 6 % сірке қышқылын құяды. Дайын болған қоректік орталарды 30-50 мл-ден 100-150 мл-лік колбаға құяды. Бақылау ретінде қышқылдандырылмаған сыра мен шарап болады. Содан кейін колбаларды 25-30 °С термостатқа қалдырады. Ескере кететін жағдай, СҚБ-дың жинақтаушы культураларын алған кезде міндетті түрде температураға көңіл бөлу керек, Себебі, 15-25 °С *Acetobacter aceti* және 25-35 °С - *Acetobacter pasteurianum* өседі.

Бірнеше күн өткен соң сыра мен шараптың бетінде СҚБ ақ-сұр түсті қабықша түзеді. Содан кейін, СҚБ йодпен бояуға қатынасын зерттейді және сапалық реакция жасайды. Микроскоптан зерттеу үшін қабықшадан кептірілген препарат жасап клетка морфологиясын, қозғалғыштығын, спора түзетіндігін зерттейді

**Көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдеріннің жинақы дақылдарын алу.**

*Жұмыс мақсаты:* Топырақтан көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдеріннің жинақы дақылдарын бөліп алу

Мұнаймен ластанған топырақтан көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдеріннің жинақы дақылдарын бөліп алу үшін құрамында көміртегі көзі ретінде мұнай бар минаральды ортаны пайдаландық. Құрамында мұнай бар минеральды ортаны 250 мл-лік колбаларға 100 мл ден құйып 10 г. Мұнаймен ластанған топыраққа 10 пайыз шикі ұнай салып шайқағышқа 7-10 тәулікке қалдырдық.

**Көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдеріннің жинақы дақылдарын қоректік орталарға дақылдау.**

Мұнаймен ластанған топырақта көмірсутегін тотықтырушы микроорганизмдердің (КТМ) әртүрлі өкілдері тіршілік етеді. Топырақтағы КТМ микрофлорасын зерттеу үшін Кох әдісі бойынша

сұйылту жүргізіледі. Ол үшін әртүрлі қоректік орталар (ЕПА, Сабуро, крахмал аммиакты агар (КАА) орталары) пайдаланыды

Зерттелетін суспензияның белгілі көлемін қатты қоректік ортаға егу арқылы өсіп шыққан колониялардың саны негізінде бастапқы құрамында қанша микроорганизм клеткалары болғандығын айтуға мүмкіншілік береді. 100 мл стерилді құбыр суына 10 гр топырақ нұсқасын салып, төмендегідей сызба-нұсқа бойынша сұйылту жүргізеді:

Егу 3 кезеңнен тұрады: сұйылту дайындау, Петри табақшасына тығыз қоректік орталарға отырғызу, өскен колонияларды санау.

**Сұйылту дайындау.** Жекеленген колониялар алу үшін микроорганизмдер бар дақылды немесе материалды сұйылтады. Сұйылтуды стерилді құбыр суында, сұйылтудың тұрақты коэффициентін пайдалана отырып дайындайды, әдетте бұл коэффициент 10 санына тең. Сұйылту дайындау үшін стерилді құбыр суын стерилді құрғақ пробиркаларға 9 мл-ден құяды. Одан кейін стерилді пипетканың көмегімен алынған бастапқы суспензияның 1 мл-ін 9 мл стерилді суы бар пробиркаға құяды, бұл бірінші сұйылту, 1:10. Бірінші сұйылтудан алынған суспензияны жаңа стерилді пипеткамен араластырады. Осы пипеткамен алынған суспензияның 1 мл алып, екінші пробиркаға көшіреді, бұл екінші сұйылту, 1:100. Осылайша қалған сұйылтуларды дайындайды.

