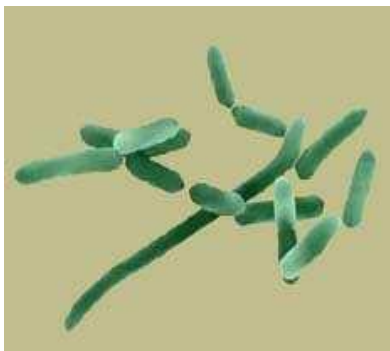


**ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ BIOTEХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
БИOTEХНОЛОГИЯ КАФЕДРАСЫ**



**«Микроорганизмдерді бөліп алу және өсіру» арнайы
практикумының зертханалық сабақтарына
арналған әдістемелік нұсқаулар**

Алматы, 2016

Құрастырған:

Биология ғылымдарының кандидаты, доцент Сыдықбекова Райхан Қонайқызы

«Микроорганизмдерді бөліп алу және өсіру» арнайы практикумының зертханалық сабақтарына арналған әдістемелік нұсқаулар

Биология және биотехнология факультетіндегі қазақ бөлімінің студенттеріне арналған

Әл-фараби атындағы қазақ ұлттық университеті
Биология және биотехнология факультеті
Биотехнология кафедрасы

Алматы, 2016 ж.

МИКРООРГАНИЗМДЕРДІ БӨЛІП АЛУ ЖӘНЕ ЗЕРТТЕУ ПРИНЦИПТЕРІ.

Зертханалық сабақ № 1 -2.

Қоршаған ортаның әртүрлі нысандарынан биотехнологияда маңызды микроорганизмдердің жинақтаушы және таза дақылдарын бөліп алу және зерттеу.

Зертханалық сабақтың *мақсаты* - микроорганизмдердің таза дақылдарын бөліп алу және зерттеу.

Зертханалық сабақтың міндеттері:

- микроорганизмдердің таза дақылдарын бөліп алу және зерттеу.
- микроорганизмдердің клетка санын санау әдістері (клеткаларды тікелей микроскоптан санау, мембраналық фильтрлерде санау, тығыз қоректік орталарда егу арқылы санау клеткалар мен биомасса мөлшерін нефелометриялық әдіспен санау)
- микроорганизмдердің культуралды-морфологиялық және физиология-биохимиялық қасиеттерін зерттеу
- микроорганизмдердің таза культураларының таксономиялық жағдайын анықтау

1. Микроорганизмдердің таза дақылдарын бөліп алу және зерттеу.

Табиғи жағдайда микроорганизмдердің таза культуралары сирек кездеседі. Соған қарамастан микроорганизмдердің түрлі қасиеттері жөніндегі көріністер олардың таза культураларын зерттеу арқылы алынған. Осыған байланысты, табиғи жағдайда әртүрлі микроорганизмдердің таза культураларын бөліп алудың маңызы зор. Микроорганизмдердің таза культуралары деп микроорганизмдердің популяцияларының бір клеткадан таралған ұрпақтарын айтады. Таза культураларды бөліп алу бірнеше кезеңдерден тұрады:

1. Жинақтаушы культура бөліп алу;
2. Таза культура бөліп алу;
3. Бөліп алынған культураның тазалығын тексеру.

Жинақтаушы культураларды алу әдістері. Микроорганизмдердің жинақтаушы культураларын арнайы элективті жағдай жасап бөліп алады. Жинақтаушы культура дегеніміз бір топтағы немесе бір түрлі микроорганизмдердің өкілдері басым болған ортада бөлініп алған культураларды жиынтығын айтады. Элективті жағдай дегеніміз микроорганизмнің белгілі бір тобы немесе бір түрі басым дамиды жағдайды айтады.

Элективті жағдайда көбінесе микроорганизмдердің метаболизм және физиологиялық ерекшеліктері есептелінеді: қорек көзіне байланысты сұранысы, аэрация, температура, эндоспора түзуіне және т.б. көбінесе элективті жағдай тиісті қоректік орта ортаны таңдау жолымен жасалынады.



Сурет 1 - Микроорганизмдердің таза культураларын бөліп алудың сызба нұсқасы

Топырақтан өсімдіктермен селбесіп тірішілік ететін азотфиксациялаушы бактериялардың жинақтаушы культураларын бөліп алу.

Бұршақ тұқымдас өсімдіктердің тамырындағы түйнектері азотфиксациялаушы бактериялардың табиғи жинақтаушы культураларын алуға болады. Бұршақ тұқымдас өсімдіктердің түйнектері бар тамырларын жуып, түйнегі бар тамырдың бөлігін жеке бөліп алады. Беттік залалсыздандырудан соң тамырды суға салып, бір Петри табақшасына пинцетпен басып езеді, 1-2 тұзақ дайын болған сұйықтықты келесі табақшаға салады.. осылай бірнеше рет сұйылту жасайды. Әр сұйылтуға ерітіп, салқындатылған манниті бар агар қосылады. Табақшалар қатқан соң қалыпты температурада инкубирлейді.

