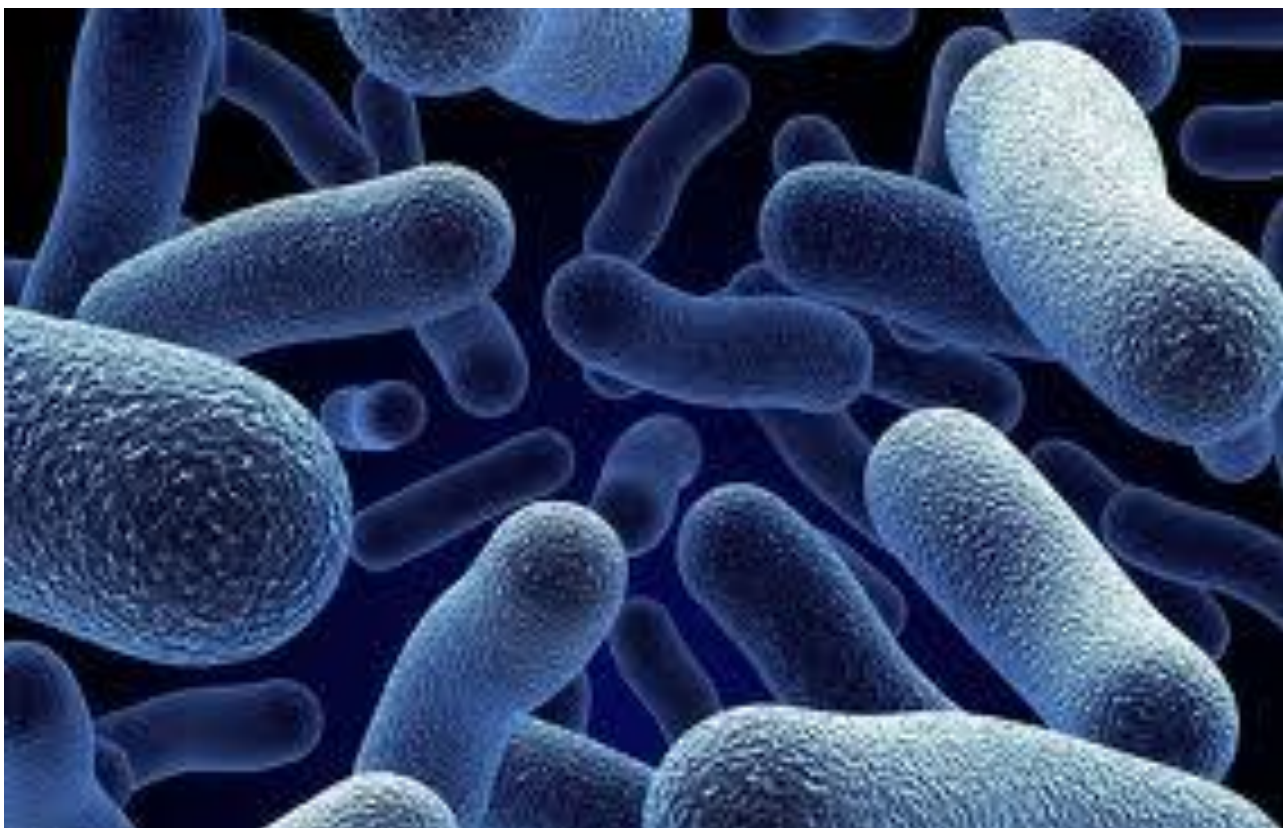


Бержанова Р.Ж., Игнатова Л.В., Мұқашева Т.Д., Сыдықбекова Р.К.,
Савицкая И.С.

**«Микроорганизмдер физиологиясы негіздері»
(зертханалық сабақтарды өткізуге арналған әдістемелік
нұсқау)**



Алматы
«Қазақ университеті»
2013

УДК 576.80.85 (075.8)

Игнатова Л.В., Бержанова Р.Ж., Мукашева Т.Д., Сыдыкбекова Р.К., Савицкая И.С., Кистаубаева А.С. «Микроорганизмдер физиологиясы негіздері» (зертханалық сабақтарды өткізуге арналған әдістемелік нұсқаулық)

Рецензенттер:

Сартаева А.А. к.б.н, ст.преподаватель кафедры биологии Казахского Государственного Женского педагогического Университета

Назарбекова С.Т. к.б.н., доцент кафедры биоразнообразия и биоресурсов КазНУ им. аль-Фараби

Әдістемелік нұсқаулық «5B0070100-Биотехнология». Мамандығының 2 курс студенттеріне арналған «Физиология негіздері» (6 кредит) пәні бойынша зертханалық сабақтарға ----- руководством Оқу құрал қоректік орталарда түрлі таксономиялық топтағы микроорганизмдердің өсу сипаттамалары, табиғи субстраттардан микроорганизмдердің таза дақылдарды бөлнеп алу мен жинақтаушы дақылдар алу әдістері, микроорганизмдерге физико-химиялық факторлардың әсерін зерттеуге арналған зертханалық жұмыстардың толыққанды сипатталуынан тұрады. Әдістемелік нұсқау қазақ және орыс тілдерінде басылып шыққан. ҚР ЖОО-ның биология факультетінің биотехнология мамандығының студенттеріне ұсынылады.

МАЗМҰНЫ

	Бет
АЛҒЫ СӨЗ	5
1 тақырып. Микроорганизмдердің жинақтаушы культураларын алу	7
1 зертханалық жұмыс. Пішен таяқшасының жинақтаушы дақылын алу	7
2 зертханалық жұмыс. Майқышқылды бактериялардың жинақтаушы дақылын алу	8
3 зертханалық жұмыс . Сіркеқышқылды бактериялардың жинақтаушы дақылын алу	9
4 зертханалық жұмыс. <i>Azotobacter</i> туысының бактерияларының жинақтаушы дақылын алу	10
5 зертханалық жұмыс. Ашытқылардың жинақтаушы дақылын алу	11
6 зертханалық жұмыс. Сүтқышқылды бактериялардың элективті дақылдарын бөліп алу	12
7 зертханалық жұмыс. Шіріту бактерияларының элективті дақылдарын бөліп алу	13
8 зертханалық жұмыс. <i>Proteus</i> туысының эллективті дақылдарын бөліп алу	14
9 зертханалық жұмыс. Галофильді микроорганизмердің элективті дақылдарын бөліп алу	14
10 зертханалық жұмыс. Майыдыратушы бактериялардың элективті дақылдарын бөліп алу	15
2 тақырып: Микроорганизмдердің өсуі мен дамуына физико-химиялық факторлардың әсері	17
1 зертханалық жұмыс. Жоғары температуралардың микроорганизмдерге әсері	20
2 зертханалық жұмыс. Ет-пептонды сорпадағы (ЕПС) бактериялардың өсуіне ортаның түрлі рН мәндерінің әсері	21
3 зертханалық жұмыс. Микроорганизмдерге ультракүлгін сәулелелерінің (УКС) әсерін зерттеу	22
4 зертханалық жұмыс. Ортаның осмостық қысымына байланысты ашытқылардың өсуін зерттеу	22
5 зертханалық жұмыс. Дискті-диффузиялық және сұйылту әдісі арқылы микроорганизмдерге антибиотиктердің әсерін бағалау	23

6 зертханалық жұмыс. <i>Escherichia coli</i> мен <i>Bacillus subtilis</i> өсуіне пенициллин мен стрептомициннің түрлі концентрациясының әсері	25
3 тақырып. Микроорганизмдер арасындағы байланыс	28
1 зертханалық жұмыс. Штрих арқылы егу әдісімен микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігін бағалау	29
2 зертханалық жұмыс. Макроколониялар әдісімен микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігі дәрежесін бағалау	30
3 зертханалық жұмыс. «Агарлы блок» әдісімен микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігін анықтау	31
4 зертханалық жұмыс. Бірлесіп дақылдау әдісімен микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігінің индексі мен биосәйкестілігін анықтау	33
4 тақырып: Өсімдіктердің өсуіне топырақ микроорганизмдерінің әсері	36
1 зертханалық жұмыс. Топырақ микроорганизмдерінің өсуді ынталандыру белсенділігін анықтау	37
2 зертханалық жұмыс. Микроорганизмдердің дақыл сұйықтығының әртүрлі концентрацияларының өсуді ынталандыру белсенділігі	38
5 тақырып. Табиғи биотоптардың микрофлорасы	40
1 зертханалық жұмыс. Титрациялық әдіспен топырақтағы ішек таяқшалары тобындағы бактерияларды анықтау	41
2 зертханалық жұмыс. ТИМАЦ жүйесімен энтеробактериялар дифференциациясы	44
3 зертханалық жұмыс. Ауаның жай-күйін санитарлық-бактериологиялық бағалау	48
4 зертханалық жұмыс. Ауаның санитарлық-көрсеткіштік микроорганизмдері ретінде стафилококктардың сипаттамасы мен санын анықтау	50
ҚОРЫТЫНДЫ	53
ӘДЕБИЕТТЕР	54

АЛҒЫ СӨЗ

Микроорганизмдер физиологиясы микробиологияда негізгі орындардың бірін иеленеді. Ол микроб клеткасы мен қоршаған ортада жүріп жатқан қызметтер мен биохимиялық үрдістерді зерттейді. Аталған пән нақты алғанда микроорганизм клеткасының қоректенуін, тыныс алуын, көбеюін, қозғалуын, спора түзуі мен зат алмасуын қарастырады. Дегенмен микробтардағы бұл үрдістер бірқатар өзіндік ерекшеліктерімен сипатталады. Олар: қоректік зат ретінде органикалық қосылыстармен қатар бейорганикалық қосылыстарды пайдалана алуы; аэробты және анаэробты жағдайларда тіршілік етіп, көбеюге қабілеттілігі; спораларының көмегімен ұзақ уақыт сақталуы; қоршаған ортаның өзгеріп отыратын факторларына ерекше түрде бейімделуі.

Физиологиясын меңгеріп білу микроорганизмдердің тіршілігін басқаруға, оларды өндірісте және ауылшаруашылығындағы тәжірибелік мақсаттарда тиімді пайдалануға, сондай-ақ қажет болғанда олармен күресу құралдарын жасауға мүмкіндік береді.

Сол себептен, микроорганизмдердің қасиеттерін терең әрі үздіксіз зерттеуді қажет ететін мәселелер шеңбері едәуір кеңейген, ал микробиологияның түрлі салалары бойынша жылдам білім жинақтау студенттерге арналған оқу-құралдарын үнемі жаңарту қажеттілігін көрсетеді.

Әдістемелік нұсқау микроорганизмдерді табиғи мекен ету ортасынан бөліп алуға, таза және жинақтаушы дақылдарды алуға және микроорганизмдерге физико-химиялық факторлардың әсерін зерттеуге арналған бөлімдерден тұрады.

Олардың ішінде микроорганизмдердің тәжірибеде қолданылуы мен істің биотехнологиялық көрінісі және микроорганизмдер дақылдарымен жұмыс істеудің көпшілік мақұлдаған әдістері қарастырылады. Микроорганизмдер араларындағы қарым-қатынас пен олардың биологиялық белсенділігін анықтауға үлкен назар аударылады. Бөлек таксономиялық топтардың өкілдерін бөліп алу мен диагностикалау әдістері берілген.

Әдістемелік нұсқау «Физиология негіздері» пәнінің үлгілік оқыту бағдарламасы мен ГОСО-ға сәйкес ҚР ЖОО-ның биология факультеттерінің «5В0070100-Биотехнология» мамандығы бойынша білім алып жатқан студенттерге арналған

1 тақырып. Микроорганизмдердің жинақтаушы дақылдарын алу

Мақсаты: қоршаған ортаның түрлі объектілерінен микроорганизмдерді бөліп алудың қағидалары туралы түсінік беру; микроорганизмдердің түрлі физиологиялық топтарының жинақтаушы дақылдарын алу.

Жинақтаушы немесе элективті дақыл деп – бір физиологиялық топтың өкілдері немесе микроорганизмдердің бір ғана түрі басымырақ болатын дақылдарды атайды.

Жинақтаушы дақылдар әдісін микробиологиялық зерттеу тәжірибесіне С.Н. Виноградский мен М. Бейерник енгізген. Барлық микробтар қарапайым қоректік орталарда өсе бермейді. Аралас популяциядан тек қажетті белгілі бір түрдің микроорганизмдерін (зерттеушіге қажет) немесе микроорганизмдер тобын өсіруге арналған қоректік орталарды элективті немесе таңдаулы деп атайды. Бірақ бұл орта басқаларының дамуы үшін аз қажет болады немесе мүлдем қажет болмайды.

Элективті ортаны жасау үшін бөліп алынатын микроорганизмнің қажет деген ерекшеліктерін немесе физиологиясын білу қажет. Микроорганизмдер өсіп, дамуы үшін қоректену көзі ретінде түрлі талаптарды қажет ететіндіктен, элективті жағдайларды жасау барысында көбінесе сәйкес келетін орталар таңдап алынады. Мысалы, молекулалық азотты фиксациялауға қабілетті микроорганизмдер құрамынан азоттың байланысқан формалары алынып тасталған орталарда ғана өсе алады. Егер осындай ортаға топырақ енгізсе, онда оның ішінде болатын алуантүрлі микроорганизмдерден ең алдымен азотфиксаторлар өсіп шағады. Автотрофты микроорганизмдердің жинақтаушы дақылын жалғыз көміртек көзі ретінде көмірқышқылы болатын ортада бөліп алады. Ортада көміртектің басқа қосылыстарының болмауы гетеротрофтардың өсуін тежейді. Қажет болған микроорганизмдердің бір тобының ғана қажеттіліктерін өтеуге қабілетті осындай арнайы қоректік орталар элективті орта атауына ие болады.

Элективті жағдайларды жасау барысында аэрацияға, температураға, орта қышқылдығына, жарыққа және т.б. факторларға әртүрлі микроорганизмдердің түрліше мұқтаж болатындығын ескеру керек. Сондықтан, аэробты микроорганизмдердің жинақтаушы дақылдарын алу кезінде қоректік ортаның ауамен байланысуы үшін көлемді бетпен қамтамасыз етеді, ал ортаны аэробты микроорганизмдермен байыту үшін белгілі бір әдістермен анаэробты жағдайларды жасайды. Жоғары температурада культивирлеу (50°C және одан жоғары) мезофильді микроорганизмдердің өсуін тоқтатып, термофильділердің өсуін ынталандырады. Аталған температурада әртүрлі микроорганизмдердің өсу жылдамдығының ұқсамауы да селективті факторлар болуы мүмкін. Мысалы, 35°C температура мен жарық болған кезде минералды қоректік ортада өсу температурасының оптимальдылығының айырмашылығынан кей кезде жасыл балдырлардың өсуін мүмкіндігінше толығымен тежеп, цианобактериялармен байытылған дақылдарды алуға болады.

Жинақтаушы дақылды алу барысында микроорганизмдердің эндоспора түзу қабілеті секілді ерекшеліктерін де ескеру қажет. Спора түзетін бактерияларды жинақтау үшін қоректік ортаны жоғары температурада аз уақытта қыздыру арқылы (10 мин., 80°C) субстратпен инокулдейді. Осылайша спора түзбейтін бактериялардың өсуін жартылай немесе толық тоқтатып тастауға болады.

Бөліп алатын микроорганизмдердің өсуі үшін элективті жағдайлар әрдайым қолайлы бола бермейтінін айта кету керек. Дегенмен, микроорганизмдер оларды жанама факторларға қарағанда жақсы қабылдайды.

Кейде пигменттелумен бірге жүретін ортаның лайлануы, бетіне қабыршақ пайда болуы, тұнба түзілуі, газ бөліну сияқты бөліп алатын микроорганизмдердің өсуіне тән белгілердің пайда болуынан жинақтаушы дақылдың өсуін біле аламыз. Көзбен шолып байқаудан басқа жинақтаушы дақылды микроскоптау арқылы қажет формаларының болуын анықтайды. Кейде бөліп алған микроорганизмдерден бөлінуге тән зат алмасу өнімдерін анықтауды да қажет етеді.

Тапсырма: пішен таяқшасының, майқышқылды, сіркеқышқылды, сүтқышқылды, шіріту, галофильді және майыдыратушы бактериялардың, *Azotobacter* мен *Proteus* туысының бактерияларын, ашытқылардың жинақтаушы дақылын алу.

Әдістемелік нұсқаулық

1 зертханалық жұмыс. Пішен таяқшасының жинақтаушы дақылын алу

Bacillus subtilis пішен таяқшасы мезофильді спора түзуші бактерияларға жатады. Пастеризация – спора түзбейтін формаларын өлтіруші факторға жатады. Нәтижесінде төзімді споралары бар *Bacillus subtilis* клеткалары көбеюге қолайлы жағдайға ие болады. Жинақтаушы дақыл алу үшін конусты колбалардың ішіне пішенді қайшымен майдалайды да үстіне су құйып, оның үстіне бір салым борды қосады. Су моншасында 80°C –та 10 минут қыздырады. Кейін колбаны мақта тығынмен жауып, 2-3 тәулікке 25°C температураға термостатқа қояды

Келесі сабақта жинақтаушы дақылы бар колбаларды қарап шығады. Қайнатпаның бетіне қабықша түзілгендерін белгілейді. Қабықшаны алып, микроскоптау барысында ұзын жіп бойымен байланысқан, қысқа, жіңішке таяқшаларға назар аударады. Споралар қатаң оқшаулануларсыз орналасқан. Бұл жағдайда басқа микроорганизмдер сирек әрі мардымсыз мөлшерде өседі. Алынған мәліметтерді кестеге енгізеді.

Жинақтаушы дақылдардың салыстырмалы сипаттамалары

Дақылдың атауы	Элективті жағдайлар	Жүргізілген сараптама	Суреті	Ескертулер (газ бөліну, қабықшаның болуы, лайлануы, тән иісі, сілемейдің болуы)

2 зертханалық жұмыс. Майқышқылды бактерияларының жинақтаушы дақылын алу

Майқышқылды бактериялар табиғатта кең таралған, мысалы топырақта (топырақ үлгілерінің 90% осы бактериялардан тұрады), көнде, ластанған су қоймаларында, ыдырайтын қалдықтарда, сүтте, өсімдіктер бетінде және т.б. болады. Майқышқылды ашуды тудырушылар – кластридиялы типті споратүзетін қозғалмалы таяқшалар, қатал анаэробтар. Споралар бірнеше минут бойы 100⁰С температурада қаздыруға төзімді келеді. Майқышқылды бактерияларға тән ерекшеліктің бірі – спора түзілу кезеңінде клеткаға гранулеза жинақталуы. Крахмал, декстриндер типті суда еритін көмірсутектер, ди- және моносахаридтер, органикалық қышқылдар (сүт және пирожүзім қышқылы) және маннит, глицерин спирттері майқышқылды бактерияларға энергетикалық материал ретінде қызмет етеді. Олардың өсуіне қолайлы температура 35-40 °С.

Майқышқылды бактериялардың элективті дақылдарын алу (қоректік ортада жинақтау) олардың анаэробтілігінің жоғары дәрежесіне, спораларының термотөзімділігіне, қолайсыз жағдайда май қышқылдарын өндіретін көптеген бактериялардың және олардың жоғары температурада жақсы даму қабілеттілігіне негізделген.