**Петри табақшасына егу.** Суспензияны беттік және тереңдік әдістермен егуге болады. Беттік әдіспен егу алдында стерилді Петри табақшаларға ерітілген қоректік ортаны 20-30 мл-ден құяды. Егуді белгілі сұйылтудан жүргізеді. Стерилді пипеткамен сәйкес сұйылтудың белгілі көлемін 0,1 мл енгізеді. Суспензияны қоректік орта бетіне *Дригальский шпательінің* көмегімен жаяды. Табақшаларды термостатқа 28-30<sup>0</sup> С температурасында бірнеше күнге қалдырады.

**Өскен колонияларды санау.** Өсу жылдамдығына байланысты Петри табақшасында өскен колониялардың санын дақылдаудың 1-15 тәулігінен кейін санайды. Табақшадағы колониялардың орташа санын анықтайды да формула бойынша 1 мл-дегі клеткалар санын есептейді:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{v}$$

мұндағы, М - 1 мл-дегі микроорганизм клеткаларының саны; а - Петри табақшасындағы микроорганизмдер колониясының орташа саны; 10 - сұйылту коэффициенті; n - егу жүргізілген сұйылтудың реттік саны; v - егуге алынған суспензияның көлемі.

Өсіп шыққан колонияларды тәртіпке сәйкес сипаттама жасайды.

Микроорганизмдер тығыз қоректік ортаның бетіне өсіп шыққан кезде колония түзіп, штрих (ирек сызық) бойымен немесе тегіс газон болып өсуі мүмкін. Колония деп –микроорганизмнің бір түрінің клеткалар жиынтығын айтады. Ол клетканың қоректік ортаға қалай өскеніне байланысты болады. Біреулері қоректік ортаның бетіне, келесілері ортаны бойлай өседі, ал кейбіреулері ортаның түбіне қарай өседі. Осыған байланысты колонияның беттік, тереңдік және түптік түрлері болады. Қоректі к ортаның бетіне өскен колонияның бірнеше түрлі болып келеді Оларды сипаттаған кезде келесі белгілеріне көңіл бөлед:

*Колония пішіні* – дөңгелек, амеба тәрізді, дұрыс емес пішінді, тармақталған (ризоидты) және т.б., үшін өсіп шыққан колониялары н сипаттау.

*Колония түсі* – түссіз немесе пигменттелген (ақ, сары, қызыл т.б)

*Колонияның беті* - тегіс, кедір-бұдырлы, қатпарлы, қыртысталған, центрлі шеңберлерлермен қоршалған, радиалды сызбалы.

*Колония профилі* – жалпақ, дөңес, кратер тәрізді, конус тә різді және т.б.

*Колонияның жалтырауы мен мөлдірлігі* – жылтыр колония, жылтыр емес (матовая), бұлыңғыр, ұнтақты, мөлдір.

*Колония шеті* – тегіс, иректелген, тістелген, шашақталған және т.б.

*Колония құрылымы* – біркелкі, майда немесе ірі, сорғалаған (струйчатая)

**Көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдеріннің таза дақылдарын алу және тазалығын тексеру.**

Көмірсутегін тотықтырушы микроорганизмдердің өсіп шаққан колонияларының тазалағын көзбен бақыладық және бекітілген препарат жасап микроскоптан қарау арқылы зерттедік. Содан

кейін таза жеке колонияларды нөмірлеп, сәйкесінше пробиркалардағы әртүрлі қоректік орталарға штрих әдісі бойынша егу жүргізеді.

### Зертханалық сабақ 13.

#### Целлюлозаны ыдырататын микроорганизмдер.

Целлюлозаны ыдырататын микроорганизмдер көміртегінің айналымында маңызды рөл атқарады. Целлюлозаның ыдырауы аэробты және анаэробты жағдайда, қышқылдық және сілтілік реакциялы ортада, төменгі және жоғарғы ылғалдылықта, сонымен қатар әртүрлі температурада жүреді. Целлюлозаны немесе клетчатканы ыдырататын барлық микроорганизмдер хемоорганотрофтар. Оларда целлюлозаның целлобиозалар мен глюкозаға дейін ыдырауын қамтамасыз ететін целлюлаза ферменті бар. Соның нәтижесінде түзілген заттарды микроорганизмдер көміртегі және энергия көзі ретінде пайдаланады.