Целлюлоза ыдыратушы микроорганизмдерді биотехнологияда қолдану.

Целлюлоза – жоғарғы сатыдағы өсімдіктер мен балдырлардың клетка қабықшасының құрамына кіретін полисахарид. Ол барлық табиғи қосылыстардың түзілуінің негізгі көзі болып табылады.

Құрамында целлюлоза бар заттар көбінесе ағаштарда, қағаз өндірісінде түрлі ауылшаруашылық салады астық дайынауда көптеп қалып отырады.

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

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

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

Жеміс-жидектер, көкөністерден өнім алуда микробтық закваскалар жасаудың маңызы зор. Солардың бірі өсімдіктердің өсетін жеріне компост салу. Оны күз кезінде арнайы бір яма қазып, сол жерге құнарлы қара шірік (дерновой) салынады. Қара шіріктің құрамында органикалық заттарды ыдырататын целлюлоза ыдыратушы микроорганизмдер көптеп кездеседі. Осыған, жапырақ, шымтезек, көкөністердің қалдықтарын салады. Осылай көктемге дейін қалдырады. Сол кезде органикалық заттарға бай компост даяр болады. Оны кәдімгі бақшаға немесе өсімдік өсіретін жерге салады.

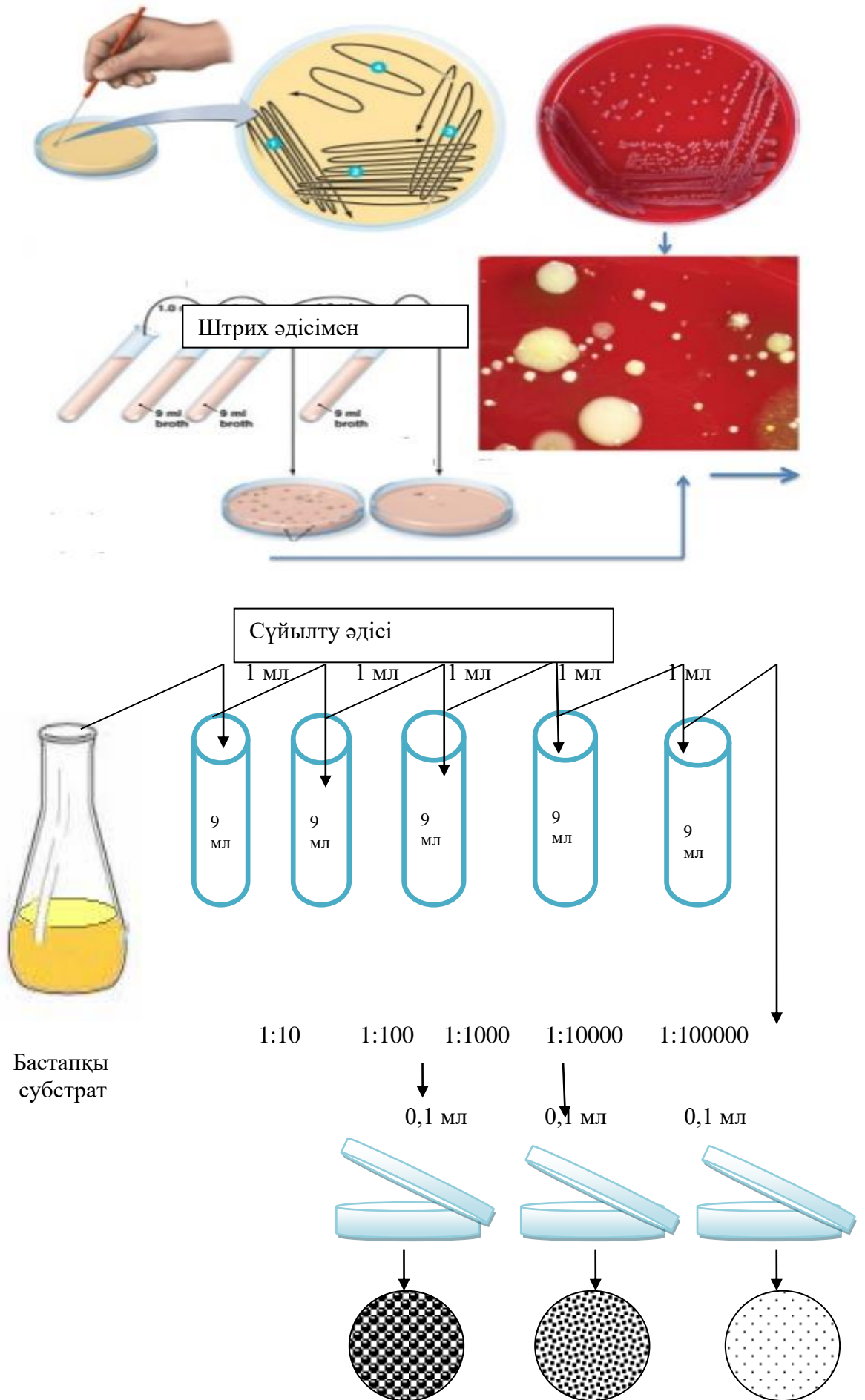
Ауадан микроорганизмдердің таза культураларын бөліп алу.