Элективті жағдайлар келесідей факторлардың қатысуымен жасалады: амилаза ферменті бар микроорганизмдер ғана пайдаланатын крахмал (көміртек көзі); пастеризация; анаэробизм - пробиркадағы ұзын бағаналы сұйықтық және ауаны ығыстыратын, ашу үрдісінде бөлінетін СО₂ мен Н₂.

Майқышқылды ашуды зерттеуге арналған тәжірибелер картопты ортада жасалады. Пробиркаларға (1/3 көлемді) ұсақ туралған картопты салып (қабығымен), пышақтың ұшымен бор қосады да үстіне құбыр суын құяды. Пробиркаларды су моншасына орналастырып, 80⁰С температурада 10 минут қыздырады. Содан кейін оларды суытып, термостатқа 30⁰С қалдырады.

Келесі сабақта майқышқылды бактерияларды микроскоптайды. Препарат даярлау үшін пробиркадан тамшуыр көмегімен ашыған сұйықтықтың

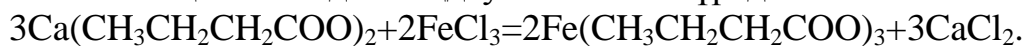
ортаңғы қабатынан қоректік ортаны картобымен бірге алады. Тамшыны заттық шыныға тамызады. Жинақтаушы дақылдың үстіне Люголь ерітіндісін тамызады да оны жабындық шынымен жауып, оның үстіне иммер майын тамызады. Препаратты микроскоптау кезінде кластридиалды пішінді бактерия клеткаларын байқалады.

Клеткалардан жарықты қатты шағылыстыратын сопақша денешіктерді байқауға болады. Бұл споралар. Клетканың гранулеза болатын жерлері көк түске боялады. Майқышқылды бактериялар тобына жататыны айқын, тек қана боялған клеткаларды ғана суреттейді.

Май қышқылының болуын белгілеп алады. Ол үшін келесі сапалық реакцияларды жүргізеді:

1. *Майқышқылды темірді алу* (FeCl_3 –мен реакция). Майқышқылды тұздардың бейтарап ерітінділерін FeCl_3 –пен қыздырғанда майқышқылды темірдің түзілуі салдарынан қоңыр түске боялады.

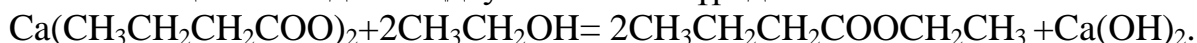
Реакция мынадай теңдеу бойынша жүреді:



Бұл реакцияны жүзеге асыру үшін пробиркаға 3-5 мл ашыған сұйықтықтан құйып алып, үстіне 5%-дық 1-2 мл хлорлы темірді қосып, от жалынында қыздырады. Майқышқылды темір шағылысқан жарықта қоңырқай қызыл түске боялса, ал өтпелі жарықта қою қызыл түске боялады.

2. *Майлыэтилді эфирді алу* (ананас эссенциясы). Пробиркадағы 3-5 мл дақылдық сұйықтыққа 0,5 мл 96%-дық этил спирті мен 1-2 мл күшті күкірт қышқылын қосады. Шайқап, қыздыру кезінде эфирге тән иіс пайда болады (ананас иісі).

Реакция мынадай теңдеу бойынша жүреді:



3 зертханалық жұмыс. Сіркеқышқылды бактериялардың жинақтаушы дақылын алу

Сіркеқышқылды бактериялар этил спиртіні сірке қышқылы мен суға дейін тотықтыратын сіркеқышқылды ашу үрдісін тудырады.

Бұл бактериялар табиғатта кең таралған. Олар пісіп-жетілген жемістерде, жидектерде, ашытылған көкөністерде, ашыған шарап пен сырада кездеседі. Сіркеқышқылды бактериялар – спора түзбейтін, ұсақ таяқшалар. Кейбіреулері қозғалмайды, ал біреулері қозғалады. Олар сапрофиттер, аэробтар, олардың едәуір бөлігі спирті бар сұйықтық бетінде қабықша түзеді. Өсіп-дамуына қолайлы температура 25-35°C.

Басқа да көптеген бактериялармен салыстырғанда олар сірке қышқылы мен этил спиртіне үлкен тұрақтылыққа ие. Олардың осы қасиеттерін элективті жағдайларды жасауда қолданады.

Сірке қышқылымен сәл қышқылдандырылған пастерленбеген сыраны (сыраға өзінің көлемінен 10 немесе 20%, күштілігі 6%-дық асханалық сірке қышқылы), сіркеқышқылды бактериялардың жинақтаушы дақылдарын алу үшін қоректік орта ретінде пайдаланады. Көлемі 100-150 мл конусты

колбаларға қоректік ортаның 30-50 мл құяды. 30-50 мл қышқылданбаған сыра бақылау ретінде алынады. Пастерленбеген сыра ортаны сіркеқышқылды бактериялармен зақымдауға мүмкіндік туғызады.

Субстраты бар колбаны 25-30°C термостатқа қояды. Сіркеқышқылды бактериялардың жинақтаушы дақылын алу кезінде температураны ескеру керек. 15-25°C-та *Acetobacter aceti*, ал 25-35°C-та *Acetobacter pasteurianum* дамиды.

Бірнеше күн дақылдаудан кейін сіркеқышқылды бактериялардың сұрлау-ақ түсті қабықшасы пайда болады. Осы кезде колбаның ішіндегісін сараптауға салады: сіркеқышқылды бактериялардың йодты бояумен байланысын анықтайды; үрдісті тудырушылармен тнысады; сіркеқышқылына сапалық реакция жүргізеді.

Йодпен байланысын анықтау үшін қабықшының кішкене бір бөлігін заттық шыныға орналастырады да оған бір тамшы йод тамызып, үстін жабындық шынымен жабады. Йод тамызған кезде клетка қабықшасының көгеруі *Acetobacter pasteurianum* болуын дәлелдейді. Ал егер клеткалар сарғаятын болса, бұл *Acetobacter aceti* клеткаларының болатынын білдіреді.

Үрдісті тудырушылармен танысу барысында қабықшадан боялған препарат дайындап, объективтің иммерлік жүйесімен қарайды. Басым болатын бактериялардың клетка формаларын, қазғалғыштығын және споралардың бар – жоғын анықтайды. Ашытқылардың болуы мен олардың санының қаншалықты көп екенін анықтайды. Екі колбадағы сыра препаратының микроскопиялық зерттеу нәтижесін салыстырып, басым болатын микроорганизмдерді суретке түсіріп алады.

Ашу нәтижесінде пайда болған сірке қышқылын анықтау үшін сапалық реакция жүргізеді. Ол үшін, пробиркаға колбадан тәжірибе барысында сірке қышқылымен қышқылдамаған сырадан 2 мл құйып, үстіне 4 мл дистилденген су мен 0,5 мл 10%-дық сода ерітіндісін және 1-2 мл хлорлы темір ерітіндісін құйып, қоспаны қыздырады. Сұйықтықтың қою қызыл түске боялуы сіркеқышқылды темірдің пайда болуының нәтижесі.

4 зертханалық жұмыс. *Azotobacter* туысы бактерияларының жинақтаушы дақылын алу

Микроорганизмдер клеткасымен атмосфералық молекулалық азоттың ассимиляциялануы биологиялық фиксация деп аталады. Оны тек микроорганизмдер жүзеге асыра алады.

Атмосфералық азотты ассимиляциялайтын бактерияларды бұршак тұқымдас өсімдіктермен симбиозда тіршілік ететін түйнек бактериялары және топырақта еркін қозғалатындар деп бөледі. *Azotobacter* туысының бактериялары аэробты азотфиксаторлар болып табылады.

Азотобактер клеткаларын топырақтан кездестіруге болады (органикалық заттардың жоғары мөлшері болатын). Элективті жағдайлар Эшби азотсыз ортасына егу арқылы жасалады.

Азотобактер – ауадағы молекулалық азотты азот көзі ретінде, ал

спирттерді, көмірсулар мен органикалық қышқылдарды көміртек көзі ретінде пайдаланатын облигатты аэроб. Азотобактер топырақтың ылғалдылығына және ондағы минералды элементтарға сезімтал келеді. Азотобактердің белсенді дақылдары пайдаланылған 1 г органикалық заттан 15-20 мг азотты фиксациялайды.

Жас дақылдағы *Azotobacter chroococcum* клеткалары таяқша тәрізді, қозғалғыш, мөлшері 3-7 мкм болады. Ескі дақылдағыларының клеткалары кокка тәрізді, жұптасқан және сарцина тәрізді қалташалар, әдетте сілемейлі капсулалармен қапталған болады. Клеткада жылтыр валютин дәндері көп кездеседі. Тығыз қоректік орталардағы колониялар сілемейлі, аққаш немесе ісінген, түссіз немесе қою қоңырдан қара түске дейін боялған болады.

Азотобактерді дақылдауға арналған Эшби қоректік ортасының құрамы(г/100 мл): маннит – 20,0; K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 -0,1; $CaCO_3$ – 5,0; агар – 20,0; құбыр суы.

Азотобактердің жинақтаушы дақылдарының орнатуды топырақ түйіршіктерінен өсіп шығуы әдісімен жүргізеді. Эшби тығыз қоректік ортасының бетіне топырақтың 10-15 түйіршігін салады (диаметрі 1-2 мм). Ол үшін екі сағаттық шыныны алып, фламбирлеу арқылы залалсыздандырады. Сағаттық шынының біреуіне топырақты салады, ал екіншісіне дистилденген су құяды. Тұзақты алдын ала от үстінен өткізіп, сулап алады да топырақ түйіршігін іліп алып, оны қоректік ортаның үстіне орналастырады. Табақшаларды ылғал камера ішіне салып, бөлме температурасындағы термостатқа қояды. Инкубацияның 6-7 тәуліктерінде топырақтың үстіне азотобактердің сілемейлі колониялары өсіп шығады.

Келесі сабақта топырақ түйіршіктеріне өсіп шыққандарына сараптама жүргізеді. Сараптау кезінде колониядан қара бояу (тушь) ерітіндісімен негативті контрастты боялған препараттар дайындап, оларды иммер жүйесімен микроскоптайды. Азотобактер клеткалары шар тәрізді, олардың ішінде диплококктар жиі кездеседі.

5 зертханалық жұмыс. Ашытқылардың жинақтаушы дақылдарын алу

Көптеген ашытқылар қантты этил спирті мен көмірқышқыл газына дейін ыдырататын спирттік ашу үрдісін қоздырушылары болып табылады.



Ашытқылар сапрофиттерге жатады. Олардың ішінде факультативті анаэробтар мен аэробтар болады. Дамуына қолайлы температура 25-30°C, ортаның қолайлы рН көрсеткіші 4-6. Олар табиғатта кең таралған, жеміс-жидектер мен басқа қантты өнімдерде кездеседі және бұзылуына әкеліп соғуы мүмкін.

Ашытқылардың элективті дақылдарын алу олардың әлсіз қышқылды реакцияға ие құрамында қант болатын субстраттар мен олардың этил спиртіне төзімділігіне негізделген.

Батырылған қалтқы мен залалсыздандырылған суслосы бар пробиркаға

қысқышпен 2-3 жидек салып (жүзім, мейіз), бетін мақта тығынмен жауып, 25-30°C термостатқа қоямыз.

Қоректік ортада тұнбаның болуына және тіршілік әрекеті негізінде түзілген өнімдерге қарай ашытқылардың жинақталуын анықтау.

Ашытқының жинақталуын микроскопиялық жолмен анықтау

Қалтқыда газдың жиналуына қарай көмірқышқыл газының пайда болуын анықтау. Сонымен қатар, оны басқа да жолмен анықтауға болады: пробиркадағы ашыған суслонның бетінде көмірқышқыл газдың бөлінуі нәтижесінде көбік пайда болады (немесе оны шайқағанда).

Қыздыру кезінде күшейе түсетін ашыған суслодан алкогольдің иісіне қарай спирттің түзілуін анықтайды.

Суслода түзілген тұнбадан «Жаншылған тамшы» препаратын жасап микроскоптайды. Онда қандай микроорганизмдер басым болатынын анықтап, суретке түсіреміз.

6 зертханалық жұмыс. Сүтқышқылды бактериялардың элективті дақылдарын бөліп алу

Сүтқышқылды бөле отырып қантты ыдыратудан тұратын, сүтқышқылды ашу үрдісін сүтқышқыл бактериялар тудырады. Сүт – сүтқышқылды бактериялардың элективті дақылды алу үшін қолайлы қоректік орта болып табылады. Балғын сүтті температурасы 30...37°C болатын термостатқа қойса, ол бір тәуліктен кейін ішінде басымдылықпен дамиды сүтқышқылды бактериялардың әсерінен ұйды. Сүтте басқа да шіріту бактериялары дамиды, бірақ бөлінген сүтқышқылды олардың тіршілігін тежейді. Егер пастерленген сүтке қандайда бір сүтқышқылды өнімнің немесе сүтқышқылды бактериялардың дақылды салып, термостатқа қойса, онда сүт тез ұйытылады.

Екі колбаға (көлемі 50 см³) оның үштен бір бөлігіндей болатындай етіп сүт құйып, бетін мақта тығынмен жауып қоямыз. Сүті бар бір колбаны 10 минут температурасы 80°C су моншасында пастерлейміз, кейін 30 °C температураға дейін суытып, үстіне 10 мл сүтқышқылды өнім қосамыз (ацидофилина, ряженки және т.б.). Егер таза дақылдарды қосатын болса, онда оны залалсыздандырылған тамшуырман 0,2...0,3 см³ мөлшерде қосады. Екінші колбадағы сүтті ашыту үшін температурасы 30°C термостатқа қояды.

Келесі сабақта сүтқышқылды бактериялармен ұйытылған сүтпен, тұрып ашыған сүттің микрофлорасын салыстырады. Түзілген ұйыған сүттің консистенциясын, сарысуын, газ көпіршіктерін анықтайды.

Екі колбадағы ұйытылған сүттің микрофлорасын салыстырып, суретке түсіріп алады. Ол үшін мынадай жолмен микроскопиялық препарат дайндайды: бактериологиялық тұзақпен сарысудан бір тамшы іліп алады да оны заттық шынының бетіне жайып отырып орналастырады. Жұғындыны кептіріп, фламбирлеу аврқылы бекітеді. Бекітілген препаратты 2...3 минут бойы метилен көгімен бояп, сумен жуады да кептіріп алып, микроскоптайды (иммерлік объективпен). Бактериялар жақсы боялып, ал сүт белогі әлсіз ғана боялады.

Микроскоптау барысында ацидофильді таяқшамен ұйытылған сүттен ұзын, жіңішке спорасыз таяқшаларды; термофильді стрептококктармен ұйытылған сүттен ұзын тізбекті кокктарды, ал мезофильді стрептококктармен ұйытылған сүттен қысқы тізбектер мен жұптасып байланысқан кокктарды анықтау керек.

7 зертханалық жұмыс. Шіріту бактерияларының элективті дақылдарын бөліп алу

Белоктық заттардың ыдырауы арқыл өтетін, күрделі биохимиялық үрдіс шіруді шіріту микроорганизмдері туғызады. Оның соңғы нәтижесі белоктардың құрамы мен құрылысына, үрдістің жүру жағдайларына және тудырушы микроорганизмдер түріне байланысты болып келеді. Белоктық заттардың ыдырайтын өнімдері арасында аминқышқылдары, органикалық қышқылдар, спирттер, көмірсутектер, көмірқышқыл газы, аммиак, аминдер, меркаптандар, скатол, индол және басқа да заттардың бір тобы болады. Шіріту бактериялары табиғатта және тағам өнімдерінде кең таралған. Бұл топтың бактерияларының түрлік құрамы алуантүрлі. Оның ішінде аэробтар мен анаэробтар, көмірсуды ашытатын және ашытпайтыны, спора түзетін және түзбейтіні, қозғалғыш және қозғалмайтындары болады. Белокқа бай өнімдерде шіріту бактерияларының дамуы өнімнің бұзылғандығын білдіреді.

Залалсыздандырылған қоректік сорпасы бар пробиркаға аз ғана топырақ салып, бетін мақта тығынмен жауып қояды. Сонымен бірге, кейін белоктың ыдырау өнімдерін (аммиак пен көмірсутекті) анықтау мақсатында тығынның астына бір жақ соңымен ылғалдандырылған қызыл лакмус қағазының тілігі мен сіркеқышқылды қорғасын ерітіндімен шайылған фильтр қағазының тілігін орналастырады. Қағаз тіліктер пробирканың қабырғалары мен ортаға тимейтіндей етіп орналасуы қажет. Аммиак пен көмірсутек ұшып кетпес үшін пробирка тығынының үстін целлофанмен орап немесе оған резеңке қалпақ кигізіп қойып, оны температурасы 30°C термостатқа қалдырады.

Келесі сабақта белоктың ыдырау өнімдеріне тән сорпаға аммиак пен көмірсутектің бөлінуімен шіріту бактерияларының жинақталғанның анықтайды. Лакмус қағазының көгеруі аммиактың бөлінгенін көрсетеді. Егер көмірсутек бөлінсе, сіркеқышқылды қорғасынмен шайылған фильтр қағазы күкіртқышқылды қорғасынға айналуы нәтижесінде қара түске боялады (немесе қоңырқайланады).

Сорпада түзілген бактекрияларды микроскоптау қажет. «Жаншылған тамшы» препаратын дайындап, ондағы қозғалмалы бактерилар санын анықтайды. «Қарапайым» әдіспен боялған препарат дайындап, бактериялардың клетка пішіні мен спораларын анықтайды.

8 зертханалық жұмыс. *Proteus* туысының бактерияларын элективті дақылдарын бөліп алу.

Proteus vulgaris түрінің бактериялары табиғатта кең таралған, әдетте

шіріген белокты өнімдерде кездеседі. Олар индол, скатол, күкірттісутек сияқты жағымсыз иісі бар өнімдерді түзе отырып, белоктарды белсенді ыдыратады. Көмірқышқыл мен сутектің қышқылдары мен газын бөле отырып көмірсуларды ашытады. Олар сапрофиттерге, факультативті анаэробтарға жатады. Клетка пішіні ұсақ таяқшалар, спора түзбейді және Грам бойынша боялмайды. Дамуына қолайлы температура 37°C, бірақ 25°C температурада да жақсы дамиды. Аса қозғалғыштық протейларға тән ерекшеліктердің бірі. Жинақтаушы дақыл алу үшін оны ілеспелі бактериялардан бөліп алу кезінде және де түрлі объектілерден протейларды анықтауда (Шукевич әдісі) осы ерекшелігін пайдаланады. Протейлардың кейбір түрлері токсин бөлуге қабілетті. Бұл микроорганизмдердің көп мөлшері болатын өнімді пайдалану улануға әкеп соқтыруы мүмкін.

«Қиғаш» агары бар пробиркадағы конденсацияланған суға микроорганизмдермен зақымдалмауы үшін агардың бетіне тигізбей, ұқыптылықпен көлемі 3x3x3 мм болатындай тұрып қалған ет тілігін салады. Ол үшін «қиғаш» агары бар пробирканы агар үстінгі жағында болатындай етіп тігінен ұстау керек. Ет тілігін қысқышпен алып, пробирканың түбіндегі қабырғасына орналастырады. Конденсацияланған суға, етті бактериологиялық ине көмегімен пробирка түбіне орналастырады. Пробирканы мақта тығынмен жауып, тігінен 30°C температураға орналастырады

Келесі сабақта, протейларды өзіне тән дақылдық белгілеріне, «қиғаш» агардың бетіндегі қабаттың сыртқы көрінісіне және микроскопиялық бейнесіне қарай анықтайды. Ол үшін «жаншылған тамшы» препаратын дайындап, басым клеткалардың клетка пішінін анықтайды. Сонымен бірге, «жаншылған тамшы» препаратын микроорганизм клеткаларының қозғалғыштығын анықтау үшін де дайындайды. Препараттағы басым бактериялардың белгілерін протейларға тән белгілермен салыстырады: басқа бактериялардың болуы мен оны санын анықтайды.