#### Аэробты жағдайда клетчатканы ыдырататын микроорганизмдер.

Аэробты жағдайда целлюлоза немесе клетчатканы миксобактериялар, кейбір спора түзетін және түзбейтін бактериялар, актиномицеттер және саңырауқұлақтар гидролиздейді. Солардың ішінде негізгі рөлді миксобактериялар өкілдері атқарады.

Клетчатканы ыдырататын миксобактериялар *Cytophaga*, *Sporocytophaga* және *Sorangium* туыстары арасында болады. Олар сілтілігі, қышқылдығы және нейтралдылығы төмен топырақтарда тіршілік етеді.

*Cytophaga* түрлерінің клеткалары жіңішке ұзындау келген, ұштары үшкір таяқша тәрізді болып келеді. Микроциста түзбейді. *Sporocytophaga* туысының түрлері клеткалары *Cytophaga* түрлеріне ұқсас, бірақ микроциста түзуімен ерекшелінеді. *Sorangium* туысының өкілдері ұштары дөңгеленіп келген таяқшалар. Микроциста, цисталар және жалған жемісті денелер түзеді.

Миксобактериялар кез келген клетчаткасы бар материалда өсіп дамыған кезде шырышты, түссіз, сары немесе қызыл қақтар пайда болады. Миксобактериялар клетчатканың жіпшелеріне (фибриллалар) мықты бекініп өскен кезде гидролиздейді.

Миксобактериялардан басқа клетчатканы ыдыратуға топырақта псевдомонадалар тобына жақын *Cellvibrio* туысының өкілдері де кездеседі. Олардың клеткалары иілген қозғалғыш, бір талшығы бар, эндоспора түзбейтін таяқшалар. Олардың колониялары түссіз немесе сары-жасыл түске боялған. Олар миксобактерияларға қарағанда клетчатканы басқа қоректік заттардың көзі болмаған жағдайда ғана пайдаланады.

Қышқылды топырақта саңырауқұлақтардың *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Betrytis* туыстары өкілдері целлюлозаның ыдырауында негізгі рөлді атқарады. Сонымен қатар, клетчатканы *Actinomyces*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* туыстарының өкілдері де аэробты жағдайда ыдыратуға қабілетті.

Аэробты жағдайда клетчатканы ыдырататын микроорганизмдерді бөліп алу үшін он еселік сұйылту әдісі арқылы көмірстегінің көзі ретінде клетчатка бар Гетчинсон элективті қоректік ортасы сіңірілген силикагель пластинкасында егу арқылы бөліп алып, анықтауға болады.

#### Целлюлозаны анаэробты ыдырату

Целлюлозаны аэробты және анаэробты жағдайда ыдыратуға көптеген микроорганизмдер бактериялар, саңырауқұлақтар, ашытқылар қабілетті. Соның ішінде бактериялардың [\*Clostridium\*](#), [\*Pseudomonas\*](#), [\*Cellulomonas\*](#) туыстары жатады. Оларда целлюлозаны ыдыратуға арналған фермент [\*целлобиозаны\*](#) түзеді.

Целлюлоза ыдыратушы микроорганизмдерді биотехнологияда қолдану малшаруашылығына қажетті жемдік қорды, әсіресе жемдік белоктарды жасауда маңызы зор. Жемдік қорға жасауда кәдімгі астық жинаудан қалған сабанды айтуға болады. Осы сабаннан микроорганизмдердің деструкторлық, шіріту қабілеттіліктерін пайдалан отырып, силос жасау. Силос жасау кезінде құнарын арттырушы құрамында кептірілген сүтқышқылды бактериялар бар закваскалар, қоспалар ретінде ұнды және түрлі шірітінділерді қолданады. Сүтқышқылды бактерияларды қосу себебі басқа шірітуші микроорганизмдердің дамуы үшін сүтқышқылы түзіледі.