ЕПА және Сабуро ортасы құйылған петри табақшаларын қақпағын ашып 5-10 минут уақытқа оқу ғимаратында (студенттер отырған аудиторияға, оқу ғимаратының үшәне және асханаға) әр түрлі орындарға қойылады. Содан кейін әртүрлі қоректік орталарға ауа микрофлорасы отырғызылғаннан кейін, 28-37 °С 2-3 тәулік мерзімге термостатқа қалдырылады. Өсіп шыққан микроорганизмдердің өсіп шыққан колониясын санайды және сипаттау жүргізіледі.

Микроорганизмдердің таза культураларын бөліп алу әдістері.

Микроорганизмдердің таза культураларын бөліп алуға бірнеше тәсілдер бар. Солардың ішінде бактериялардың таза культураларын бөліп алу үшін жеке клеткаларды тығыз қоректік орталарға егу арқылы немесе сұйылту әдісін қолдану арқылы бөліп алады.

Бірақ та жеке колония барлық уақытта культураның тазалығын көрсете бермейді. Себебі, колониялар жеке клеткалардың жинақталуы мүмкін. Егерде культура шырыш түзетін болса қосымша басқа клеткаларда жабысып жүруі мүмкін. Сондықтанда, культуралардың тазалығын селективті емес ЕПА ортасын қолданады.



Сурет 2 - Он еселік сұйылту әдісінің сызба нұсқасы (Кох әдісі)

Зертханалық сабақ № 3-4.

Биотехнологияда маңызды қасиеттері бар микроорганизмдердің таза дақылдарының таксономиялық жағдайларын анықтау үшін культуралдық-қасиеттерін зерттеу.

Микроорганизмдердің макроморфологиясын зерттеу. Колониялардың морфологиясы (макроморфология) – петри табақшасындағы қоректік орталарға өсірген кезде зерттейді.

Микроорганизмдер тығыз қоректік ортаның бетіне өсіп шыққан кезде колония түзіп, штрих (ирек сызық) бойымен немесе тегіс газон болып өсуі мүмкін. Колония деп – микроорганизмнің бір түрінің клеткалар жиынтығын айтады. Ол клетканың қоректік ортаға қалай өскеніне байланысты болады. Біреулері қоректік ортаның бетіне, келесілері ортаны бойлай өседі, ал кейбіреулері ортаның түбіне қарай өседі. Осыған байланысты колонияның беттік, тереңдік және түптік түрлері болады. Қоректік ортаның бетіне өскен колонияның бірнеше түрлі болып келеді (9-12 сурет). Оларды сипаттаған кезде келесі белгілеріне көңіл бөледі:

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

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

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

Колония профилі – жалпак, дөңес, кратер тәрізді, конус тәрізді және т.б.

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

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

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

Микроорганизмдердің клетка морфологиясы.

Бактериялар - бір клеткалы организмдер, пішіндері бойынша 3 негізгі топқа бөлінеді: *дөңгелек, таяқша тәрізді және иілген таяқшалар.*

Дөңгелек бактериялар немесе коктар орналасуына байланысты микрококстар, диплококстар, стрептококстар, тетракокстар, сарциналар және стафилококстар болып бөлінеді.

Таяқша тәрізді микроорганизмдер клеткалар мөлшері, олардың орналасуы және спора түзу қабілеттіліктері бойынша ажыратылады. Олар бөлек клеткалар немесе тізбек түрінде орналасуы мүмкін.

Спора түзетін таяқшалар **бациллалар** деп аталады. Иректелген бір клеткалы бактериялар клетканың формасы және ирек санына байланысты 3 топқа бөлінеді: *вибриондар, спириллалар, спирохеталар* (13 сурет).

Негізгі пішіндерімен қатар табиғатта микроорганизмдердің басқа да формалары кездеседі.

Клеткалардың пішінін «жаншылған тамшы» препаратымен, ал майда бактерия клеткаларының пішіндерін бекітілген боялған препараттарымен анықтайды.

Зерттелетін культураның тазалығын зерттеу.

Микроорганизмдердің тазалығы мұқият тексерілуі керек. Ол әдетте бірнеше әдістерді қолдану арқылы жүзеге асады: көзбен көру, микроскоптан бақылау және тығыз қоректік орталарға егу.