9 зертханалық жұмыс. Галофильді микроорганизмдердің элективті дақылдарын бөліп алу

Галофильді микроорганизмдер дегеніміз – ас тұзының (NaCl) жоғары мөлшері болатын субстраттарда өсетін микроорганизмдер. Галофильді микроорганизмдер алуантүрлі. Олардың ішінде шар тәріздісі мен таяқша тәрізділері, спора түзетіндер мен түзбейтіндер, аэробтар мен анаэробтар болады. Олардың тұрақты тіршілік орны тұзды өнімдер, ас тұзы, тұзды су қоймасындағы сулар. Галофильдердің элективті дақылдарын алу олардың тұзға төзімділігіне негізделген.

Бір пробиркада 10% NaCl, екіншісінде 15% NaCl, ал үшіншісінде NaCl мүлдем болмайтын 10 мл қоректік сорпасы бар үш пробиркаға шамамен 1г ас тұзын салады. Пробирканы тығынмен жауып, температурасы 30°C болатын термостатқа қояды.

Келесі сабақта пайда болған галофильді бактериялардың элективті

дақылдарын анықтайды. Микроскопиялау арқылы барлық үш пробиркадағы қоректік ортада өсіп шыққан бактериялардың ұқсастығын табады. Қоректік ортадағы бактерия дақылдары бар пробирканы мұқият шайқайды, әсіресе түбінде тұнбасы болатын болса. Әрбір пробиркадағы қоректік ортаның лайлануды және оның дәрежесін белгілейді. Бұл көрсеткіш ортада микроорганизмдердің қарқынды дамуын көрсетеді. Лайлану дәрежесін мынадай шартты белгілерімен жазады: «+» - төмен; «++» - орташа; «+++» - жоғары. Соңында қорытындылау қажет.

Қоректік сорпада өсіп шыққан микроорганизмдерден «қарапайым» әдіспен боялған препарат дайындап, оларды микроскоптайды. Ір пробиркадағы сорпадағы басым бактериялар споралары мен клетка пішінін анықтайды. Тұзы бар және тұзы жоқ сорпада өсіп шыққан бактериялардың құрамында байқалған ерекшеліктерді (морфологиялық белгілері бойынша) белгілеу керек.

10 зертханалық жұмыс. Майыдыратушы бактериялардың элективті дақылдарын бөліп алу

Майыдыратушы (липолитикалық) бактерияларда липаза ферменті болғандықтан майлардың гидролизін жүргізуге қабілетті болады. Гидролиз нәтижесінде глицирин мен май қышқылдары түзіледі. Липолитикалық бактериялар алуантүрлі келеді. Олардың ішінде спора түзетіндер мен түзбейтіндері, аэробтар мен анаэробтар, сапрофиттер болады. Ал көбісі суыққа төзімді келеді. Бұл бактериялар табиғатта кең таралған және майлардың бұзылуындағы орны жоғары. Майыдыратушы бактериялардың элективті дақылдарын алу қолданылатын қоректік ортаның арнайылығына негізделген.

Қоректік орта ретінде жалғыз көміртек көзі ретінде құрамында май (сиыр, сүт және өсімдік майы) болатын жасанды қоректік орта қолданылады. Залалсыздандырылған қоректік ортасы бар колбаға 1 см³ (пробиркаға 4...5 тамшы) залалсыздандырылған күнбағыс майын қосып, мұқият араластырады да (тығынға тигізіп алмай шайқау керек), 2-3 тамшы бромтимол көгі индикатор тамшысын тамызады. Орта (рН 7,2...7,4) көгілдір-жасыл түске боялады. Қоректік ортасы бар колбаға аздаған топырақ пен сары майдың кесіндісін салып, температурасы 30°С термостатқа қояды.

Келесі сабақта ортадағы майдың гидролизі нәтижесінде түзілген қышқылдардың болуына қарай майыдыратушы бактериялардың дамуын анықтау қажет. рН-тың өзгеруі нәтижесінде ортаның көгілдір-жасыл түстен сары түске айналуына қарай жинақталған май қышқылын анықтайды.

Май болатын ортада өсіп шыққан жинақтаушы дақылдарды микроскоптайды. «жаншылған тамшы» немесе «қарапайым» әдіспен боялған препарат дайындайды.

Құрал - жабдықтар: көлемі 100 мл конусты колба; сұйық Сабуро ортасы; пробиркалар; 1 және 5 мл тамшуыр; Люголь ерітіндісі; FeCl₃; 96%-

дық этил спирті; концентрленген күкірт қышқылы; пастерленбеген сыра; 6%-дық сірке қышқылы; 10%-дық сода ерітіндісі; Эшби ортасы бар Петри табақшалары; топырақ үлгісі; пішен; мейіз; картоп; су моншасы; сүтқышқылды өнімдер; 50 мл³ сүті бар екі колба; сүтқышқылды бактерияларға арналған қоректік ортасы бар көлемі 50 мл³ залалсыздандырылған екі колба; топырақ; аммиак пен күкіртсутек түзілгендегі индикаторлар; целлофан жабын; жаңадан қиғаштатылған, агар қосылған қоректік ортасы бар залалсыздандырылған пробиркалар; тұрып қалған еттің тілімі; құрамында 10% және 15% ас тұзы бар және мүлдем тұзы жоқ сұйық қоректік орта болатын залалсыздандырылған пробиркалар; залалсыздандырылған күнбағыс майы, құрамында K_2HPO_4 - 2 г, $(NH_4)_3PO_4$ - 3 г, Mg_2SO_4 - 1 г, $CaCl_2$ - 0,1 г, $NaCl$ - 0,1 г болатын сұйық жасанды ортасы бар залалсыздандырылған пробиркалар, бромтимол көгі индикаторы, спирт шамы, бактериалды тұзақ, заттық шынылар, жабындық шынылыр, бояулар, иммер майы.

Зертханалық жұмыстың орындалу жоспары:

1 сабақ. Пішен таяқшасы, *Azotobacter* туысының бактериялары, майқышқылды және шіріту бактерияларының жинақтаушы дақылдарын алу мақсатында тәжірибе қою.

2 сабақ. Алынған жинақтаушы дақылдардың дұрыстығына сапалық сараптама жүргізу. Алынған нәтижелерді кестеге енгізу.

3 сабақ. Сіркеқышқылды және сүтқышқылды бактериялар мен ашытқы организмдердің жинақтаушы дақылдарын алу мақсатында тәжірибе қою.

4 сабақ. Алынған жинақтаушы дақылдардың дұрыстығына сапалық сараптама жүргізу. Алынған нәтижелерді кестеге енгізу.

5 сабақ. Галофильді микроорганизмдер мен майдыратушы бактериялардың жинақтаушы дақылдарын алу мақсатында тәжірибе қою. Протеялардың элективті дақылын бөліп алу.

6 сабақ. Алынған жинақтаушы дақылдардың дұрыстығына сапалық сараптама жүргізу. Алынған нәтижелерді кестеге енгізу. Провести сравнительный анализ полученных данных, подготовить отчет.

Бақылау сұрақтары:

1. Ең алғаш жинақтаушы дақылдар әдісін жасаған кім?
2. Қандай дақылдарды жинақтаушы деп атайды?
3. Жинақтаушы дақылдарды алу үшін ұандай физикалық әдістер қолданылады?
4. Табиғи тіршілік ортасынан микроорганизмдердің түрлі физиологиялық тобын бөліп алуда қандай химиялық факторлар қолданылды?
5. Жинақтаушы дақылдарды алу үшін микроорганизмдердің қандай биологиялық ерекшеліктерін пайдаланады?

2 тақырып: Микроорганизмдердің өсуі мен дамуына физико-химиялық

факторлардың әсері

Сабақтың мақсаты: микроорганизмдердің тіршілік әрекеті мен өсуіне сыртқы орта факторларының әсерін зерттеу.

Тіршілік ету ортасы микроб клеткасына үнемі әсер етеіп отырады. Кейбір микроорганизмдер әр түрлі факторлардың кең спектрінде тіршілік етуге қабілетті.

Микроб клеткасына сыртқы ортаның әсерінің нәтижесі фактордың ісер ету механизмі мен ұзақтығына, микроорганизмдердің түрлі төзімділіктеріне, әсері қарқындылығына (мөлшері, концентрациясы), сонымен қатар, ортаның физико-химиялық жағдайларына тікелей байланысты.

Микробиология тәжірибесінде микроорганизмдердің өсу қарқындылығын шамалас көрсеткіштермен белгілейді: сұйық қоректік ортада – лайлану дәрежесімен, ал қатты агарлы орталарды – дақылдың толық өсуімен. Неғұрлым нақты бағалау үшін сандақ әдістерді қолданады: ортаның көлем бірлігіндегі клетка санын санау арқылы (микроскоппен немесе өсіп шыққан аологиялар санын санау), сонымен қатар, ортаның көлем бірлігіндегі дақылдың жалпы биомассасын анықтау арқылы.

Ерітінді буының қысымына таза су буының қысымының қатынасына тең болатын судың белсенділігі a_w , зат алмасуда маңызды рөл атқарады. Судың белсенділігі судың болуына, яғни кебу дәрежесіне, сонымен қатар, ондағы еріген заттар мөлшеріне тікелей байланысты. Кейбір микроорганизмдер қатты қоректік ортада өсу қабілетіне ие болмаса, ал басқалары (ксерофилдер) a_w төмен мәнінде өсе алады.

Микроорганизмдер қоршаған ортадан жартылай өткізгіш мембранамен окшауланатындықтан гипотониялық ерітінділерде су клетка ішіндегі еріген заттардың концентрациясының градиенті бойымен қозғалады, және клеткаға судың түсуін тоқтату үшін белгілі бір күш қолдануды қажет етеді (осмостық қысым). Грамоң бактериялардың осмостық қысымы сұйылтылған ерітінділерде 20 атм. және жоғары болуы мүмкін. Гипертониялық ерітінділерде плазмолизді туғызатын кері құбылыс орын алады (клеткалардан суды «сорып шығарады»).

Тұздар мен қанттардың жоғары концентрациясы ежелден тағам өнімдерін сүрлеуде қолданылып келеді. Табиғатта тұздың жоғары концентрациясы Өлі теңізде, тұзды көлдерде, сорлы жерлерде және т.б. болады. Еріген заттың концентрациясы жоғары болатын ерітінділерде тіршілік етуге қабілетті микроорганизмдер осмофильдер деп аталады. Олардың кейбіреулері тқзбен және қантпен сүрленген тағам өнімдерінің бұзылуын тудырушылар болып табылады, сонымен қатар, микробтық табиғаты бар тағаммен улану көздері де болады.

Ортадағы еріген заттардың жоғары концентрациясында көптеген микроорганизмдерде клетка плазмолизі орын алады. Протоплазма суды сыртқа бөледі және тығыздала түседі; зат алмасу үрдісі тежеледі және клетка анабиоз күйіне өтеді. Плазмолиз құбылысы кейбір тағам өнімдерін тұзбен

және қантпен сүрлеудің негізін салады. .

Микроорганизмдер ішінде едәуір зерттелгендері тұздардың (NaCl) жоғары концентрациясында тіршілік ететіндері, оларды галофилдер деп атайды. .

Өсуіне қолайлы рН мәндеріне қарай микроорганизмдер ацидофильділерге (0-5,5), нейтрофильділерге (5,5-8,0) және алкалифильділерге (8,5-11,5) жіктеледі. Көптеген бактериялар мен қарапайымдылар – нейтрофилдер, саңырауқұлақтар мен балдырлар жалпы рН-тың төмен мәнін қалайтын болса, ал цианобактериялар рН-тың жоғары мәнінде өседі. Алкали- және ацидофильді микроорганизмдердің цитоплазмасының рН мәні 7,5 шамасында болады

Прокариотты организмдердің өсуіне температураның әсерін зерттеу барысында өсу тоқтайтын максималды және минималды температурамен шектелген температура аралығы, сонымен қатар, максималды өсу жылдамдығына қолайлы температура аймағы анықталған. Осы көрсеткіштер негізінде прокариоттарды үш негізгі топқа бөледі: мезофильдер, психрофильдер және термофильдер. Көптеген белгілі түрлер мезофильдерге жатады, олардың қолайлы өсу температурасы 30-40°C арасында жататын болса, ал өсуі мүмкін болатын температура шамасы 10 және 45-50°C аралығында жатады. Қарапайым мезофильдердің бірі *E. Coli*: өсуінің төменгі шегі +10°C, ал жоғарғысы +49°C, байытылған ортадағы өсуінің қолайлы температурасы +37 °C.

Психрофильдердің өсу температурасының аймағы -10 мен +20°C аралығында және одан жоғары шамада жатады. Өз кезегінде психрофильдер облигаттылар мен факультативтілерге бөлінеді. Психрофильді микроорганизмдерге *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Cytophaga* туысының өкілдері, ашытқылар, мицелилі саңырауқұлақтар және балдырлардың кейбір топтары жатады.

Көптеген микроорганизмдер өсудің максималды температурасын жоғарылатқанды нашар көтереді. Микробтардың термотөзімділігі түрлері ерекшеліктері мен тіршілік әрекетінің формасына қарай алуантүрлі келеді: вегетативті клеткалар тез өлетін болса, ал споралылары ұзақ сақталады. Сонымен, спорасыз бактериялар, споралы бактериялардың вегетативті клеткалары, мицелилі саңырауқұлақтар мен ашытқылар 60-70°C температурада 15-30 минут аралығында тіршілігін жояды, ал 80-100°C температурада – бірнеше секундтар аралығында немесе 1-3 минутта тіршілігін тоқтатады. Микроскопиялық саңырауқұлақтардың спорасы 65-80°C температурада тіршілігін жояды. Көптеген бактериялардың спорасы айтарлықтай төзімді келеді: бірнеше сағат аралығында 80-100°C дейін қыздырғанда өледі, сонымен бірге, 20 минут бойына 120°C температурада автоклавтау кезінде тіршілігін мүлдем жояды.

Барлық микроорганизмдер оттегімен өзара байланысуына қарай үлкен екі топқа бөлінеді: O₂ бар ортада өсетін, аэробтар (облигатты, факультативті аэробтар және микроаэрофилдер), мен оттегі жоқ ортада өсетін анаэробтар (аэротолеранттылар, облигаттылар).

Судағы O₂ ерігіштігі жоғары болмағандықтан, аэробты

микроорганизмдер үшін орта мен газ фазасы байланысының максималды беті болатындай жағдайлар жасайды. Олар ортаның жұқа қабаттында өсіру, түрлі араластырулар, барботаждау және т.б. жағдайлар. Ал анаэробтар үшін керісінше ортадағы оттекті жойып отыру керек және кейін осы анаэробты жағдайлар тұрақты болуы қажет.

Тотығу-тотықсыздану потенциалы Eh ортада оттегінің болу көрсеткіші қызметін атқару мүмкін, және ол -500-ден +800 мВ дейін ауытқып отыруы мүмкін. Оның кері мәні жоғары болған сайын орта соғұрлым тотықсыздана түседі (анаэробты жағдайлар).

Электромагнитті сәулелер толқын ұзындығына қарай иондаушы сәулелену (γ - және рентген сәулелері $\lambda < 200$ нм), ультракүлгін сәулелену, көрінетін аймақ, инфрақызыл сәулелену және радиотолқындарға бөлінеді. Әсер етуіне қарай олар: 1) физиологиялық әсер көрсететіндер; 2) летальды және мутагенді әсер ететіндер; 3) жылулық және механикалық әсер ететіндер.

Жақын ультракүлгін, көрінетін жарық және инфрақызыл сәулелер (350 - 400 - 800 - 1100 нм) физиологиялық әсер етеді. Бұл ең алдымен, күн энергиясының химиялық энергияға айналу үрдісі – фотосинтез. Әр түрлі фототрофты микроорганизмдер түрлі толқын ұзындықтарындағы жарықты жұтады. Электромагниттік толқындар фототаксис көрінуі үшін маңызды. Фотосинтездемейтін микроорганизмдерде фототәуелді синтездер болады (мысалы, микобактериялардағы каратиноидтардың түзілуі).

Ультракүлгін сәулелер толқын ұзындығы мен оның мөлшеріне қарай летальды және мутагенді әсер етуі мүмкін. Сонымен бірге, ең алдымен ДНҚ молекуласының бұзылуы байқалады (әсіресе $\lambda = 260$ нм).

Иондаушы сәулелену жоғары энергиясы бар өте қысқа толқындар болып келеді. Мұндай сәулеленудің төмен дәрежесі микроорганизмдерде мутацияларды тудыруы мүмкін, ал жоғары дәрежесі әрқашан өлімге әкеліп соғады.

Ферменттерді зақымдайтын және зат алмасудың бұзылуын тудырушы, микроорганизмдерге микробоцидті әсер ететін химиялық заттардың тобына ауыр металдардың иондар, кейбір көміртек тотығы, циандтер және калий перманганаты, сутек асқын тотығы, хлор әгі, йод секілді белсенді тотықтырғыштар және т.б. жатады.

Антибиотиктер (антибиотиктік заттар) – микроорганизмдер, өсімдіктер және жануарлардың немесе олардың модификацияларының төмен молекулалы зат алмасу өнімдері. Олар басқа микроорганизмдердің өсуін тежейді немесе дамуын толық тоқтатады. Қазіргі таңдағы көптеген белгілі антибиотиктер микроорганизмдер клеткасымен бөлінетіндер болып табылады.

Тапсырма: жоғары температураның, орта рН-ның түрлі мәндерінің, ультракүлгін сәулелерінің, осмостық қысым мен антибиотиктердің микроорганизмдерге әсерін анықтау

Әдістемелік нұсқау

1 зертханалық жұмыс. Микроорганизмдерге жоғары температураның әсері

Спорасыз бактерияларға жоғары температураның әсері

Су моншасын 80°C температураға дейін қыздырады. Қатқан ет-пептонды агар бар Петри табақшасын астыңғы жағынан үш секторға бөледі. Олар дақылдардың қыздыру уақытын білдіреді (0-10-30 белгіленеді). Физиологиялық ерітіндіде (0,85%-дық NaCl ерітіндісі) алдын ала дайындалған пробиркадағы спорасыз бактериялардың (*Escherichia coli*) өлшемесін бактериологиялық тұзақпен 0 яғни қыздырылмаған секторға егеді. Егуді агар бетіне штрих әдісімен жүргізеді. Дақылды бар пробирканы 10 минут су моншасында қыздырып, кейін дақылды 10 деп белгіленген секторға егеді. Пробирканы қайта су моншасына салып, қосымша 20 минут қыздырады да, агардың 30 деген секторына егеді. Табақшаларды температурасы 37°C термостатқа қояды.

Споралы бактерияларға жоғары температураның әсері

Бұл бактериялардың (*Bacillus subtilis*) термотөзімділігін анықтауды спорасыз бактериялар термотөзімділігін анықтағандай етіп жүргізеді.