Жеміс-жидектер, көкөністерден өнім мол алуда микробтық закваскалар жасаудың маңызы зор. Солардың бірі өсімдіктердің өсетін жеріне компост салу. Оны күз кезінде арнайы бір яма қазып, сол жерге құнарлы қара шірік салынады. Қара шіріктің құрамында органикалық заттарды ыдырататын целлюлоза ыдыратушы микроорганизмдер көптеп кездеседі. Осыған, жапырақ,

шымтезек, көкеністердің қалдықтарын салады. Осылай көктемге дейін қалдырады. Сол кезде органикалық заттарға бай компост даяр болады. Оны кәдімгі бақшаға немесе өсімдік өсіретін топыраққа қосады.

Осыған байланысты, сабақтың мақсаты целлюлоза ыдыратушы микроорганизмдерді бөліп алу және зерттеу болып табылады.

#### **Сабақтың барысы.**

##### **Қоректік орталарды дайындау**

Аэробты целлюлозаны ыдырататын микроорганизмдерді зерттеуге арналған Гетчинсон ортасы –  $K_2HPO_4$  -1,0 г/л;  $CaCl_2$  – 0,1 г/л;  $MgSO_4$  – 0,3 г/л;  $FeCl_3$  – 0.01 г/л;  $NaNO_3$  – 2,5 г/л; дистилденген су – 1 л; рН – 7,2-7,3.

Құрамында қорек көзі жоқ сулы агар – 1 л құбыр суы; 20 г/л агар-агар

Анаэробты целлюлозаны ыдырататын микроорганизмдерді зерттеуге арналған Омелянский қоректік ортасы -  $K_2HPO_4$  -1,0 г/л;  $MgSO_4$  – 1,0 г/л;  $NaCl$  – 1,0 г/л;  $(NH_4)_2SO_4$  – 2,0 г/л;  $CaCO_3$  – 2,0 г/л; сүзгі қағазы – 30 г/л; дистилденген су – 1 л.

##### **Қажетті материалдар**

Колба 500 мл – 3 дана; колба 250 мл немесе 100 мл – 10 дана; Петри табақшасы – 20 дана; 9 мл құйылған биологиялық пробирка – 15 дана; үлкен пробирка – 10 дана; резинка қақпақ -10 дана; пипетка – 20 дана; Сүзгі қағазы; ақ мата; шпатель - 6 дана; спиртовка - 6 дана

#### **Зертханалық жұмыс 14.**

##### **Аэробты жағдайда целлюлозаны ыдырататын микроорганизмдер**

Аэробты жағдайда целлюлозаны ыдырататын микроорганизмдердің санын анықтау.

1. Су агары қоректік ортасын ерітіп, табақшаға құямыз.
2. 1 г топырақтан он еселік сұйылту жасаймыз.
3. Сүзгі қағазымен ақ матаның салмағын өлшеп аламыз.

Табақшаларға құйылған су агары қоректік ортасын үстінен 2 мл Сұйық Гетчинсон қоректік ортасын тамызамыз. Қажетті сұйылтудан 0,1 мл алып егеміз. Стерилді шпательмен жаймалап, оның үстінен пинцетпен тұрақты салмағы анықталған сүзгі қағазын немесе ақ матаны орналастырып шпательмен жақсылап қайтадан жаймалаймыз. Дайын болған табақшаларды ылғалды камераға немесе су құйылған эксикаторға орналастырып, 28-30 оС температурада 12-14 тәулікке қалдырамыз. Содан кейін, сүзгі қағазы мен ақ матаның бетінде өсіп шыққан колониялардың санын санап арнайы формулаға салып есептейміз