Микроорганизмдердің тазалығын міндетті түрде микроскоптан бақылау керек. Ол үшін клеткалардан бекітіліп боялған препарат дайындап, иммерсиялық жүйеде қарау керек немесе тірі клеткалардан жаншылған тамшы препаратын жасап, фазалы-контрастылы құралды пайдаланып қарау керек. Көпшілік микроорганизмдердің таза культуралары морфологиялық тұрғыда біркелкі болу керек. Бірақ кейбір бактериялардың, мысалы, микобактериялардың, нокардия және т.б. клеткалары өзгермелі болып келеді. Осыған байланысты бұндай культураларды микроскоптан қарағанда біраз қиындықтар туғызады. Сондықтанда ең

алдымен бөліп алған культураға қолайлы ортаға егеді. Өсіп шыққан колониялардың біркелкілігі зерттеліп отырған культураның тазалығын көрсетеді. Ол екі жолмен жүзеге асады.

Шпательмен жаймалап егу. Зерттеліп отырған бактерия культурасының клетка үлгісін микробиологиялық тұзақ арқылы алып тиісті орта құйылған Петри табақшаларының біреуіне салады. Содан кейін оны шпательмен жаймалайды, сосын сол шпателді бірден екінші табақшаға екінші, үшінші табақшаларға жайып егеді. Бұл әдістің негізінде клеткаларды сирету жатыр. Себебі микроорганизмді бір табақшадан екінші және үшінші табақшаға шпательмен бірінен кейін біріне екенде клетка сирейді. Өсіп шыққан колониялардың біркелкілігі клеткалардың тазалығын, көрсетеді.

Тұзақпен сиретіп егу. Бактерия клеткасын тұзақпен алып сызық бойымен сирете егу жүргізеді (23-сурет). Әрбір жаңа сызықты жүргізгенде, тұзақты оттың жалынында залалсыздандырады. Егу жүргізіп болған соң барлық Петри табақшаларын микроорганизмдердің өсу жылдамдығына сәйкес термостатқа 1-7 тәулік мерзімге қояды. Жеке колониялар өсіп шығуына кедергі келтіретін судың конденсаты пайда болмау үшін табақшаның қақпағын төмен қаратып қояды. Микроорганизмдердің тазалығын сызық бойы немесе өсіп шыққан жеке колониялардың біркелкілігінен анықтауға болады.



Сурет 23- Бактериялардың тығыз қоректік ортасында сызық (штрих) бойымен өсу сипаты.

Қажетті құралдар мен материалдар:

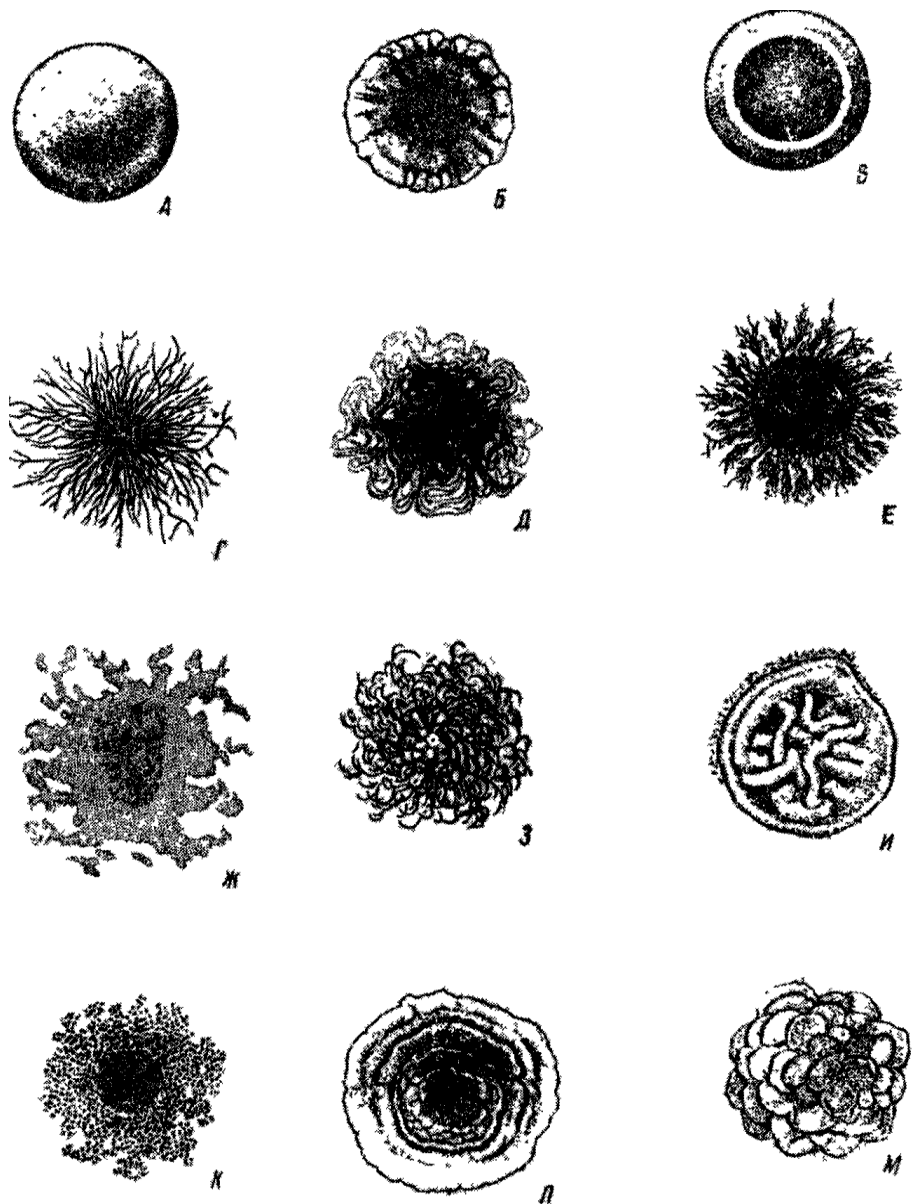
ЕПА ортасы құйылған табақшалар, Дригальский шпателі, залалсыздандырылған тұзақтар, заттық шыны, жабынды шыны, микробиологиялық тұзақ, қажетті бояулар.