Зең саңырауқұлақтарының өсуіне жоғары температуралардың әсері

Алдын-ала дайындалған қатырылған сусло-агары бар Петри табақшаларын астыңғы жағынан – 5, 25, 40 (белгілеулер саңырауқұлақты өсіру температурасына сәйкес) деп белгілейді және қақпағын жоғары қаратып орналастырады. Алдын-ала жасалған зең саңырауқұлақтарының спораларының сулы суспензиясын алып, бактериологиялық тұзақпен сусло-агардың бетіне пластинканың ортасына суспензияның бір тамшысын тамызады. Егілген табақшаларды төмен қаратып, дақылдардың өсуіне сәйкес температуралардағы (5, 25 и 40 °C) термостатқа қояды. .

Нәтижелерді сараптау. Споралы және спорасыз бактериялардың термотөзімділігін анықтау үшін табақшалардағы секторларды қарастырады, өсудің болу-болмауын анықтайды; қабаттың ауданы мен тығыздығына қарай шамамен визуалды әдіспен өсу қарқандылығын анықтайды да, келесідей белгіленулерді қолданады: «-» өсудің болмауы, «+» әлсіз өскен, «++» қалыпты өскен, «+++» қарқынды өскен.

Дақылдың біртектілігін анықтау үшін барлық секторлардағы дақылдардан (заттық шыныға бірнеше рет жағу арқылы) фуксинмен боялған препарат дайындайды да, оны микроскоптайды және суретке түсіреді. Тәжірибе нәтижесін 2 кестеге енгізеді.

2 кесте.

Микроорганизмдерге жоғары температураның әсері

Дақыл атауы	80°C қыздырғаннан кейін, мин	Тәжірибені
-------------	------------------------------	------------

	0	10	30	қорытындылау
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Bacillus subtilis</i>				
Ескерту: «-» өсудің болмауы, «+» әлсіз өскен, «++» қалыпты өскен, «+++» қарқынды өскен.				

Зең саңырауқұлағының дамуына температураның әсері келесідей көрсеткіштер бойынша зерттеледі: колониялардың диаметрінің мөлшері (табақшаның астыңғы жағынан миллиметрлік қағаз кесіндісімен өлшенеді) және спора түзілуінің болуы (колониялардың боялған зоналарының мөлшері). Нәтижелері 3 кестеде сипатталады. .

3 кесте.

Зең саңырауқұлағының дамуына температураның әсері

Дақылдарды өсіру температурасы, °С	Саңырауқұлақтың даму қарқындылығының көрсеткіштері, мм	
	колония диаметрі	Спора түзілу зонасы
40		
55		

2 зертханалық жұмыс. Ет-пептонды сорпадағы (ЕПС) бактериялардың өсуіне ортаның түрлі рН мәндерінің әсері

рН 3, 5, 7, 9 болатын залалсыздандырылған ет –пептонды сорпасы бар пробиркаларды дайындайды. Әр пробиркаға залалсыздандыру ережелерін қатаң сақтай отырып, тұзақпен бактериальды дақылды енгізеді (*Bacillus subtilis* или *Escherichia coli*). Пробиркаларды температурасы 37°С термостатқа қояды.

Нәтижелерді сараптау. Пробиркалардағы өсудің бар-жоғын анықтайды. Өсу қарқындылығын клеткалардың тығыздығы бойынша көзбен шолып байқау арқылы анықтайды да келесідей белгіленулер қолданылады: «-» өсудің болмауы, «+» әлсіз өскен, «++» қалыпты өскен, «+++» қарқынды өскен. Тәжірибе нәтижесі кестеге енгізіледі.

Дақылдың біртектілігін анықтау үшін барлық секторлардағы дақылдардан (заттық шыныға бірнеше рет жағу арқылы) фуксинмен боялған препарат дайындайды да, оны микроскоптайды және суретке түсіреді. Тәжірибе нәтижесін 4 кестеге енгізеді.

4 кесте.

Бактериялардың өсуіне ортаның түрлі рН мәндерінің әсері

Атауыкультуры	Ортаның рН мәні	Тәжірибені
---------------	-----------------	------------

	3	5	7	9	қорытындылау
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Bacillus subtilis</i>					
Ескерту: «-» өсудің болмауы, «+» әлсіз өскен, «++» қалыпты өскен, «+++» қарқынды өскен.					

3 зертханалық жұмыс. Микроорганизмдерге ультракүлгін сәулелелерінің (УКС) әсерін зерттеу

ЕПА қоректік ортасы бар залалсыздандырылған Петри табақшасына бактериялар суспензиясының тамшысын енгізіп, Дригальский шпателімен ортаның бетіне біртекті жаяды. Кейін микроорганизмдердің тегіс газонының орталық бөлігіне залалсыздандырылған трафарет с окном орналастырып, 20-30 миунтқа кварц шамының астына қояды, сәулелену көзінен ара қашықтығы 10-20 см болуы керек. Уақыт өткен соң, трафаретті алып тастайды да бетін қақпағымен жауып, 28°C-та инкубациялайды. Тәжірибе нәтижесін 5-7 тәуліктен кейін анықтайды. Ультракүлгін сәулесінің әсерінен трафаретпен жабылған агарлы аймақтарда ғана микроорганизмдер өсіп шыққан. Ортаның қалған бөлігі залалсыздандырылған. Сәулелердің өлімге душар ететін әсері ара қашықтыққы, экспозиция уақытына және сәулелендірілген микроорганизм түріне тәуелді.

Нәтижелерді сараптау. Микроорганизмдердің түрлі дақылдарына УКС әсерін салыстыру. Нәтижесін кестеге енгізіп, суретін түсіріп алу керек.

8 кесте.

Бактериялардың өсуіне УК-сәулесінің әсері

Дақыл атауы	УК-сәулесінің әсер ету уақыты, мин		Тәжірибе қорытындысы
	0	20	
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Bacillus subtilis</i>			
Ескерту: «-» өсудің болмауы, «+» өскен.			

4 зертханалық жұмыс. Ортаның осмостық қысымына байланысты ашытқылардың өсуін зерттеу

Ашытқы клеткаларындағы плазмолиз

Суспензия аз лайланғанша наубайханалық ашытқыларды дистильденген суда ерітіміз Суспензияның бір тамшысын заттық шыныға тамызып, үстіне ас тұзының бірнеше түйіршігін салады. Бірнеше минуттардан кейін микроскоптайды (40x объективінде). Плазмолизге ұшыраған клеткалардың протоплазмасы қабықшадан бөлініп шығып, жиырылады. Микроскоптағы картинаны суретке түсіріп алады.

Бактерияларға ас тұзы концентрациясының әсері

Құрамында түрлі концентрацияда NaCl болатын (0; 5; 10 және 20%-дық)

ЕПС құйылған үш пробиркаға бактерияларды егеді. Пробиркаларды температурасы 37°C термостатқа қояды.

Нәтижелерді сараптау. Пробиркалардағы өсудің бар-жоғын анықтайды. Өсу қарқындылығын суспензияның тығыздығы бойынша көзбен шолып байқау арқылы анықтайды. Өсу қарқындылығын клетка тығыздығы бойынша көзбен шолып бақылау арқылы анықтаап, келесідей белгіленулер қолданылады: «-» өсудің болмауы, «+» әлсіз өскен, «++» қалыпты өскен, «+++» қарқынды өскен. Тәжірибе нәтижесі кестеге енгізіледі.

Дақылдың біртектілігін анықтау үшін барлық секторлардағы дақылдардан (заттық шыныға бірнеше рет жағу арқылы) фуксинмен боялған препарат дайындайды да, оны микроскоптайды және суретке түсіреді. Тәжірибе нәтижесін 9 кестеге енгізеді.

Таблица 9.

Бактериялардың өсуіне түрлі концентрациядағы ас тұзының әсері

Дақыл атауы	NaCl, %				Тәжірибені қорытындылау
	0	0,5	10	20	
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Bacillus subtilis</i>					

Ескерту: «-» өсудің болмауы, «+» әлсіз өскен, «++» қалыпты өскен, «+++» қарқынды өскен.

5 зертханалық жұмыс. Дискті-диффузиялық және реттік сұйылту әдісі арқылы микроорганизмдерге антибиотиктердің әсерін

Бактериялардың антибиотикке сезімталдығын анықтаудың негізгі әдістері: *in vitro* – агардағы диффузия әдісі (қағаз дисктер), реттік сұйылту, бета-лактамазаны өндіру қабілетін анықтау; *in vivo* – микробсыз жануарлар моделінде, қан мен зәрдегі антибиотик концентрациясын анықтау.

Агардағы диффузия әдісі белгілі бір концентрациядағы түрлі антибиотиктер сіңірілген стандартты дискілерді пайдалануға (терапиялық мөлшері мен ДДСҰ мақұладауына сәйкес), стандартты қоректік орталарға және әдістерге негізделген.

Нәтижелерді бағалауға арналған арнайы кестелер болады. Кестеге сәйкес дақылдарды тестілеу антибиотиктеріне сезімталдар, орташа төзімді және төзімділер деп жіктейді.

Антибиотиктерді реттік сұйылтулар әдісі МПК едәуір нақты анықтауға мүмкіндік береді. Бірақ әдістің көлемді болуына байланысты Метод серийных разведений антибиотиков позволяет более точно определить МПК, однако из-за громоздкости применяется реже. аз қолданылады.

Бета-лактамазалық тест (бета-лактамазаны түзу қабілетін анықтау) көбінесе гидролизде дискінің түсін өзгертетін цефалоспорин – нитроцефині бар диск әдісімен анықтайды. Тестінің оң болуы бактериялардың барлық бета-лактамазаға сезімтал пенициллиндерге төзімділігін білдіреді.

Химиялық заттардың антибактериалды әсерін зерттеу үшін де дискілі-

диффузиялық әдіс қолданылады. Нақты нәтижелерге қол жеткізу үшін бақылауға тиісті микроорганизмдердің эталон штамдары қолданылатын, стандартты дискілер мен қоректік орталарды қолдану қажет.

Агарға нашар диффузияланатын полипептидті антибиотиктерге микроорганизмдердің сезімталдығын анықтауда дискі әдісі нақты нәтижелер бере бермейді.

Агарлы ортаға антибиотиктерді диффузилау әдістері

Диффузияның классикалық әдісі. 20 минут бойы 37°C температурада кептірілген, жаңа дайындалған ортаға жаңадан өскен дақылдарды егеді. Олар ортаға сіңгеннен соң ойғыш көмегімен ойық шұңқыр (лунка) жасап, ішіне 0,1 мл зерттелетін антимикробтық препарат ерітіндісін құяды. Табақшаларды төңкермеген күйде мұқият термостатқа қояды. 18 сағаттан кейін тест-микробтың өсу аймағының диаметрінің тежелуі бойынша антибиотиктердің белсенділігін анықтайды.

Дискілі-диффузиялық әдіс. Петри табақшасындағы агар бетіне белгілі бір тығыздықтағы бактериалды суспензияны (әдетте McFarland бойынша лайланудың эквивалентті стандарты бойынша 0,5) тегістеп жаяды. Дайындалған суспензияның тығыздығы $1-2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл *Escherichia coli* концентрациясына сәйкес болуы тиіс. Бұл концентрация МакФарленд бойынша 0,5 оптикалық тығыздығына сәйкес келеді. Мұндай тығыздықты Л.А. Тарасевич атындағы ГИСК бойынша оптикалық тығыздығы стандартты 5 бірл. болатын бактериалды суспензияны 2 есе сұйылту арқылы алады. Суспензияны дайындап алғаннан кейін 15 минут ішінде газон алу үшін агар бетіне егеді. Осы мақсатта ұстағышта залалсыздандырылған мақта тампондарын қолданады. Тампондарды бір рет бактериалды суспензияға батырып алады да, пробирка ішіндегі сұйықтыққа ақырын қысып тамызады. Кейін тампонды агардың бетіне штрих әдісімен үш реттен жүргізіп егіп шығады, әр кез табақшаны 60°C бұрып отыру қажет. Соңында сол тампонмен табақшаның қабырғасы бойымен жүргізе отырып, агардың бетіне айналыдра егу жүргізеді. Табақшаларды бөлме температурасында 15-20 минут ұстағаннан кейін, залалсыздандырылған анатомиялық қысқышпен ортаның бетіне табақшаның шетінен 2,0-2,5 см қашықтықта 5-6 индикатор дисктерін орналастырады. Диск пен орта арасында ауа қалмас үшін, орнатылған диск қысқыштың басымен ақырын жаншылады. Табақшаларды 30 минуттай бөлме температурасында ұстайды, кейін төңкерілген күйде 18-24 сағатқа термостатқа қояды.

Нәтижелерді сараптау. Дақылдардың сезімталдығы залалсыздандырылған аймақтардың диаметрі мм-мен өлшенгеннен кейін 10 кесте бойынша бағаланады.

10 кесте.

Дискілі және реттік сұйылту әдістерімен микроорганизмдердің антибиотиктерге сезімталдығын анықтау нәтижелерін бағалау

Антибиотик	Дискілер әдісі: өсудің тежелу аймағының диаметрі			Сериялық сұйылту әдісі: минимальды ингибирулейтін концентрация мкг/мл	
	Төзімділер	Умеренно устойчивые	Сезімталдар	Устойчивые	Чувствительные
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	-
Ристамицин	≤ 9	10-11	≥ 12	-	≤ 5

10 кестені пайдалана отырып алынған нәтижелер мен мәліметтерді бағалап, 11 кестеге енгізу керек.

11 кесте.

Зерттелген дақылдардың антибиотикке сезімталдығын бағалау

№ п/п	Антибиотик атауы	Өсудің тежелу диаметрі (мм)	Төзімділері	Умеренно устойчивые	Сезімталдары
1					
2					

6 зертханалық жұмыс. *Escherichia coli* мен *Bacillus subtilis* өсуіне пенициллин мен стрептомициннің түрлі концентрациясының әсері

Қатты ортадағы титрлер әдісі (реттік сұйылту)

Антибиотиктердің реттік сұйылтуларын дайындаймыз. Ол үшін пробиркаға 1000000 бірліктен стрептомицин мен бензилпенициллин тұзын (сәйкесінше 1 г мен 0.5 г ұнтақ) 10 мл суда ерітіміз. Антибиотиктердің концентрациясы - 100000 бірл./мл. Сонан соң алдыңғы сұйылтудан залалсыздандырылған тамшуырман әрбір антибиотиктің ерітіндісінен 1 мл

алып, 10 мл залалсыздандырылған суы бар пробиркаға енгіземіз. Бұл кезде антибиотиктер концентрациясы 10000 бірл./мл болады. Әрі қарай келтірілген сызбанұсқа бойынша антибиотиктер концентрациясы - 1000 бірл./мл, 100бірл./мл және 10 бірл./мл болатын сұйылтулар дайындайды. .

Залалсыздандырылған тамшуырман әрбір сұйылтудан (10000 бірл./мл, 1000 бірл./мл, 100 бірл./мл, 10бірл./мл) 1 мл алып, ішінде ерітілген және суытылған 4 мл агары бар пробиркаға енгізіп, агар қатып қалмай тұрып пробиркаларды қиғаш етіп орналастыру керек. *Escherichia coli* мен *Bacillus subtilis* дақылдарының өлшемін тұзақпен қатты ортаның бетіне егеді. Оларды 18-20 сағат өсіреді. Антибиотиктердің түрлі концентрациясындағы микроорганизмдердің өсу қарқындылығын белгілеу керек. в пробирки, содержащие по 4 мл расплавленной и охлажденной агаризованной среды, скосить пробирки до застывания агара. На поверхность плотной среды петлей засеять взвесь культур. Посевы выращивать 18-20 часов. Отметить интенсивность роста микроорганизмов при разных концентрациях антибиотиков. Өсу қарқындылығын клетка тығыздығы бойынша көзбен шолып бақылау арқылы анықтаап, келесідей белгіленулер қолданылады: «-» өсудің болмауы, «+» әлсіз өскен, «++» қалыпты өскен, «+++» қарқынды өскен. Тәжірибе нәтижесі кестеге енгізіледі.

12 кесте.

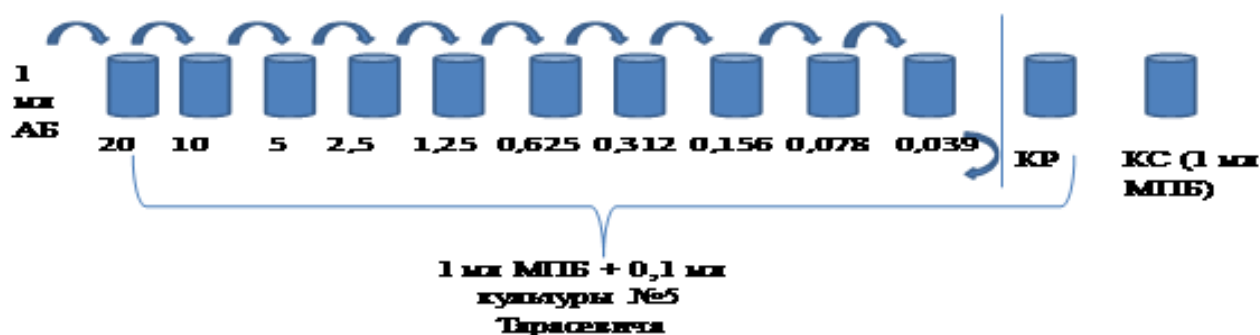
Микроорганизмдердің өсуіне пенициллин мен стрептомициннің түрлі концентрациясының әсері

антибиотик	концентрация	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
стрептомицина	10000		
	1000		
	100		
	10		
бензилпенициллина	10000		
	1000		
	100		
	10		
Ескерту: «-» өсудің болмауы, «+» әлсіз өскен, «++» қалыпты өскен, «+++» қарқынды өскен.			

Сұйық ортадағы титрлер әдісі (реттік сұйылту)

Бұл әдіспен зартеліп отырған бактерия дақылдарының (*Escherichia coli* мен *Bacillus subtilis*) өсуін ингибирлейтін антибиотиктің минимальды концентрациясын анықтайды. Алдымен құрамында арнайы ерітінді мен буфер ерітіндісіндегі антибиотиктің белгілі бір концентрациясы (мкг/мл немесе Бірл/мл) болатын негізгі ерітіндіні дайындайды. Одан сорпадағы барлық келесі сұйылтуларды жасайды (көлемі 1 мл), кейін әрбір сұйылтуға 1 мл-нің құрамында 10^6 - 10^7 бактериалды клеткалар болатын 0,1 мл зерттелетін

бактериалды суспензияны қосады. Соңғы пробиркаға 1 мл сорпа мен 0,1 мл бактерия суспензиясын құяды (дақыл бақылауы. Екпені келесі күнге дейін 37°C –та инкубациялайды да одан кейін дақылдың бақылауымен салыстыра отырып, қоректік ортаның лайланына қарай тәжірибе нәтижесін белгілейді. Мәлдір қоректік ортасы бар соңғы пробирка зерттеліп отырған бактерия дақылдарының (*Escherichia coli* мен *Bacillus subtilis*) құрамындағы антибиотиктің минимальды ингибирлеуші концентрациясы (МИК) әсерінен өсуінің тежелуін көрсетеді.



1 сурет. Антибиотиктің минимальды ингибирлеуші концентрациясын (МИК) анықтау .