5. Құрамында қорек көзі жоқ сулы агар ортасына стерилді сүзгі қағазы мен мата орналастырып, 3-5 мл Гетчинсон сұйық ортасын тамызады. Оның үстінен топырақтың түйіршіктерін салмағы алдын ала анықталған сүзгі қағазы мен матаның бетіне тізіп орналастырасындар. 5-7 тәулік өткен соң топырақ түйіршіктерінің айналасында ыдыратушы микроорганизмдер дамиды. Яғни әртүрлі микроорганизмдер дамыған кезде түрлі болып өзгеріспен өседі. Мысалы, миксобактериялар ылғалды, шырышты болады, спороциитофагтарда осындай мөлдір шырышты колонияның түсі қызғылт сары түс беруі мүмкін. Қоректік ортада целлюлоза ыдыратушы микроорганизмдер өсіп дамыған топырақтың түйіршіктерін санап, пайыздық көрсеткішпен көрсетеді. Содан кейін, сүзгі қағазы мен матаның қалдығын 1 % тік сода ерітіндісімен шайқап, содан кейін тұз қышқылымен шайқайды. Тұз қышқылын ыстық дистилденген сумен шаяды, сосын кептіріп салмағын өлшейді. Жұмыс біткен соң бастапқы сүзгі қағазы мен матаның салмағынан целлюлоза ыдыратушы микроорганизмдердің ыдыратуынан кейінгі салмақтың мөлшерін салыстырып, пайыздық көрсеткішпен көрсетеді.

6. Гетчинсон ортасын 250 мл колбаларға 50 мл-ден құяды. Сұйық қоректік орта құйылған колбаға тұрақты салмағы анықталған қатпарлы сүзгі қағазын ұшын жоғары қаратып салады да, 1 атм да 30 минут залалсыздандырады. Содан кейін қоректік орта құйылған колбаға 5 г. топырақ салып 28-30 °С өсіруге қалдырады. 4-5 тәулік өткен соң қағаздың өзгерісін бақылайды. Аэробты бактериялар сұйықтықтың бетіне таман қағазды айнала сары немесе қызғылт сары қақ түзеді. .

##### **Анаэробты жағдайда целлюлозаны ыдырататын микроорганизмдер**

1. Омелянский қоректік ортасын биік етіп үлкен пробиркаларға құяды. Сүзгі қағаздарын сызықша қылып кесіп пробирканың түбіне салады. Содан кейін, 1 грамм топырақ салып

термостатқа 30-35 °С қалдырады. Анаэробты целлюлоза ыдыратушы микроорганизмдердің санын анықтау үшін он еселік сұйылту жасап (кох әдісімен) тығыз қоректік орталарға егу жүргізеді.

### Сабақты қорыту.

1. Сүзгі қағазы мен ақ матаның бетінде өсіп шыққан колонгиялардың санын санап,

$$(x \pm 2\sigma_x) \cdot K \cdot \frac{1}{V}$$

$x = \frac{\sum x}{n}$  өсіп шыққан колонияның орташа саны

$\sigma_x = \pm \frac{\sqrt{\sum x^2}}{n}$  орташа қателік; K – алынған сұйылту; V – суспензияның көлемі, мл;  $\sum x$  - колониялардың жалпы саны; n – қайталаулар саны

2. Жұмыс біткен соң бастапқы сүзгі қағазы мен матаның салмағынан целлюлоза ыдыратушы микроорганизмдердің ыдыратуынан кейінгі салмақтың мөлшерін салыстырып, пайыздық көрсеткішпен көрсетеді

3. Сұйық қоректік орта құйылған колбаға тұрақты салмағы анықталған сүзгі қағазы мен матаны салып, өзгерісін бақылау. Аэробты бактериялар сұйықтықтың бетіне таман қағазды айнала сары немесе қызғыл сары қақ түзеді.

### Зертханалық сабақ 15.

**Өткізілген зертхаалық сабақтар бойынша тапсырмаларды орындау және бақылау сұрақтарын талдау**