Тапсырмалар:

1. Бөліп алған бактерия культураларының шпательмен жаймалап егу арқылы тазалығын анықтау.
2. Бөліп алған бактерия культураларының шпательмен тұзақпен сиретіп егу арқылы тазалығын анықтау.

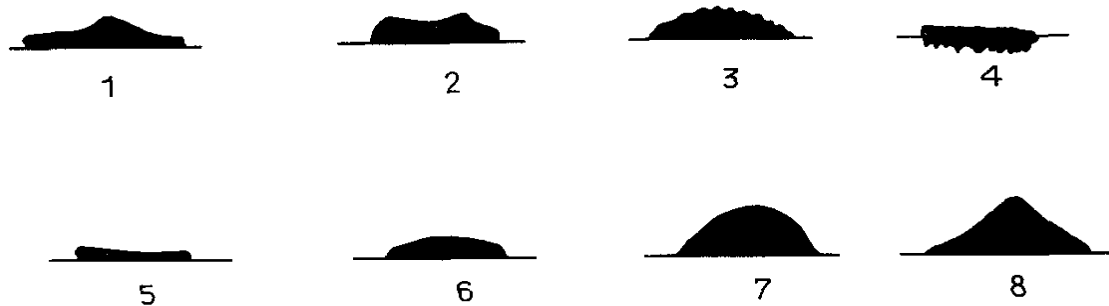
Бақылау сұрақтары:

1. Таза культураларды бөліп алу әдістері
2. Жеке колониялардан таза культуралардан бөліп алу. Тереңдік егу, он еселік сұйылту ідісін қалай жүзеге асырады?
3. Микроорганизмдердің культураларын бір клеткадан бөліп алу.
4. Бөліп алған культуралардың тазалығын тексеру



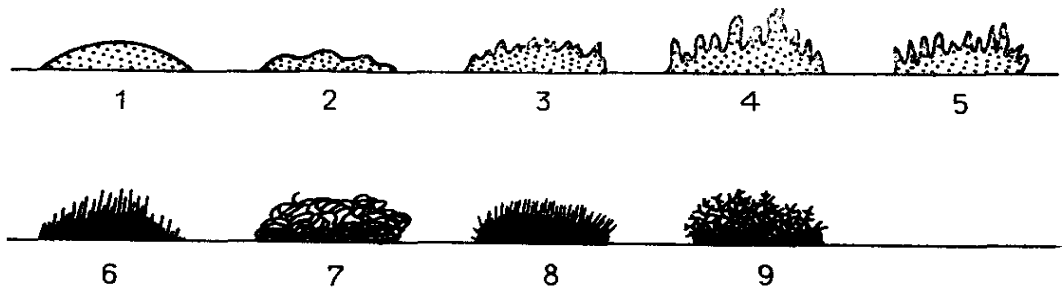
Ескерту: А – дөңгелек; Б – қатпарлы шеті бар дөңгелек; В – шетінде сақинасы бар дөңгелек; Г,Д – ризоидты; Е – ризоидты шеті бар; Ж – амеба тәрізді; З – жіпшелі; И – қатпарлы; К – дұрыс емес пішінді; Л – концентрлі; М – күрделі.

Сурет 9 – Микроорганизмдердің колония пішіндері:



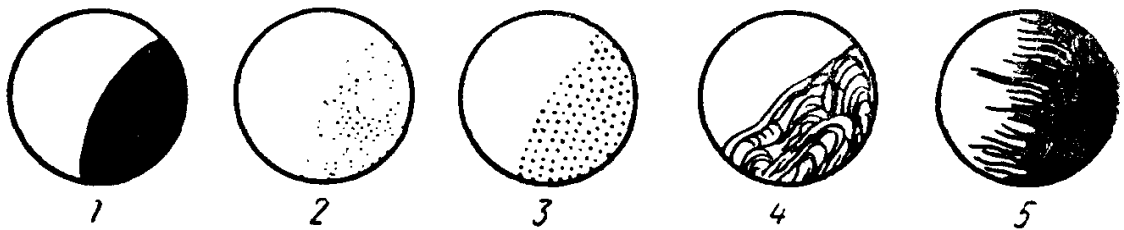
Ескерту: 1 – иілген (бүгілген); 2 – кратер тәрізді; 3 – иректелген; субстартқа бекініп өскен; 5 – жалпақ; 6 – дөңес; 7 тамшы тәрізді; конус тәрізді.