Құрал - жабдықтар: ЕПА, Сабуро орталары бар Петри табақшалары; ішінде ЕПС ортасы бар пробиркалар; залалсыздандырылған құбыр суы бар пробиркалар; бактериялар мен ашытқылар суспензиясы, лайлану стандарттары; антибиотиктері бар дискілер; бактериологиялық тұзақ; 1 мл-лік тамшуырлар; Дригальский шпателі; залалсыздандырылған мақта тампондар; қысқыштар; стрептомицин мен бензилпенициллин тұзы; спирт шамы.

Зертханалық жұмыстың орындалу жоспары:

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

2 сабақ. Микроорганизмдерге жоғары температуралардың әсерін бағалау үшін тәжірибе қою, кесте құру.

3 сабақ. Ортаның түрлі рН мәндерінде бактериялардың өсуін және ультракүлгін сәулелердің әсерін зерттеу бойынша тәжірибе қою.

4 сабақ. Ортаның түрлі рН мәндерінде бактериялардың өсуін және ультракүлгін сәулелердің әсерін зерттеу бойынша тәжірибе қою. Алынған нәтижелерді кестеге енгізу.

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

6 сабақ. Микроорганизмдердің өсуіне осмостық қысымның әсерін анықтау бойынша алынған нәтижелерді кестеге енгізу. Алынған нәтижелерге салыстырмалы сараптама жүргізіп, есеп беру..

7 сабақ. *Escherichia coli* мен *Bacillus subtilis* өсуіне пенициллин мен стрептомицин әсерін анықтау үшін дискілі-диффузиялық әдісімен тәжірибе

кою.

8 сабақ. *Escherichia coli* мен *Bacillus subtilis* өсуіне пенициллин и стрептомицин әсерін анықтау үшін дискілі-диффузиялық әдісімен тәжірибе қою. *Escherichia coli* мен *Bacillus subtilis* өсуіне пенициллин и стрептомициннің түрлі концентрацияларының әсерін анықтау мақсатында тәжірибе қою.

9 сабақ. Бактерия дақылдарының (*Escherichia coli* мен *Bacillus subtilis*) өсуін ингибирлеуші антибиотиктердің минимальды концентрациясын анықтау.

Бақылау сұрақтары:

1. Қандай факторлар микрооргнаизмдердің табиғатта таралуына әсер етеді?
2. Микроорганизмдердің қандай белгілері олардың табиғатта кең таралуын қамтамасыз етеді?
3. Қандай физико-химиялық факторлар микроорганизмдерді едәуір қатты тежейді?
4. Стерилизация, дезинфекция жүргізу барысында қандай мақсаттар қойылады?
5. Микрооргнаизмдердің молекулалық оттегімен байланысы қандай?
6. Әсер ету механизмдеріне қарай антимикробтық заттар қалай жіктеледі?

3 тақырып. Микроорганизмдер арасындағы байланыс

Микробтар антагонизмі – әр түрлі микрооргнаизм түрлерінің биологиялық сәйкессіздігі. Антагонизм микробтар әлемінде кең таралған және микроорганизмдердің бір түрі екінші бір түрінің өсуін тоқтатып, дамуын тежейді. Антимикробтық күші табиғаты әр түрлі заттардың: органикалық қышқылдардың, сутек асқын тотығының, ферменттер мен антибиотик сияқты заттар негізінде жүзеге асады

Антагонисттік белсенділікті анықтау әдістері негізделеді:

- 1) Қатты ортада аралас дақылдаудағы сезімтал бактериялардың өсуін тежеу аймақтарын анықтауға;
- 2) Сұйық ортада қоспаларды екеннен кейін өсіп шыққан индикатор бактериялар мен антагонист колониясының сандық қатынасын анықтауға.

Микроорганизмдер антагонизмін зерттеудің бірнеше амалы бар: *in vivo*, гнотобиологиялық технологияларды пайдалану арқылы, сонымен қатар *in vitro*, бірлесіп дақылдау мен мерзімі ұзатылған антагонизм әдісімен.

Тапсырма:

1. Берілген микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігін штрих арқылы егу, макроколониялар, «агарлы блок» әдісімен анықтау.
2. Берілген микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігін қатты және сұйық қоректік ортада бірлесіп дақылдау әдісімен анықтау.

Әдістемелік нұсқаулық

Антагонизмді *in vitro* анықтау әдістерінің ішінде зерттелетін және индикатор микроорганизмдерді жеке-жеке және бірізділікпен дақылдауға негізделген қатты қоректік ортадағы мерзімі ұзартылған антагонизм әдісі едәуір кең таралған. Сандық бағалаудың неғұрлым қарапайым әдісінің біріне қатты қоректік ортада зерттелетін дақылдардың колония айналасындағы тест-дақылдардың өсуінің тежелу аймағының ұзындығын ескере отырып (штрих, блок, колония, лунка) жүргізетін мерзімі ұзартылған антагонизм әдісі болып табылады. Оның бірнеше нұсқалары бар:

- 1) Штрих арқылы егу әдісі;
- 2) Макроколония әдісі;
- 3) «лунка» әдісі.

1 зертханалық жұмыс. Штрих арқылы егу әдісімен микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігін бағалау

Бұрыннан белгілі немесе болжанып отырған антагонистті қоректік агары бар табақшаның бетіне диаметрі бойынша сызықтар арқылы немесе зерттелетін бактериялар үлгісін салатын жартылай кепкен агардағы арнайы кесілген «ойыққа» егеді. Антагонистті термостатта 18-48 сағат дақылдайды (түріге қарай). Кейін антагонисттің өсу зонасына тікелей жақын жерге антагонисттік әсерге сезімталдығы тексеріліп отырған микроорганизмдерді перпендикуляр штрих арқылы егеміз (2 сурет). Бұл жағдайда сезімталдық дәрежесі нысана-микроорганизм өсуін тежейтін аймақтың көлемімен анықталады

Микроорганизмдер арасындағы қарым-қатынас типін суреттеуде Джонсон мен Карл дәрежесі қолданылады.

A=0 балл – екі организмнің аралас өсуі немесе қсудің тежелуінің болмауы;

B=1 балл – байланысу кезіндегі екі-жақты келісілген тежелу, дақылдар жанасқаннан кейін екі организмде өсу тоқтайды;

B₁=2 балл – байланысу кезіндегі екі жақты келісілген тежелу, бірнеше күннен кейін антагонист тежейтін организмнің үстіне өсе бастайды;

C= 3 балла – екі-жақты келісілген ара қашықтықта тежелу;

D=4 балл – байланысу кезінде бір организмнің тежелуі , антагонист тежелген организмді басып өседі;

E= 5 балл – байланысу кезінде бір организмнің тежелуі, антагонист тежелген организмнен жоғары өзгеріссіз жылдамдықпен өсе береді.

Көрсетілген өлшем бірліктерге сәйкес балмен әрбір штамм бойынша антагонизм индексін есептейді. Алынған мәліметтерді 13 кестеге енгізеді.



2 сурет. Штрих арқылы егу әдісі

13 кесте.

Зерттеліп отырған штамның антагонизм индексі

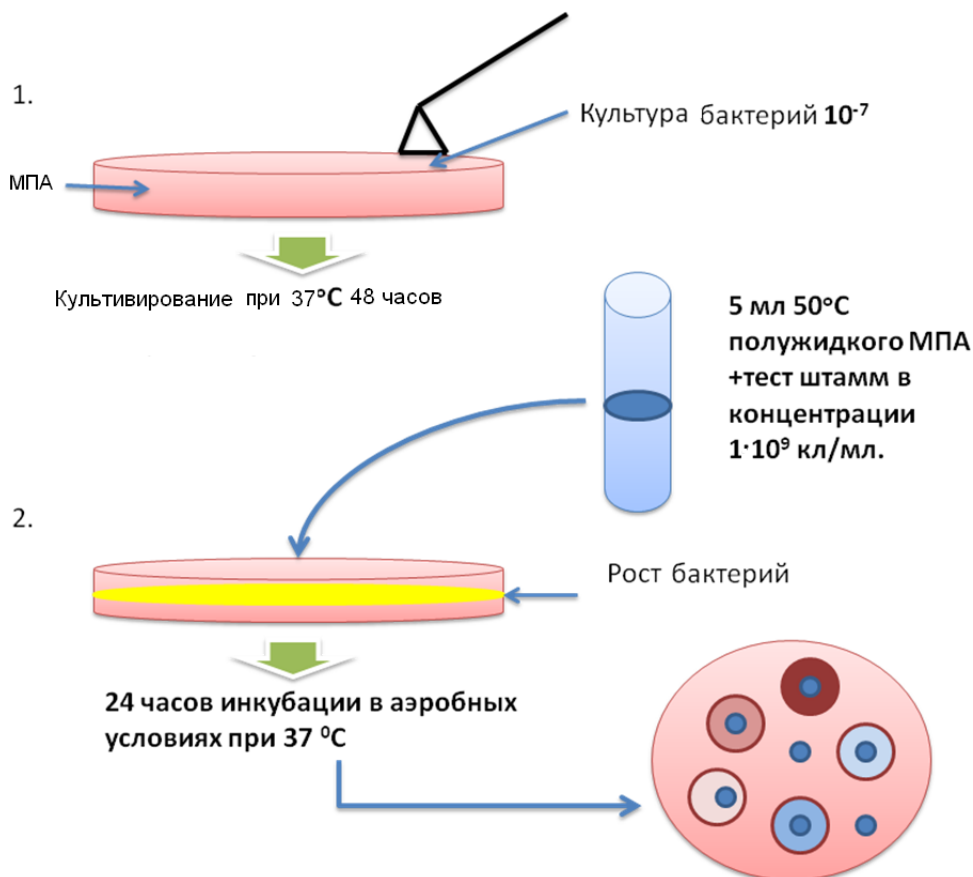
Тест-культура	Индекс антагонизма	Тәжірибені қорытындылау
1		
2		
3		

2 зертханалық жұмыс. Макроколониялар әдісімен микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігі дәрежесін бағалау

Әдетте макроколониялар түрінде жартылай сұйық агары бар қоспаға екінші қабат етіп егіп қоятын, бір тест-дақыл бойынша тексерілетін бактериялардың бірнеше жаңа штамдарының антагонисттік белсенділігін анықтауда қолданылады (3 сурет).

Орындалуының қарапайым болуына байланысты әдіс антагонист-дақылдың әсерінен кейін өміршең клеткалар санын анықтауға мүмкіндік

бермейді. Сол себептен, оны жартылайсандық әдіс ретінде қарастырады. Осыған сәйкес, 1993 ж. М.Л. Альтшуллер тест-дақылдың өсуінің тежелу аймағының көлемінің антагонист колониясының диаметріне қатынасы болып табылатын, «ингибирлеу коэффициенті» деп аталатын арнайы көрсеткішті ұсынды.



3 сурет. Макроколониялар әдісі

Осыған байланысты антагонисттік белсенділіктің 3 дәрежесін анықтайды: нөлдік – өсіп шықпаған зонаның ұзындығы бойынша 1,0 мм дейін; орташа – 1,1-4,9; жоғары - 5 мм және жоғары. Алынған нәтижелерді кестеге енгізеді.

14 кесте.

Зерттелетін штамның антагонисттік белсенділігінің дәрежесі

Тест-культура	Антагонисттік белсенділігінің дәрежесі, мм	Тәжірибені қорытындылау
1		
2		
3		

3 зертханалық жұмыс. «Агарлы блок» әдісімен микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігін анықтау

Антагонист-микробтың өсу үрдісі барысында экзометаболиттер бөлінетін дақылдық сұйықтықпен тест-микроорганизмдердің өсуін тежейтін қабілеті бойынша антагонисттік белсенділігін анықтауға болады. Бұл мақсатта «агарлы блок» әдісі қолданылады.

Қатты орталардағы микробтардың антагонизмін бағалау тәсілдері басқа түрлеріне қарағанда келесілерімен ерекшеленеді:

- агар бетіне егілетін барлық тест-штамдар зерттелетін дақыл газонынан бірдей қашықтықта жатады ($2 \pm 0,2$ мм);

- антагонист – дақылдардың клетка санын стандартау мен өзгертіп тұруға мүмкіндік береді;

- өсіп шыққан тест-штамм колонияларының санын есептеу арқылы сандық нәтижелерді алу мүмкіндігін болжайды;

- нәтижелерді бағалау мүмкін болатын салыстырмалы бақылау нұсқалары болуын болжайды;

- микробоцидті және статистикалық әсерлерді бағалау мүмкіндігін болжайды.

Тазалықты сақтай отырып белгілі диаметрі (6-8 мм) бар металл немесе шыны цилиндрмен Петри табақшасындағы агар пластинкасынан агарлы блоктар таңдалып алынып тасталады. Олардың орнында антагонисттік белсенділігі анықталатын зерттелетін дақыл сұйықтығын құятын ойықтар пайда болады. Бір табақшаға 6-8 ойық жасауға болады. Ойықтарға субстратты қымас бұрын агар беті тест-дақылдар суспензиясымен шайылады.

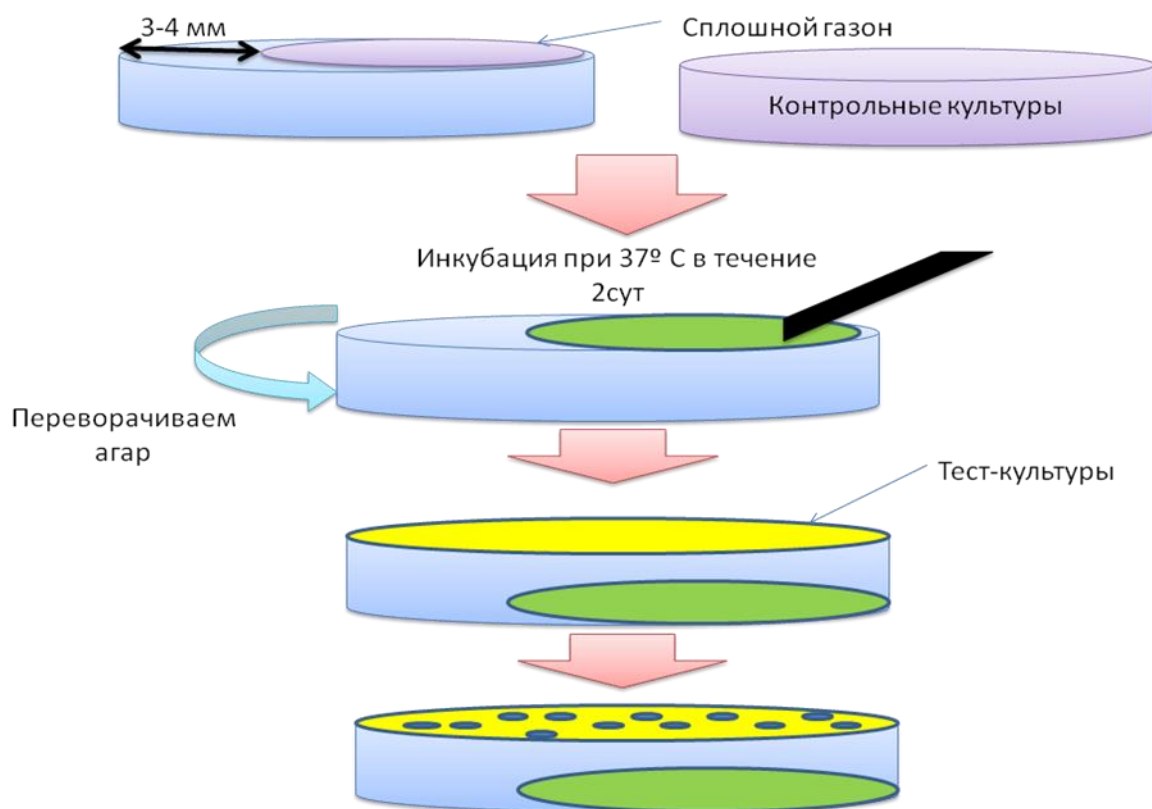
Ойықтарға түрлі бастапқы сұйықтықтардың сұйылтуларын енгізіп, антагонисттік белсенділігінің титірін шартты бірліктермен анықтауға болады. Тәжірибе нәтижелері кестеге енгізіледі.

15 кесте.

Зерттелетін штамның дақылдық сұйықтығының антагонисттік белсенділігі

Тест-дақылдар	Дақылдық сұйықтық сұйылтулары			Тәжірибені қорытындылау
	1:1	1:10	1:100	

Ескерту: +белсенділік бар, -белсенділік жоқ.



4 сурет. Мерзімі ұзартылған антагонизм әдісі

16 кесте.

Зерттелетін штамның антагонисттік белсенділігі

Тест-дақылы	Өсіп шыққан колониялар саны	Тәжірибені қорытындылау
1		
2		
3		

4 зертханалық жұмыс. Бірлесіп дақылдау әдісімен микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігінің индексі мен биосәйкестілігін анықтау

Қатты қоректік орта да. Қатты қоректік ортада зерттелетін штамм мен индикатор штамды аралас дақылдау әдісін Н.А. Глушанова ұсынған. Қоректік орта бетіне бактериологиялық тұзақпен диаметрі 3 мм болатындай етіп, сұйық қоректік ортада өсірілген және лайлану стандарты бойынша стандартталған тәуліктік дақылды тамызады. Тамшы кепкен соң оның шетінен 1-2 мм қалдырып, сол ортаның бетіне сондай көлемде зерттелетін дақалдың басқа түрін тамызады, ол ағып бара жатып, бірінші тамшының жартысын жабады

Бірігіп егілген бөлікте дақылдар бір-бірімен бәсекелесе отырып, бірлесе отырып өседі. Екінші тамшы кепкеннен кейін егілген табақшаларды

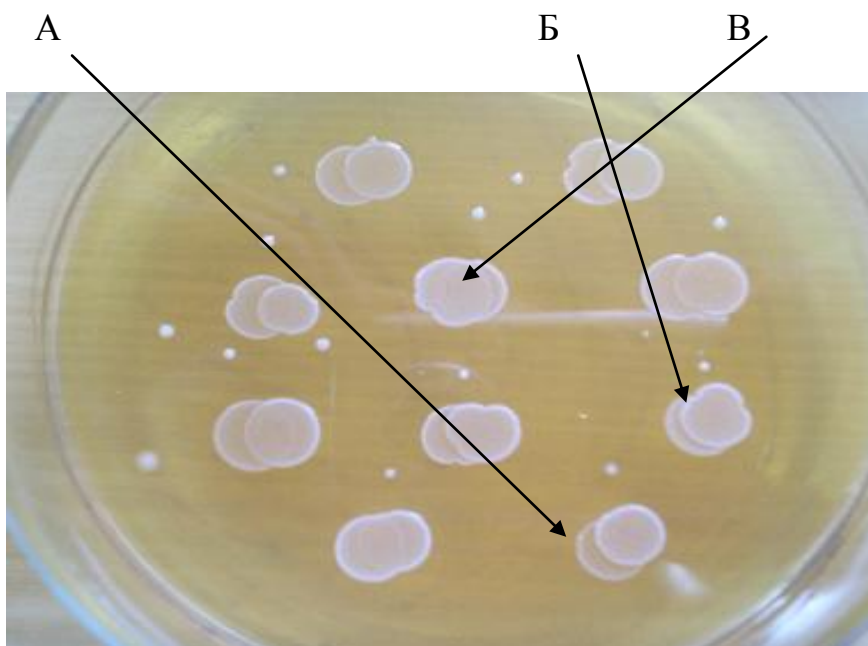
төңкеріп, 37–39°C құрамында көмірқышқыл газы жоғары болатын ортада инкубациялайды. Әр тәжірибені дақылдардың орнын ауыстыра отырып екі реттік қайталаумен жүргізеді. Жоғарыда келтірілген әдістеме бойынша біріне-бірі қабаттасқан бір дақылдың тамшылары бақылау болып табылады.