Сурет 10 – Микроорганизмдердің колонияларының профилдері



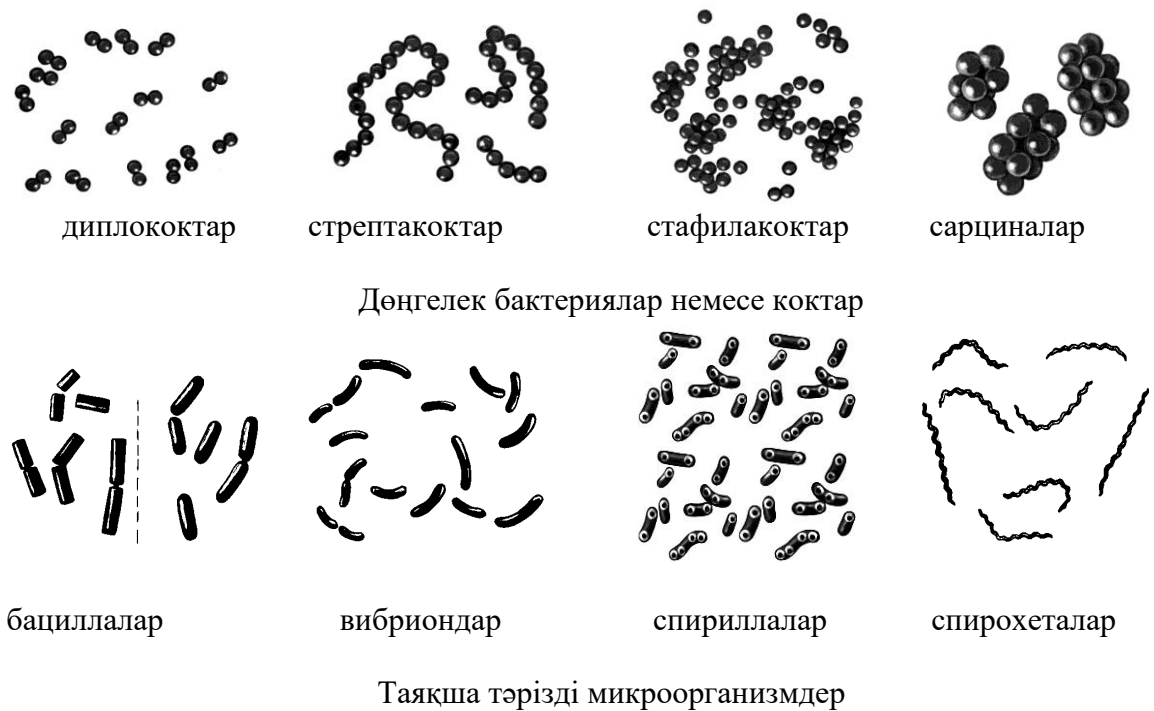
Ескерту: 1 – тегіс; 2 – иректелген; 3 – тісті; 4 - жалбыраған; 5 – дұрыс емес; 6 – кірпікшелі; 7 – жіпшелі; 8 – жіңішке жіпшелі; 9 – бұтақталған.

Сурет 11 – Микроорганизмдердің колонияларының шеті



Ескерту: 1 – біртекті; 2 – майда (2,0 мм дейін); 3 – ірі (2,0 мм үлкен); 4 – сорғалаған (струйчатая); 5 – талшықты.

Сурет 12 – Микроорганизмдердің колонияларының құрылымы



Сурет 13 – бактериялардың клетка морфологиясының алуантүрлілігі

Қажетті материалдар мен құралдар:

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

Тапсырмалар:

1. Ауа микрофлорасымен танысу.
2. Оқу ғимаратының әр түрлі бөлмелеріне қойылған Петри табақшаларындағы өскен микроорганизмдердің колонияларды сипаттау.
3. Микроорганизмдердің таза культураларын бөліп алу
4. Бөліп алған культуралар мен коллекциядағы штамдардың клетка морфологиясын салыстыру (әртүрлі туысқа жататын бактериялар).
5. Бөліп алған микроорганизмдердің клетка морфологиясын бекітілген препараттар дайындап зерттеу, суреттерді салып, түсініктеме беру

Бақылау сұрақтары

1. Микроорганизмдердің макроморфологиясын сипаттау әдістері қандай?
2. Клетка морфологиясы зерттеу қалай жүзеге асады?
3. Бөліп алған микроорганизмдердің культуралар мен коллекциядағы штамдардың клетка морфологиясын салыстыру, ұқсастықтары мен айырмашылықтары.

Зертханалық сабақ № 5-6.