Нәтижелердің есебі инкубация басталғаннан кейін 24 және 48 сағаттан кейін жүргізіледі (5 сурет). Зерттеліп отырған дақылдардың бірінің өсуі тежелетін болса, онда олардың арасындағы қарым-қатынасты антагонисттік деп қарастырады. Ал ол дақылдарды биосәйкессіздер санатына жатқызады.

Бірлесіп дақылдау аймағындағы зерттелетін штамдардың өсуі артқан кезде немесе дақтар толық бірлесуі байқалған жағдайда ғана дақылдарды биосәйкес деп есептеуге болады (мутуализм, синергизм, сателлизм).

Егер екі дақылдың біреуі бірлесіп дақылдау аймағында тамызу кезегіне карамастан екінші дақылдың өсуін тежей отырып, өсетін болса, онда мұндай нұсқасын әлсіз антагонизм деп бағалайды.

Басқа бір зерттелетін дақылдың дағының перифериясы бойымен басқа бір дақылдың тежелу аймағы (өсудің тежелуі) анық байқалатын болса, онда мұны күшті антагонизмнің белгісі ретінде қарастырады.



5 сурет. Қатты қоректік ортадағы бірлесіп дақылдау әдісімен микроорганизмдердің биосәйкестілігін анықтау: А – штамдар сәйкессіздігі (дақылдардың бірінің «жоғарыға шығуы»); Б – штамдар сәйкессіздігі (байланыс аймағында тестіленетін дақылдардың бірінің өсуінің тежелуі); В – штамдар сәйкестілігі (дақылдардың байланысу аймағы тегістелген) .

17 кесте.

Зерттелетін дақылдардың биосәйкестілігі

Дақылдар	Биосәйкестілік	Тәжірибені қорытындылау

1+2		
2+3		
1+3		
Ескерту: «+» дақылдар биосәйкестілігі; «-» -дақылдар биосәйкессіздігі.		

Сұйық қоректік ортада. Бактериялардың антагонисттік қабілетін сұйық қоректік ортада анықтау белгілі аралықтардан кейін, инкубацияланатын бактериялармен бірге белгілі сандық қатынаста қатты ортада жүйелілікпен егіліп отыратын жолмен жүзеге асады. Егу жұмысын табақшада сандық есеп жүргізе алатындай изоляцияланған колониялар өсетіндей етіп жүргізеді. Сонымен қатар, микроб-антагонистінің колониялары санына өсіп шыққан тест-микроб санының қатынасын, антагонисттік белсенділік индексін, анықтайды.

18 кесте.

Зерттелетін дақылдардың биосәйкестілігі

Дақылдар	Антагонисттік белсенділік индексі	Тәжірибені қорытындылау
1+2		
2+3		
1+3		

Құрал-жабдықтар: ЕПА, Сабуро қоректік орталары бар Петри табақшалары; залалсыздандырылған құбыр су бар пробиркалар; бактериялар мен ашытқылар суспензиясы; лайлану стандарттары; бактериологиялық тұзақ; 1 мл-лік тамшуырлар; Дригальский шпателі; спирт шамы.

Зертханалық жұмыстың орындалу жоспары

1 сабақ. Штрих арқылы егу әдісімен микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігін анықтау мақсатында тәжірибе қою.

2 сабақ. Әрбір штамның антагонизм индексін балмен есептеу. Определить индекс антагонизма по каждому штамму в баллах. Полученные результаты внести в таблицу. Макроколониялар әдісімен микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігін анықтау мақсатында тәжірибе қою.

3 сабақ. Зерттелетін штамның антагонисттік белсенділігінің дәрежесін анықтау. Агарлы блок әдісімен микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігін анықтау мақсатында тәжірибе қою.

4 сабақ. Зерттелетін штамның дақылдық сұйықтығының антагонисттік белсенділігі титрін анықтау. Мерзімі ұзартылған антагонизм әдісімен микроорганизмдердің антагонисттік белсенділігін сандық бағалау бойынша тәжірибе қою .

5 сабақ. Микроорганизмдердің қарым-қатынасын анықтау мақсатында қатты ортада бірлесіп дақылдау әдісімен тәжірибе қою.

6 сабақ. Зерттелетін дақылдардың биосәйкестілігін анықтау. Кестені толтыру. Микроорганизмдердің қарым-қатынасын анықтау мақсатында сұйық ортада бірлесіп дақылдау әдісімен тәжірибе қою

7 сабақ. Зерттелетін дақылдардың антагонисттік белсенділігі индексін анықтау. Нәтижелерді кестеге енгізу. Алынған мәліметтерге салыстырмалы сараптама жүргізу, жұмыстың есебін дайындау.

Бақылау сұрақтары:

1. Микроорганизмдер қарым-қатынасы типтері.
2. Микроорганизмдер әлеміндегі антагонизм.
3. Бактериялар мен актиномицеттер – антибиотик өндірушілері.
4. Биоценоздағы антибиотиктер рөлі.
5. Өсімдік шаруашылығында антибиотиктерді қолдану
6. Тағам өндірісінде антибиотиктерді қолдану

4 тақырып: Топырақ микроорганизмдерінің өсімдіктің өсуіне әсері

Мақсаты: Топырақ микроорганизмдерінің өсуді ынталандыру белсенділігін анықтау.

Түрлі әсерге ие метаболиттердің биосинтезіне бағытталған микроорганизмдердің көптеген биологиялық қызметі белгілі. PGPM (Plant Growth-Promotion Microorganisms) агробиотехнологияда болашағы зор микроорганизмдер болып табылады. Олар өсімдіктің өсуін ынталандыратын және өнімділігін арттыратын биопрепараттарды жасауда кеңінен қолданылады.

PGPM қолдану химиялық тыңайтқыштардың орнын алмастыра алатын таптырмайтын шешім және Қоршаған ортаның ластануын жоғарылатпауға мүмкіндік береді. Себебі, оларды өсімдіктердің табиғи тіршілік ортасынан бөліп алады. Сонымен қатар, өсуді ынталандырушы микроорганизмдердің әсері тиімділігі өсімдіктің түріне, өсіру жағдайларына және басқа да көптеген факторларға тәуелді. Микроорганизмдердің өсімдіктің өсуін ынталандыру қабілеті олардың негізгі үш қасиетіне байланысты. Олар: 1) өсімдіктің өсуін реттейтін фитогармондардың бөлінуіне; 2) олардың әсерімен өсімдіктердің қоректену элементтерінің қолжетімділігінің артуымен; 3) өсімдіктің түрлі аурулардан қорғана алуына. Бұл қасиеттер PGPM-нің әр түрінде көрінуі мүмкін немесе бір түрінде ғана жинақталуы мүмкін.

Өсімдіктің өсуін ынталандыратын микромицеттерге (PGPM) *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* туыстарына жататын көптеген түр өкілдерін жатқызады..

Тапсырма: топырақ микроорганизмдерінің өсуді ынталандыру белсенділігін анықтау.

Әдістемелік нұсқау

1 зертханалық жұмыс. Топырақ микроорганизмдерінің өсуді ынталандыру белсенділігін анықтау

Дәндерді дайындау. Тәжірибе үшін шығым жақсы көлемі мен сыртқы түрлері ұқсас бір сорттың дәндері таңдап алады. Тәжірибені жүргізу үшін сұлы (*Avena sativa*) мен соя (*Glycine hispida*) дәндері қолданылады. Клетка титрі 10^{-4} КТБ/мл болатын дақылдық сұйықтықта дәндерді жібітіп қояды. Залалсыздандырылған құбыр суында жібітілген тұқымдары бақылау ретінде қойылады. Дәндердің шығымының төмендеуі мен тамыр, өскіндердің өсуінің тежелуі бақылаумен салыстырғанда 30% -дан жоғары болатын болса, онда мұндай дақылдар улы болып есептеледі.

Дәндерді залалсыздандыруда сутек асқын тотығы мен этанолдың қоспасы (1:1) болып табылатын, аралас залалсыздандыруды қолданады. Залалсыздандырудан кейін тұқымдарды 3-5 рет залалсыздандырылған дистилденген сумен жуады. Дәннің қабығы қатты болған сайын, залалсыздандыру режимі де соғұрлым қатаң болуы тиіс және де тұқымдардың тек сырты ғана емес, сонымен бірге іші де жұқтырылатынын ескеру қажет. Мысалы, сұлы дәнін залалсыздандырудан бұрын 20 минут бойы сабын ерітіндісінде ұстайды, кейін оларды 1 сағат құбыр суы астында жуады. Залалсыздандырылған құбыр суында алдын-ала ісінген дәндерді залалсыздандыру жеңілдейді. Қолданылатын ерітінділердің концентрациясы мен залалсыздандыру уақыты тест-объектінің физиологиялық ерекшеліктері мен тәжірибе мақсатына сәйкес болуы мүмкін.

Өсуді ынталандыру белсенділігін анықтау. Дәндерді Петри табақшасының ішіндегі фильтр қағазының үстіне орналастырып, үстіне 2-3 мл дақылдық сұйықтықты құяды (бұл мөлшері $d=90$ мм Петри табақшасы ішіндегі дәндер мен фильтр қағазының сулануы үшін қажет). Бақылау нұсқасының дәндері залалсыздандырылған құбыр суымен суландырылады. Тәжірибе ұзақтығы 7-ден 14 тәулікке дейін. Тәжірибе аяқталысымен тамыр мен өскін сабағының ұзындығын өлшейді (6 сурет), сонымен қатар, жапырақтар санын санап, 19 кестені толтырады.



6 сурет. Тамыр мен өскіннің сабағының ұзындығын өлшеу

19 кесте.

Микроорганизмдерінің өсуді ынталандыру белсенділігін анықтау

Микробтық дақыл	Тамыр ұзындығы, мм	Сабақ ұзындығы, мм	Жапырақ саны, шт
1			
2			
Бақылау			

2 зертханалық жұмыс. Микроорганизмдердің дақыл сұйықтығының әртүрлі концентрацияларының өсуді ынталандыру белсенділігі

Алдыңғы жұмыстың нәтижелері бойынша өсуді ынталандыруға қабілетті дақылдарды тағдап алады. Дақылдық сұйықтықтың 1:2, 1:5 и 1:10 болатын сұйылтуларын дайындайды.

Залалсыздандырылған дәндерді Петри табақшасының ішіндегі фильтр қағазының үстіне орналастырып, үстіне 2-3 мл дақылдық сұйықтықты құяды (бұл мөлшері $d=90$ мм Петри табақшасы ішіндегі дәндер мен фильтр қағазының сулануы үшін қажет). Бақылау нұсқасының дәндері залалсыздандырылған құбыр суымен суландырылады. Тәжірибе ұзақтығы 7-ден 14 тәулікке дейін созылады. Тәжірибе аяқталысымен тамыр мен өскін сабағының ұзындығын өлшейді, жапырақтарын санап, шикі биомасса мен хлорофилл концентрациясын анықтайды. Нәтижелерін 20 кестеге енгізеді.

Алдын –ала бөлінбеген өсімдіктің фотосинтездеуші пигменттерінің спектрофотометриялық сараптамасы

Жапырақ өлшемесін (300-500 мг) фарфор үккіште 1 мл 85%-дық ацетон қосып езеді. Үстіне тағы 3 мл ацетон қосады. Алынған сығындыны фильтр қағазы арқылы сүзіп алып, 663,644 және 440,5 нм толқын ұзындықтарында ерітіндінің тығыздығын анықтайды.

20 кесте.

Микроорганизмдердің түрлі концентрацияларының өсуді ынталандыру белсенділігі

Микроорганизм дақылы	Тамыр ұзындығы, мм	Сабақ ұзындығы, мм	Жапырақ саны, дана	өңделмеген биомасса, г	Хлорофилл концентрациясы, өңделмеген салмағының мг/г
Дақыл атауы, 1:2 сұйылту					
Дақыл атауы, 1:5 сұйылту					
Дақыл атауы, 1:10 сұйылту					

Пигменттер концентрациясын (С) тәжірибе жүзінде алынған жұтылудың меншікті коэффициенті негізінде құрастырылған теңдеумен есептейді. Төменде анықтауға арналған формула келтірілген:

- 85%-дық ацетон үшін (Robbelen бойынша):

$$C_{\text{хл.а}} (\text{мг/л}) = 10,3 * D_{663} - 0,918 D_{644}$$

$$C_{\text{хл.б}} (\text{мг/л}) = 19,7 * D_{644} - 3,87 D_{663}$$

$$C_{\text{хл.а}} + C_{\text{хл.б}} = 6,4 * D_{663} + 18,8 D_{644}$$

$$C_{\text{кар.}} = 4,695 * D_{440,5} - 0,268 (C_{\text{хл.а}} + C_{\text{хл.б}})$$

Концентрациялар мг/л–мен берілген.

- Ацетонды сығындыдағы пигмент концентрациясын есептеу арқылы оның зерттелетін материалдағы сығындымен қоса мөлшерін анықтайды:

$A = (C_x V) / P * 1000$, мұндағы А – пигмент мөлшері, мг/г құрғақ (немесе өңделмеген салмағы); С – пигмент концентрациясы, мг/л; V – сығындылар, мл; P–құрғақ өлшем (немесе өңделмеген) салмағы.

Құрал – жабдықтар: залалсыздандырылған фильтр қағазы бар Петри табақшалары, залалсыздандырылған құбыр суы бар пробиркалар, бактериялар мен ашытқылар суспензиясы; өсімдік дәндері; дәндерді залалсыздандыруға арналған спирт ерітіндісі мен сутек асқын тотығы; бактериологиялық тұзақ; 85%-дық ацетон; 1 мл тамшуырлар; спирт шамы; сызғыш.

Зертханалық жұмыстың орындалу жоспары:

1 сабақ. Кейбір топырақ микроорганизмдерінің өсуді ынталандыру қабілетін анықтау мақсатында тәжірибе қою.

2 сабақ. Өсімдік өскіндеріндегі жапырақ санын, тамыры мен сабағының ұзындығын есептеу керек. Алынған нәтижелерді кестеге енгізеді. Микроорганизмдердің дақылдық сұйықтығының белсенділігін анықтау мақсатында тәжірибе қою.

3 сабақ. Сұйылтылған дақылдық сұйықтықтың өсуді ынталандыру белсенділігін тамыр мен сабақ ұзындығы жапырақ санына, хлорофилл концентрациясы мен өңделмеген биомасса бойынша анықтау қажет. Нәтижелерін кестеге енгізеді. Алынған нәтижелер бойынша салыстырмалы сараптама жүргізеді. Есеп дайындайды.

Бақылау сұрақтары:

1. Микроорганизмдердің бірінші және екінше реттік метаболиттері туралы.
2. Микроорганизмдер өндіретін физиологиялық белсенді қосылыстар сипаттамасы.
3. Өсімдіктің өсуін ынталандыратын микроорганизмдерді тәжірибеде қолдану және сипаттамасы.
4. Микроорганизмдер мен өсімдіктердің қарым – қатынас типтері.
5. Өсімдіктердің өсуін ынталандыратын фитагормондарды өндіретін микроорганизмдер.

5 тапсырма. Табиғи биотоптар микрофлорасы.

Сабақтың мақсаты: Топырақтағы ішек таяқшалары тобының бактерияларын анықтау әдістері.

Топыраққа түскен адам мен жануарлардың қалыпты микрофлорасы, сонымен қатар, патогенді микроорганизмдер әдетте ұзақ өмір сүрмейді. Дегенмен, адамның қалыпты микрофлорасы өкілдері топырақ биоценозы құрамына қосылуға қабілетті. Ал бөлек түрлері тұрақты мекенетушілері болып қала береді. Осыған байланысты, топырақтан табылған адам мен жануарлардың қалыпты микрофлорасы осы биотоптың ластанғанының белгісі. Мұндай микроорганизмдерді санитарлық – көрсеткіштік микроорганизмдер деп атайды. Санитарлық – көрсеткіштік микроорганизмдер (СКМ) – қоршаған ортаның, СКМ-нің түсу жолымен түсіп отыратын, патогенді микроорганизмдермен жанама ластануын көрсететін өзіндік индикаторлар.

СКМ – дардың едәуір ақпараттық тобына ішек таяқшалары бактериялары жатады (ІТТБ). Оған жұқпалы ауруларды (тиф, дизентерия және т.б.), тағамнан улануды (*Salmonella* туысының кейбір бактериялары) туғызатын микроорганизмдер және адам мен жануарлардың ішегіндегі тұрақты қалыптысы – ішек таяқшасы (*Escherichia*) мен оның түрлері жатады.

Ішек таяқшасы – барлық аталған микроорганизмдер ішінде санитарлық көрсеткіш болып есептеледі. Себебі, олардың қоршаған ортада өзгеріссіз сақталу мерзімі патогенді микроорганизмдердің тіршілік мерзімдерімен сәйкес келеді. Сонымен қатар, ішек таяқшаларын анықтау әдістері де тиімді болып табылады. Ішек таяқшалары тобының бактерияларының бөлек туыстарының санитарлық – көрсеткіштік мәні бірдей болмайды. *Escherichia* туысы бактерияларының тағам өнімдерінде, суда, топырақта, жабдықтарда табылуы бұл объектілердің жуық арада фекальді ластанудың болуының көрсеткіші. Ол үлкен санитарлық және эпидемиологиялық мәнге ие. *Citrobacter* мен *Enterobacter* туысының бактериялары едәуір ескі фекальді ластану көрсеткіші болып табылады. Сондықтан олардың санитарлық – көрсеткіштік мәні *Escherichia* туысының бактерияларына қарағанда төмен шамаға тең болады.

Ішек таяқшалары тобының бактерияларын (ІТТБ), микроорганизмдердің 3 туысына бөледі.: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, олар *Enterobacteriaceae* тұқымдасына жатады. *Escherichia* туысына микроорганизмдердің 5 түрі кіреді. Олар: *E.coli*, *E.blattae*, *E.fergussonii*, *E.hermanii* u *E.vulneris*. *Citrobacter* туысына үш түр кіреді: *C.amalonicus*, *C.diversus*, *C.freundii*, ал *Enterobacter* туысы 12 түрді біріктіреді. Олар көптеген ортақ морфологиялық, дақылдық және ферментативті қасиеттерге ие. ІТТБ құрамына ұсақ қозғалғыш, грамтеріс, спора түзбейтін таяқшаларды жатқызады. Олар 37°C температурада (5 – 24сағат ішінде) қышқыл мен газ түзе отырып, лактоза мен галактозаны ферменттеуші және оксидазалық белсенділікке ие болмайтын микроорганизмдер.

Топырақтың жалпы бактериалды ластануы маңызды көрсеткіштерге жатады. Ол үшін мезофильді аэробты және факультативті анаэробты микроорганизмдер санын (КМАиФАМ) анықтайды. Сапрофитті микроорганизмдердің жоғары саны органикалық ластануды көрсетеді, микробтық контаминацияда санитарлық – көрсеткіштік микроорганизмдер саны басым болады.

Микробтық сан – салмақ бірлігінде немесе зерттелетін объектіде болатын микроорганизмдердің жалпы мөлшері. (1 г топырақ, 1 мл H₂O, 1 м³ ауа).

Тапсырма: Топырақтағы ішек таяқшалары тобының бактерияларының санын титрациялық әдіспен анықтау, ТИМАЦ жүйесімен, ацетатты және үшканти агардағы энтеробактериялардың дифференциациясын жүргізу, седиментациялық әдісті қолдана отырып микробтық санын анықтаудағы нәтижелері бойынша ауаның жағдайын санитарлық-бактериологиялық бағалау жүргізу, стафилококктардың санын анықтау және оларды ауаның санитарлық-көрсеткіштік микроорганизмдері ретінде сипаттау.

Әдістемелік нұсақау

1 зертханалық жұмыс. Титрациялық әдіспен топырақтағы ішек таяқшалары тобындағы бактерияларды анықтау

1. Топырақ үлгілерін таңдап алу

Әдетте үлгілерді бір жерден, топырақ бетінен (0 - 1 см) залалсыздандырылған құралдармен (пышақ, шпатель) 0,3 - 0,5 кг мөлшерінде алады. Алынған үлгілерді залалсыздандырылған ыдыстарға салып, зертханаға алып келеді. Егер үлгіні сол ауақыт аралығында зерттеу мүмкіндігі болмаса, онда 4 - 5°C температурада 24 сағат қана сақтауға болады.

2. Сараптамаға топырақты таңдап алу және дайындау

Көлемі 0,5 кг болатын орташа үлгіні дайындау үшін бір телімнің топырақтарының барлық үлгісін залалсыздандырылған қағаз бетіне төгіп, залалсыздандырылған шпательмен мұқият араластырады да, тастарды және басқа қатты заттардан тазартады.

Егер алдында топырақты диспергирлейді. Осы мақсатта топырақты тазалық жағдайларын сақтай отырып, диаметрі 3мм болатын елеуішпен елейді. Елеу кезінде елеуіш бетін залалсыздандырылған қағазбен жауып қою керек. Шірімеген өсімдік массасын алып тастайды.

Топырақ микоорганизмдері мен энтеровирустарды анықтау үшін 1-ден 10 г дейін, санитарлық-көрсеткіштік микоорганизмдер үшін 1-ден 30 г дейін, ал патогенді энтеробактерияларды анықтауға 50 - 55,5 г өлшеме қажет.

Топырақты алдын – ала өңдеудегі негізгі мақсат топырақ агрегаттарынан микоорганизмдер клеткасын бөліп алу болып табылады. Ол топырақ бөліктерінің бетінен микоорганизмдердің десорбциялануымен және реттіліктің бұзылуымен жүзеге асады. Топырақты алдын – ала өңдеудегі негізгі әдістері:

1) топырақ өлшемі 1 г болатын, резеңке тығыны бар пробиркалардағы алғашқы сұйылту суспензиясын 10-минут тігінен шайқау; вертикальное встряхивание почвенной суспензии первого разведения в пробирках с резиновыми пробками - при навеске почвы

2) 1 г жоғары топырақ өлшемі бар, алғашқы сұйылту суспензиясын араластырғышта 3 минут өңдеу.

1 мл-де 0,1 г топырақ болатын, алынған суспензияны алдын – ала өңделгеннен соң 30 секундтан кейін (осы уақыт ішінде үлкен минералды бөлшектер тұнба болып түседі). топырақтың жүйелі кемімелі концентрациясын алу үшін пайдаланады.

Топырақ өлшемінің алғашқы сұйылтуын (1:10) залалсыздандырылған ыдыста топырақ салмағымен 1:10 қатынасында залалсыздандырылған құбыр суын қосып дайындайды (мысалы: 1 г топырақты 10 мл залалсыздандырылған құбыр суында, 10 г топырақты – 100 мл суда дайындайды). Өлшемді дайындап алғаннан кейін алынған микоорганизм түрі мен типіне байланысты сәйкес келетін топырақтың алдын – ала өңдеуін жүргізеді. Ол үшін құрамында 0,1 г/мл топырақ болатын флакондағы алғашқы сұйылтудан

залалсыздандырылған тамшуырман 1 мл алып, оны 9 мл залалсыздандырылған құбыр суы бар пробиркаға енгізеді. Сонымен қатар, құрамында 0,01 г/мл топырақ болатын екінші сұйылтуды дайындайды. Осы операцияны қайталап отырып топырақ сұйылтуын 0,0001 - 0,00001 г/мл жеткізеді. Сұйылту дайындағанда оның әрқайсысына жеке тамшуыр қолдану қажет.

Дайын болған десятильды сұйылтуларды түрлі қоректік орталарға топырақты егуде пайдаланады. Сонымен қатар, тікелей микроскоптау әдісімен микроорганизмдер санын анықтауда пайдаланылады.

Салыстыруға келетін және едәуір толық нәтижелер алу үшін әбден құрғаған 1 г топырақта кездесетін микроорганизмдер санын қайталап есептеп отыру талап етіледі. Ол үшін топырақтың зерттелетін үлгісіндегі ылғалдылықты анықтап алу қажет. Осы мақсатта топырақ өлшемін (10 - 20 г) алдын – ала өлшенген шыны немесе метал бюксқа салып, 105°C болатын кептіргіш шкафта кептіреміз. Кепкен топырақтан алғашқы бақылау үшін өлшеуді 3 сағаттан кейін жүргізеді (әрбір 2 сағат сайын бақылау өлшеу жүргізеді). Есептеу келесідей формула бойынша жүргізіледі:

$$N = \frac{N_c \times 100\%}{100\% - C\%} = n \times a,$$

Мұндағы,

N – әбден құрғаған 1 г топырақтағы клеткалар саны;

N_c – өңделмеген 1 г топырақтағы леткалары саны;

a – он реттік сұйылту дәрежесі;

n – табақшада өсіп шыққан колониялар саны (барлық табақшадан орташа арифметикалық саны алынады);

C – зерттелетін топырақтың ылғалдылығы (%).

3. Титрациялық (ашыту) әдісімен ІТТБ анықтау

Коли-титр – ІТТБ табылатын топырақтың ең аз саны (г). Коли-индекс – зерттелетін 1 г топырақтағы ІТТБ саны. Бұл көрсеткіштерді екі этаптан тұратын *ашыту (титрациялық) әдісімен* немесе мембраналық фильтрлер әдісімен анықталады.

Фекальді ластанудың орташа дәрежесі болжанған топыраққа санитарлық – микробиологиялық сараптау жүргізу үшін ІТТБ анықтауды *титрациялық (ашыту) әдісін* қолдану мақұлданған. *Ашыту әдісі* зерттелетін топырақтың арнайы сұйылтуларын егу мен бактерияларды Эндо қатты ортаға қайталап егілетіндей жинақтаушы ортада 37°C-та өсіруге негізделген. Коли-титрді анықтау үшін топырақ суспензиясының әртүрлі сұйылтуларын дайындайды (10⁻³ и 10⁻⁶). 5 мл Кесслер ортасы мен түбінде қалтқысы бар пробиркаларға 1 мл-ден егіп, 37°C температурада 24-48 сағат бойы инкубациялайды. Флакондар мен пробиркалардағы орта лайланбай және қышқыл мен газ түзілмесе, нәтижені теріс деп, зерттеуді аяқтайды.

Лайланған және ұйшыл мен газ түзілген пробиркалар мен

флакондардың әрқайсысынан, алып 3-4 секторға бөлінген Эндо ортасының үстіне тұзақпен егу жүргізеді. Егілетін материалдарды изоляцияланған колониялар алу есебімен таңдау қажет. Табақшаларды 37°C температурада 16-18 сағат бойы инкубациялайды.

Өсу болмай, ішек таяқшалары тобының бактерияларына тән емес сипаттамалар болса, нәтижені теріс деп есептейді.

Эндо ортада өсіп шыққан қызыл, қызғылт, ашық қызғылт, метал жылтыры болатын не болмайтын колониялардан (лактоза оң колониялардан) жұғынды дайындайды. Грам бойынша бояп, топырақта болатын оксидаза оң бактериялар мен *Pseudomonadaceae* тұқымдасының грамтеріс бактерияларынан ІТТБ дифференциациялауға мүмкіндік беретіноксидазалық тесті жүргізеді. Осы мақсатта қоректік орта бетінен шыны таяқшамен 2 -3 изоляцияланған колонияларды іліп алып, диметил- п-фенилендиаминмен шайылған фильтр қағазына штрих арқылы жағып шығады. Теріс оксидазалық тестте қағаз түсі өзгеріссіз қалады, ал оң болатын болса, қағаз 1 минут ішінде көк түске боялады. .

Жұғындыларда грамтеріс таяқшалар мен оксидазалық тестің теріс болуы, ІТТБ болатындығын жылдам көрсететін оң жауап алуға мүмкіндік береді. Сараптаманың нәтижесін коли-титрмен көрсетеді.

Аз ластанған топырақтарды жылдам сараптау әдістері ретінде мембраналық фильтр әдісін қолдану ұсынылады. Ластанған топырақтарды сараптау кезінде Эндо ортасына 0,1-0,5 мл топырақ суспензиясын тікелей беттік егу жүргізуге болады (10^{-2} дейін сұйырту дайындайды).

Жоғары дәрежелі фекальді ластанған үлгілерді сараптауда Эндо ортасына 0,1-0,5 мл мөлшерде топырақ суспензияларын тікелей беттік егу жасалады.

2 зертханалық жұмыс. ТИМАЦ жүйесімен энтеробактериялар дифференциациясы

Ішек таяқшалары тобының бактерияларын дифференциациялау үшін Эндо ортасы қолданылады. Эндо ортасы энтеробактериялар үшін селективті орта болып табылады және құрғақ күйде шығарылады. Оның құрамына НПА, лактоза, негізгі фуксин және натрий фосфаты мен сульфаты кіреді.

Эндо ортадағы *Enterobacteriaceae* тұқымдастарының өкілдері әдетте ісінген, жиектері тегіс (дөңгелектің), кейде шырышты болады. Олар метал жылтыры болатын не болмайтын, қызыл түске боялған (лактозаоң энтеробактериялар), түссіз (лактозотеріс) болуы мүмкін және анық не анық емес көрінетін орталығы қара түсті, қызғылт немесе сұр түске ие болуы мүмкін. Әсіресе едәуір ірі колонияларда.

Колониялар диаметрі мен түсі туыстық белгілерімен ғана емес, сонымен бірге өсудің салмағына да байланысты ауытқып отыруы мүмкін. Орта есеппен колониялар диаметрі 1 - 2 мм болады, ұсақ түссіз тамшы-колониялар 1 тәулікте өскен иерсинияларға тән (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*).

P. vulgaris пен *P. mirabilis* әдетте вуаль тәрізді өседі ("роение"), ал

Klebsiella мен *Enterobacter* туысының өкілдері көбінесе сулы шырышты қызғыш диаметрі 2 - 3 мм колониялар түзеді. Шигеллалар, сальмонеллалар, гафниялар, протейалар туысының қазбаламайтын өкілдері әдетте көлемі үлкен болмайтын, едәуір «нәзік» колониялар түзеді. Серрация штамдарының бір бөлігі фуксин түстес, қызғыш қызыл пигменттелген колониялар береді.

Болашақта зерттеуге алынған колонияларды бактериологиялық тұзақпен (немесе инемен) іліп алып, қиғаш агарға штрих әдісімен егеді және алғашқы идентификация үшін укол әдісімен комбинирленген тік агарға егеді. Мынадай орталарға қайта егеді: Олькеницкий ортасы, Симмонс цитратты агары мен ацетатты агарға. Екпелерді 37°C температурада термостатта ұстайды. 18 – 20 сағат инкубациядан кейін 21 кестедегі мәліметтерді пайдалана отырып, бөліп алынған дақылдардың мүмкін болатын туыстық белгілері бойынша қорытынды жасайды және ТИМАЦ жүйесі бойынша туыспен түрді идентификациялауға арналған тестке қажет жиынтықты анықтайды.

21 кесте.

Диагностикалық орталарда энтеробактериялардың алдын – ала дифференциациялау

Род	Олькеницкий ортасы				Симмонстың Цитратты агары	Ацетатты агар
	глюкоза	лактоза	мочевина	H ₂ S		
<i>Escherichia</i>	+	+/-	-	-	-	+
<i>Shigella</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	+	+/-	+/-	-	+	-
<i>Enterobacter</i>	+	+/-	+	-	+	-
<i>Salmonella</i>	+	-	-	+	+	-
<i>Proteus</i>	-	-	+/-	+	+	-
<i>Klebsiella</i>	+	+/-	+/-	-	+	-

Ескерту: + глюкозадағы қышқыл мен газ түзілуі, лактозада өсіп шығуы, мочевиінада өсіп шығуы, күкіртсутектің түзілуі, натрий цитратында өсіп шығуы, ацетатты агарда өсіп шығуы; + - ауытқымалы белгі; - белгі көрінбеген.

Глюкозаның ферментациясы – барлық энтеробактериялардың облигаттық қасиеттері тік ортаның боялуымен байқалады (бояулары ортада қолданылған индикаторларға және қышқыл түзу қарқындылығына тәуелді). Қышқыл түзумен қатар, комбинирленген тік ортада ажыраудың (қоректік ортаның пробирка қабырғасынан немесе түбінен ажырауы) пайда болуы глюкозаны ферментациялауда газ тәрізді өнімдердің түзілуін көрсетеді. (газ түзілу көптеген эшерихиялар, эдвардсиелл, цитробактерлер, триба клебсиелдер, протейалардың бөлек түрлері).

Лактозаны ферментациялау қабілетін (ал үшқантты ортада сахарозаны)

комбинирленген ортаның қиғаш бөлігінің бояуының өзгеруіне қарай анықтайды. оценивают по изменению окраски скошенной части комбинированной среды. Әдетте *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* туыстары өкілдері лактозо оң болады. Нақты болмаған жағдайларда осы қасиеттерін сәйкесінше көмірсулары болатын Гисс ортасына дақылдарды егу әдісі арқылы анықтауға болады.

Ортада мочеви́на болса, мочеви́наны (Олькеницкий ортасы мен оның модификациялары) гидролиздейтін энтеробактериялар (көптеген *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, вида *E. cloacae*, кроме *P. inconstans*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, иногда *S. Marcescens* тусының өкілдері) өсіп шыққан жағдайда тік орта түсі өзгермейді. Бұл жағдайда глюкоза ферментациясының қышқыл өнімдері мочеви́на гидролизінің сілтілі өнімдерімен бейтараптанады.

Тік ортаның ортаңғы немесе төменгі бөлігіндегі ортаның қараюы бөліп алынған микробтардың күкіртсутекті түзуіне байланысты.

Симмонстың цитратты агарда (бұл кезде ортаның түсі жасылдан көкке өзгереді) және ацетатты агарда (ацетатты сіңіріп, қышқыл бөлінсе орта жасылдан көкке ауысады) өсу қабілеттері қосымша тесттер болып табылады.

Биохимиялық реакциялардың ұқсастықтарының үйлесімділігі (глюкоза, лактоза, мочеви́наға қатысы мен күкіртсутектің түзілуі) бір уақытта *Enterobacteriaceae* тұқымдасының бірнеше туыстық топтарында байқалуы мүмкін және олардың дифференциациясы үшін туысы мен түрін анықтауға қажет қосымша тесттерді қолдану қажет. *Enterobacteriaceae* тұқымдасындағы туыстарын анықтауға арналған дифференциалды тесттердің минималды жиынтығының құрамы бойынша ұсыныстар аз емес. Олардың ішіндегі белгілер жиынтығының негізгілері ТИМАЦ жүйесі (ТИМАЦ):

Т – температуралық тест;

И – индолтүзілу тесті;

М – метилен қызылымен реакция метиленовым красным;

А – ацетилметилкарбинолмен реакция (Фогес–Проскауэра реакциясы);

Ц – цитратты тест;

Л – лактоза ферментациясы (22 кесте).

Температуралық тест (Эйкман тесті) – 44 – 46°C (чаще 44,5 °C) температурада газ түзе отырып глюкоза мен басқа көмірсуларды ферментациялау қабілеті. Эшерихиялар үшін температуралық тест оң мәнге ие, ал *Citrobacter* және *Enterobacter* туысының өкілдерінде мұндай қабілеттер болмайды. Бұл тестті арнайы Эйкмана, Кесслер, Булижа орталарында анықтайды.

Таблица 22.

ТИМАЦ жүйесі бойынша энтеробактериялар дифференциациясы

Туыс	Т	И	М	А	Ц
<i>Escherichia</i>	+	+	+	-	-
<i>Shigella</i>	-	-	-	-	-

<i>Citrobacter</i>	-	-	+	-	+
<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	+
<i>Salmonella</i>	-	+	-	+	+
<i>Proteus</i>	-	+	-	+	+
<i>Klebsiella</i>	-	+	-	-	+
Ескерту: + өскен, - өспеген					

Лактозаны ыдырату қаюілетіне қарай ІТТБ бөледі:

- Лактозо теріс (колиформды)
- Лактозо оң ішек таяқшалары (ЛІТ – лактозаны 37°С температурада ыдыратады;
- ЛІТ тобынанан фекальді ішек таяқшаларын (ФІТ) бөледі, олар лактозаны 44,5°С температурада ферментациялайды. Оларға цитратты ортада өспейтін, *E.coli* жатады.

Индол түзу тесті – бірқатар өнімдерді, сонымен қоса, құрамында парадиметиламидобензальдегид болатын реактивтермен байланысқанда ортаны қызыл түске бояйтын индолды бөле отырып көптеген белоктардың құрамына кіретін триптофан аминқышқылын ыдырату қабілеті. Индолды эшерихиялар өндіреді, ал *Citrobacter* және *Enterobacter* туысының бактериялары индол түзбейді. Индолдың болуын Эрлих реактиві көмегімен ескі сорпалы дақылдарда анықтайды (жақсысы құрамында 200-300 мг % триптофан болатын Хоттингер сорпасынан).

Метилен қызылымен реакция (Кларка реакциясы) Қоректік ортадағы глюкоза ферментациясы кезіндегі қышқыл түзілу қарқындығын анықтауға негізделген. Кларк ортасында өсірілген 3-5 тәуліктік дақылға бірнеше тамшы тамызатын метилен көгін индикатор ретінде қоданады. рН 5 және одан да төмен болғанда индикатор ашық сары түсін қызыл түске өзгертеді. Бұл қарқынды қышқыл түзілуінің белгісі болып табылады. *Escherichia* мен *Citrobacter* туысының өкілдері ортаны қызыл түске бояйды, ал *Enterobacter* – сары түске бояйды. рН 5-тен жоғары болса орта ашық сары болып қала береді.

Цитратты тест (Симмонс ағары) – цитратты қышқыл түзе отырып ыдырату қабілеті. рН 5 және одан төмен болса, индикатор ашық жасыл түсін көкке өзгертеді. Бұл қышқылдың қарқынды бөлінуінің айғағы. *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia* және *Shigella* туысының өкілдерінің өсуі кезінде орта түсінің өзгеруі байқалады, ал *Escherichia* мен *Shigella* – орта түсін өзгертпейді.

3 зертханалық жұмыс. Ауаның жай-күйін санитарлық-бактериологиялық бағалау

Атмосфералық ауа мен жабық бөлмедегі ауа микроорганизмдердің сапалық және сандық құрамы бойынша айтарлықтай ерекшеленеді. Бөлмедегі бактериялар жиынтығыны (бактериальная обсемененность)

атмосфералық ауа тығыздығына қарағанда жоғары, сонымен қатар ауаға науқас адамдар мен жануарлардан келіп түсетін (сөйлескенде, жөтелгенде аэрозоль құрамындағы ауа тамшылары жолымен, тері мен түктері бетінің эпителиінің түлеуінде, төсек жабдықтарының ластануы мен топырақтың зақымдалуы кезінде) патогенді түрлері бойынша.