Биотехнологияда маңызды қасиеттері бар микроорганизмдердің таза дақылдарының таксономиялық жағдайларын анықтау үшін культуралдық-морфологиялық қасиеттерін зерттеу.

Зертханалық сабақтың *мақсаты* – микроорганизмдердің таза дақылдарын бөліп алу және зерттеу.

Зертханалық сабақтың *міндеті* – микроорганизмдердің таза культураларды бөліп алу, микроорганизмдердің макроморфологиясын және клетка морфологиясы зерттеу.

Микроорганизмдердің клетка морфологиясы зерттеу, бөліп алған микроорганизмдердің культуралар мен коллекциядағы штамдардың клетка морфологиясын салыстыру (әртүрлі туысқа стрептомицеттер мен микроскопиялық саңырауқұлақтар).

Микроорганизмдердің физиологиялық, биохимиялық ерекшеліктерін зерттеу үшін , сонымен қатар олардың туыстық, түрлік белгілерін анықтау үшін микроорганизмдердің таза культураларымен жұмыс жасалынады. Таза культура дегеніміз, ол бір клеткадан алынған және микроорганизмнің бір ғана түрінен тұратын культураны айтады. Таза культура бөліп алатын нысанды әртүрлі болуы мүмкін. Топырақ, ауа, су немесе т.б нысан болуы мүмкін. Соған сәйкес таза культура бөліп алу әдісі де әркелкі болады. Жалпы таза культураны бөліп алу үш кезеңнен тұрады. Жинақтаушы дақыл алу, таза культура алу және оның тазалығын тексеру.

Таза культураны жинақтаушы культурадaн бір клеткадан немесе өсіп шаққан бір колониядан алады. Ол үшін тығыз қоректік орталарға егу жүргізеді. Қоректік ортада өсіп шыққан әр колонияны бір клеткадан өсіп дамыған деп есептеледі. Содан кейін өсіп шыққан жеке колониядан пробиркадағы қиғаш агарлы ортаға микробиологиялық тұзақ арқылы егу жүргізеді.

Бөліп алған микроорганизм культурасының тазалығын міндетті түрде тексеру қажет. Ол әдетте бірнеше әдістермен жүзеге асырылады: көзбен, микроскоппен бақылау арқылы және бірнеше рет тығыз қоректік ортаға егу арқылы. Соның ішінде, культуралардың тазалығын көзбен бақылау үшін қиғаш агарлы ортада өсірілген микроорганизм культурасын штрих бойымен (ирек сызық) өсуін қадағалайды. Егерде штрих бойымен өсу біркелкі

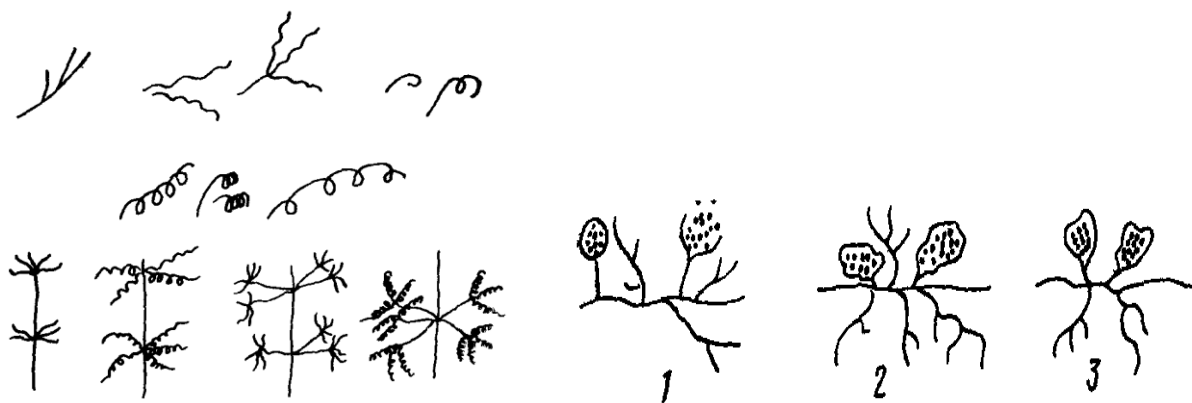
болмаса, онда культура таза еместігін көрсетеді. Бұндай бақылау тек қоректік ортаның бетінде өсуге қабілетті микроорганизмдердің тазалығын зерттегенде ғана қолданады.

Әдетте микроорганизмдердің тазалағын микроскоппен бақылайды. Ол үшін микроорганизмдердің клеткасынан кептіріліп боялған препарат немесе тірі клеткалардың препаратын дайындап микроскоппен тексереді. Таза культуралардың клетка морфологиясы біркелкі болады. Бірақ кейбір бактериялардың клеткалары, мысалы, микобактериялар, нокардиялар, родококктар және т.б. полиморфты болады. Яғни олардың клеткалары өздерінің өсу циклдарында кокка пішінді түрден таяқша, жіпше пішінге, дейін немесе керісінше өзгеріп тұрады. Осыған байланысты, олардың тазалығын микроскоп арқылы тексеру қиындықтар туғызатындықтан, міндетті түрде тиісті тығыз немесе сұйық қоректік орталарға егу жүргізу арқылы зерттеу қажет.