Ауа микрофлорасы көптеген құрғау, күн жарығының ультракүлгін сәулесі, температураның ауытқуы сияқты басқа да қоршаған ортаның жағымсыз факторларына жоғары төзімділігімен ерекшеленетін топырақ микроорганизмдері негізінде құралады. Әдетте ауадан *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* var: *mycoides*, *B. Mesentericus* туыстарының өкілдерін, *Actinotnyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* әр түрлерін бөліп алады.

Ауыз қуысы мен мұрын қуысының шартты – патогенді микроорганизмдері (жасыл және гемолитикалық стрептококктар, гемолитикалық стафилакокктар) ауа үшін санитарлық көрсеткіштер болып табылады.

Ауа микрофлорасын зерттеу үшін түрлі әдістерді қолданады.

Седиментациялық әдіс (Кох әдісі, 1881 ж.) – беті ашық Петри табақшасындағы қоректік орта бетіне ауырлық күшінің әсерімен бактериалды бөлшектер мен тамшылардың шөгуіне негізделген әдіс. Әдетте Омелянский бойынша есептейді: 100 см² қатты ортаға 5 минут ішінде 10 л ауада болатын бактериялар саны шөгеді. Дегенмен, кейінірек бұл көрсеткіштер 3 есеге дейін төмендеген. Қозғалыс жылдамдығының үлкен ауытқулары орын алатын атмосфералық ауа үшін аталған әдіс нақты емес және мүлдем жарамсыз саналады. Әдіс тек қана электр энергиясы мен едәуір жетілген құралдар борлмаған жағдайда ғана қолданылуы мүмкін.

Фильтрациялық әдіс (ауа сұйықтық арқылы үрленеді) – кейін түрлі орталарға егу үшін қолдауы мүмкін болатын бактерияларды сұйықтық ішінен ұстап алуға негізделген, Дьяконов құралы. Микробтық аэрозольді бумен немесе сұйықтықты себу арқылы шөктіретін әдіс – Речменский құралы. Ауа ағындарының арнайы құралдарды қолдану арқылы күшпен соғылу принципіне негізделген әдіс – Кротов құралы. Ауа ағыны сына тәрізді тар саңлау арқылы келіп, жоғары жылдамдықпен дымқыл қоректік орта бетіне соғылады. Соғылу нәтижесінде ауада болатын аэрозольдер, сонымен қатар, құрамында бактериялар бар шаң бөлшектері мен тамшылар ЕПА немесе элективті қоректік орталардың бетіне келіп соғылады. Мұндай құралдың өнімділігі 20-дан 40 л/мин құрайды. Мұндай әдістер айтарлықтай сенімді әрі нақты келеді.

Ауа микрофлорасын седиментациялық әдіспен зерттеу. Қоректік ортасы бар (ЕПА) Петри табақшаларын ашық күйде еденнен әр түрлі деңгейде орналастырады. Ауаның санитарлық жай-күйін анықтау кезінде табақшаларды отырған немесе тұрған адамның тыныс алу дәрежесіне сәйкес келетін түрлі биіктіктерде орналастырады. Қоректік ортасы бар табақшаларды ауаның болжанған ластануына қарай 10-20 минут сайын орналастырып отыру қажет. Кейін олардың бетін жауып, 25°С-та 48 сағат бойы инкубациялайды, бұл өсуі үшін едәуір төмен температураларды қажет

ететін бактериялар мен зең саңырауқұлақтарының өсуін ынталандырады. Екі табақшадағы өскен колониялардың жалпы санын есептейді, 250 колониядан аз болса, ауа таза болып есептеледі, 250-500 колония – орташа ластану дәрежесін көрсетеді, колониялар саны 500-ден жоғары болса ластанған болып есептеледі.

Омелянский ережесіне сәйкес 100 см^2 ауданға 5 минут ішінде 10 л ауада болатын микроорганизмдер шөгеді (1 м^3 1000 л-ге тең). Микробтық санды мына формуламен анықтайды:

$$X = a \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5 / v \cdot 100 \cdot t,$$

мұндағы, X – 1 м^3 ауадағы микроорганизмдер саны; a – табақшадағы колониялар саны; v – табақша ауданы; t – табақша беті ашық тұрған уақыт; 5 Омелянский есебі бойынша уақыт; 10 – 5 минут ішінде микроорганизмдер шөгетін ауа көлемі (литрмен); 100 – шөгетін аудан (сантиметр квадратпен); 1000 – зерттелетін ауа көлемі (литрмен).

Ауа микрофлорасын аспирациялық әдіспен зерттеу. Ауаны егу үшін ЕПА ортасы бар Петри табақшаларын Кротов аппаратына орналастырып, ток көзіне қосады (ауаның жұтылу жылдамдығы 10 минутта – 25 л/мин). Микроорганизмдер агар бетіне шөгеді. Табақшаларды шығарып, тәулік бойы 37°C -та инкубациялайды. Кейін өсу нәтижесін есептейді. Ауаның бактериалдық ластануы 1 м^3 көлемдегі микробтардың жалпы санымен көрсетіледі. Микробтық санды келесі формуламен санайды:

$X = a \cdot 1000 / V$, мұндағы, a – табақшадағы ЕПА ортасына өсіп шыққан микробтық колониялар саны; V – құрал арқылы өткізілген ауа көлемі, л; 1000 – зерттелетін ауа көлемі, л. Ауаның тазалығын 23 кесте бойынша бағалайды.

23 кесте

Ауа тазалығы ережелері

Бөлмедегі ауа	1 м^3 -де рұқсат етілген көрсеткіштер	
	микробтық сан	стрептококктар
жазда	1500 дейін	16 дейін
қыста	4500 дейін	36 дейін

Есептеу үлгісі. Мәселен, 10 минут ішінде 250 л ауа өткізгенде, орта бетінде 50 колония өсіп шықты. 1 м^3 ауадағы микроб саны = $(50 \cdot 1000) : 250 = 200$.

4 зертханалық жұмыс. Ауаның санитарлық-көрсеткіштік микроорганизмдері ретінде стафилококктардың сипаттамасы мен санын анықтау

Жабық бөлмедегі ауаның жай-күйін анықтағанда, тәжірибенің мақсатына сай жалпы микробтық саныды, адамның мұрын қуысының микрофлорасымен контаминациялану көрсеткіші болып табылатын санитарлық-көрсеткіштік микроорганизмдерді (стафилококктар, α - және β -гемолитикалық стрептококктар) анықтайды.,

Әдетте емдік және балалар мекемелерінің гигиеналық жағдайын, ауасын тексеру барысында патогенді стафилакокктарды санитарлық-көрсеткіштік микроорганизмдер ретінде пайдаланады. Ал тағам өнімдері үшін бұл көрсеткіштер басқа мағынаға ие. Себебі, стафилакокктардың патогенділігі емес, энтеротоксигенділігі, яғни тағамдық интоксикацияны туғызатын энтеротоксин юелу қабілеті аландаушылық туғызады.

Микробиологиялық өндірісте өндіруші микроорганизмдердің болуын анықтайды (гидролизді-ашытқылы зауыттарды *Candida*, ферменттік зауыттарды *Aspergillus* және споралы бактерияларды; өсімдіктерді зиянкестерден қорғаушы бактериалдық заттар өнеркәсібінде *Bacillus thuringiensis* және сальмонеллалар; т.б.).

Седиментациялық әдіспен алынған ауа микрофлорасы бар табақшаларды стафилакокктарға зерттейді. Элективті-дифференциалдық коректік орталарға егетін, стафилакокктардың таза дақылын алады.

Стафилакокктарды анықтау әдісі ас тұзының жоғары құрамы болатын ортада өсу қабілеттілігіне негізделген. Токсигенді стафилакокктардың дақылын бөліп алу мен оларды сапрофиттерден дифференциациялау мақсатында көбінесе сарыуызды-тұзды агар (СТА) мен сүтті-тұзды агар (СТА) сияқты элективті-дифференциалдық коректік орталарды қолданады.

Сарыуызды-тұзды агарды тұзды агар негізінде дайындайды. Оны дайындау үшін ет-пептонды сорпаға (рН 7,2 - 7,4), 2% агар және 6,5% хлорлы натрий қосып, су моншасында ерітіледі. Еріген соң алып, сүзеді. 100 см³ немесе 250 см³ көлемде құйып алып 121°C-та 30 минут бойы залалсыздандырады.

Ет-пептонды сорпаның орнына құрғақ коректік агарға 6,5 % NaCl өосып пайдалануға болады..

Зерттеу алдында тұзды агарға сарыуыз қоспасын қосады. Ол үшін 100 мл залалсыздандырылған ерітіліп, 45°C дейін суытылған тұзды агарға 20 мл жұмыртқа сарыуызының эмульсиясын қосады. Әбден араласқан СТА-ны залалсыздандырылған Петри табақшаларына 20 - 25 см³ құйып 4 - 6°C температурада 7 тәулік бойы сақтайды.

Жұмыртқа сарыуызының эмульсиясын дайындау үшін залалсыздандырылған Петри табақшасының түбіне алдын-ала этил спиртіне батырылған мақтамен мұқият сүртілген тауық жұмыртқасын орналастырады. Залалсыздандырылған пинцетпен екі қарама-қарсы жағынан тесік жасайды. Осы екі тесіктің біреуінен ақуызын толығымен алып тастайды да, сосын тесікті үлкейтіп сарыуызын залалсыздандырылған 200 мл колбаға бөліп алады. Саруызға ақырындап 180-200 мл залалсыздандырылған 0,8%-дық хлорлы натридi 20-30мл-ден бөлшектеп құйып отырып, гомогенді масса алғанша мұқият араластырады.

Осы ортада патогенді стафилококктар өсіп шыққан кезде олардың колонияларының бойында ортаның лайлану зоналары пайда болады яғни олар *лецитиназаға* оң реакция көрсетеді. Егер СТА-да өсіп шыққан стафилококктар лецитиназалық реакция көрсетпесе, оларды қиғаш ет-пептонды агарға егеді. Кейін *плазмокоагуляция* реакциясында

дифференциациялайды.

Сүтті-тұзды агарды да тұзды агар негізінде дайындайды. 100 мл залалсыздандырылған ерітіліп, 45°C дейін суытылған тұзды агарға 10 мл залалсыздандырылған майы алынған жылы сүтті құямыз. Ортаны мұқият араластырып, табақшаларға құяды.

СТА-дағы стафилококктар колониясының пішіні диаметрі 2-4 мм диск тәрізді, тегіс жиекті болады, сары, ақ, лимон түстес пигменттелуі мүмкін. Аз дегенде 5 сипатты колонияны қиғаш ет-пептонды агарға егіп, кейін осы дақылдармен *плазмокоагуляция* реакциясын жүргізеді (патогенді және сапрофитті стафилококктардың дифференциациясы үшін).

Плазмокоагуляция реакциясы. 0,5 мл залалсыздандырылған қан сарысуы бар пробиркаға агарлық немесе 0,1 мл сорпалық 18-24 сағаттық дақылдан зерттелетін микроорганизді бактериологиялық тұзақпен енгізеді. 37°C-та инкубациялап, нәтижесін 30 минут, 2, 4 және 24 сағаттан кейін анықтап отырады.

Оң нәтиже – тығыз немесе борпылдақ ұйынды түзіледі; егер сұйылтылған сарысуды қолданса, ұйынды сұйық бетінде қалқып жүреді.

Сарысуды дайындау. 1:2 – 1:4 болатындай етіп физиологиялық ерітіндімен сұйылтылған немесе толық қоян сарысуын қолданады. Қоянның жүрегінен пункция әдісімен алған қанды (10 мл жуық) 1мл 5% залалсыздандырылған лимонқышқылды ерітінді бар пробиркаға құйып алып, мұқият араластырып, центрифугалайды. Сарысуды (тұнба үстіне бөлініп шыққан сұйықтық) залалсыздандырылған пробиркаларға құйып алып, 4-5 тәулік тоңазытқышта сақтайды.

Стафилококктардың дифференциациясы үшін, сонымен қатар, маннит-тұзды агарды да қолдануға болады. Онда *S. aureus* сары колониялар, *S.saprophyticus* – қызғылт (маннитті ашытпайды), *S. epidermidis* – ақ түсті (маннитті ашытады) колониялар өсіп шығады.

24 кесте

Ауадан бөліп алынған стафилококктардың түрлік белгілерін анықтау

Колония №	Лецитиназаға реакция	Сүтті-тұзды агарда өсіп шыққандар	Плазмокоагуляцияға реакция	Түрі
1				
2				

Құрал – жабдықтар: Залалсыздандырылған Петри табақшалары, пробиркалар, тамшуырлар, 100-500 мл-лік флакондар немесе ыдыстар, термотөзімді шыны стаканчиктер, 150-250 мл флакондар, шыны таяшалар, пинцеттер, бактериологиялық тұзақ, фильтр қағазы, мақта, микроскоп, заттық шынылар мен жабындық шынылар, Эндо ортасы, Кесслер ортасы немесе КОДА, ЕПА, Олькеницкий ортасы, физиологиялық ерітінді, майсыз сүт, тауық жұмыртқасы, қоянның қан сарысуы, Грам бойынша бояу

реактивтері, дезинфекциялау ерітіндісі.

Зертханалық жұмыстың орындалу жоспары:

1 сабақ. Топырақтағы ІТТБ титрациялық әдіспен анықтау мақсатында тәжірибе қою.

2 сабақ. Лайлану мен газ түзілген Кесслер ортасы бар пробиркалардан Эндо ортасы бетіне егу жүргізу.

3 сабақ. Эндо ортасында өсіп шыққан колонияларға сараптама жасау. Теріс оксидазалық тест көрсететін және грамтеріс таяқшалар болатын колонияларды олардың түрлік белгісін анықтау мақсатында диагностикалық орталарға егіп шығу.

4 сабақ. Зерттелген микроорганизмдердің түрлік белгілерін анықтау мақсатында ТИМАЦ жүйесі бойынша олардың диагностикасын жасау.

5 сабақ. Седиментациялық әдіспен ЕПА қоректік ортасына ауадан екпе жасау.

6 сабақ. Омелянский формуласымен ауаның микробтық санын анықтау. Ауаның санитарлық-көрсеткіштік микроорганизмдері ретінде ЕПА ортасында өсіп шыққан стафилакокктардың санын анықтау және олардың дифференциациясы үшін диагностикалық орталарға (СТА мен СТА) қарапайым колонияларын егіп шығу.

7 сабақ. Алынған нәтижелерді кестеге енгізіп, стафилококктардың түріне анықтама беру. Есебін дайындау.

Бақылау сұрақтары

1. Топырақтың өзін-өзі тазарту үрдісінде микроорганизмдер рөлі қандай?
2. Топырақ үлгілерінің микробиологиялық сараптамасын қалай жүргізеді?
3. Топырақ үлгілерін алу ережелерін атап беріңіз.
4. топырақтағы ІТТБ қандай әдіспен анықтайды? Титрациялық (ашыту) әдіс деген не? Оны қалай жүргізеді?
5. Энтеробактериялар дифференциациясы қалай жүзеге асады?
6. Ауаны санитарлық-микробиологиялық бағалау.
- 7 Атмосфералық ауа мен жабық бөлме ауасын микробиологиялық зерттеу әдістері қандай?
8. Ауаның жай-күйін зерттеудегі санитарлық-көрсеткіштік микроорганизмдерге қандай микроорганизмдер жатады? Неліктен?
9. Ауадағы стафилококкты қалай анықтауға болады? Оларды қалай дифференциациялайды?

ҚОРЫТЫНДЫ

Қазіргі таңдағы физиология – организмдердің қоректенуі, тыныс алу, өсіп, дамуы және олардың қоршаған ортамен байланысы жайындағы ғылым.

Физиологиясын меңгеріп білу микроорганизмдердің тіршілігін басқаруға, бірлесіп тіршілік ету барысындағы түрлі микроорганизмдердің өз арасындағы және басқа организмдермен де байланысын бықылауға мүмкіндік туғызады. Физиология негздерін білу түрлі өнімдерді өңдеу, сақтау кезіндегі микробиологиялық үрдістерді жүргізе алуға, оларды өндірісте және ауылшаруашылығындағы тәжірибелік мақсаттарда тиімді пайдалануға, сондай-ақ қажет болғанда олармен күресу құралдарын жасауға мүмкіндік береді.

Микроорганизмдер морфологиялық тұрғыда үлкен ерекшеліктерге ие болмағанмен, физиологиялық тұрғыда алуантүрлі. Әсіресе зат алмасу үрдісінің негізін қалайтын, қоршаған орта мен тірі организмдер арасындағы үздіксіз байланыс құраушысы болып табылатын қоректену, тыныс алу үрдістерінде айтарлықтай ерекшеліктер болады. Беріліп отырған пән студенттерде микроорганизмдердегі метаболизм мен оның реттелуі туралы және тәжірибе жүзінде микроорганизмдердің қызметінің негізгі физиологиялық заңдылықтарын пайдаланудағы жинақталған білім жүйесін қалыптастыруға көмекші құрал ретінде ұсынылып отыр.

ЭДЕБИЕТТЕР

1. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. М.: Издательский центр «Академия», 2012. – 384 с.
2. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
3. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – Изд-во МГУ, 1991. – С. 131 – 132.
4. Лысак А.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификация почвенных бактерий. – М.: Макс-Пресс, 2003. – 120 с.
5. Бабьева И.П. Биология почв / И.П. Бабьева, Г.М. Зенова. – М.: МГУ, 1989. – 336 с.
6. Бабьева И.П., Горин С.Е. Почвенные дрожжи. – М.: изд-во МГУ, 1987. – 80 с.
7. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов / Ответственный редактор Н.А. Красильников. – М.: МГУ. – 1996. – 162 с.
8. Градова Н.Б., Бабусенко Е.С., Горнова И.Б., Гусарова Н.А. Лабораторный практикум по общей микробиологии; М.: ДеЛи принт, 2001
9. Доркина Е.Г. Физиология микроорганизмов. Методические указания для самостоятельной внеаудиторной работы студентов. Выпуск 2, 2008. С. 261.
10. Елинов Н.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – М.: Медицина, 1998. С. 136
11. Сакович Г.С., Безматерных М.А. Физиология и количественный учет микроорганизмов: Методические указания. – Екатеринбург: ГОУ ВПО УГТУ-УПИ, 2005. – 80 с.
12. Мусина Л.Т. Физиология бактерий в 2-х частях. Казань. 2001. Казань: КГМУ, 2001, 50 с.
13. Сартакова О.Ю. Основы микробиологии и биотехнологии в 2-х частях. Барнаул, 2005. 40 с.
14. Лысак В.В., Желдакова Р.А. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям, контроль самостоятельной работы студентов. – Мн.: БГУ, 2002. – 97 с.
15. Лысак В.В. Микробиология. – Минск: БГУ, 2008. – 427 с.
16. Корнеева О.С., Попова И.В., Черняева Л.А. Методические указания к лабораторным работам по микробиологии, физиологии питания, санитарии и гигиене. Воронеж, 2009. с.209

17. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. 2005. 367 с.

18. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология, 4-е издание, 2003. 464 с.

19. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. 2008. 780с.