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

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

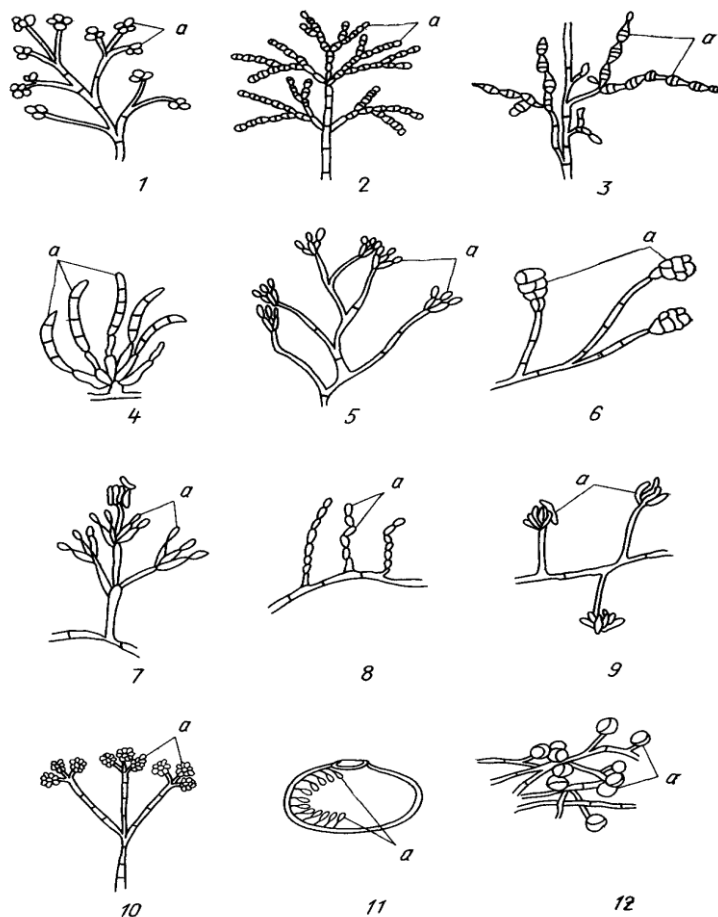
Саңырауқұлақтар эукариотты организмдерге жатады, мицелиалды құрылымға ие. Олар жынысты және жыныссыз жолмен көбейеді. Саңырауқұлақтарды зерттеу кезінде «жаншылған тамшы» препараты қолданылады. Заттық шыныдағы су тамшысына сірке қышқылын тамызып, оны араластырады. Сірке қышқылын саңырауқұлақтардың конидийлері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



Ескерту: 1 - *Actinoplanes*; 2- *Amorphosorangium*; 3 – *Spirillospora*

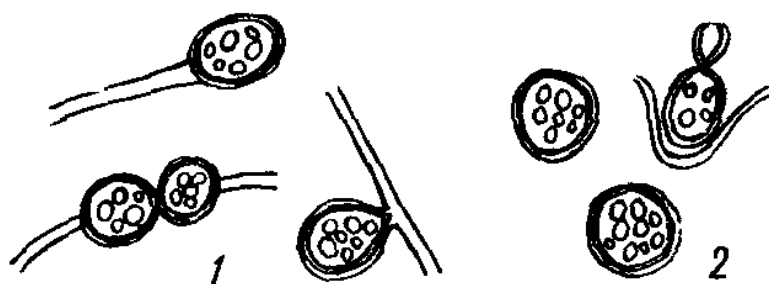
Сурет 14 – Актиномицеттердің ауалық мицелийлері

Сурет 15 – Актиномицеттердің спорангийлері



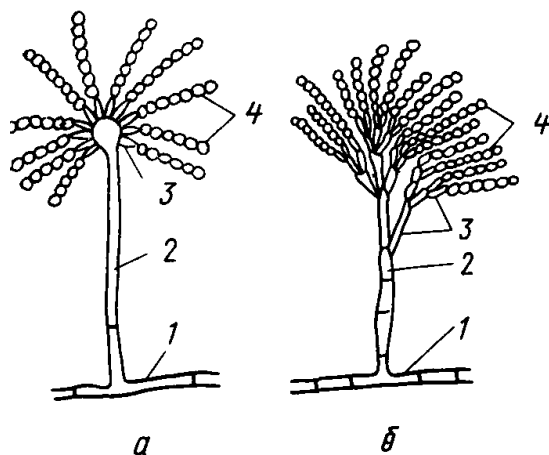
Ескерту: 1 – *Trichoderma*; 2 – *Cladosporium*; 3 – *Alternaria*; 4 – *Fusarium*; 5 – *Stachybotris*; 6 – *Stemphylium*; 7 – *Verticillium*; 8 – *Oospora*; 9 – *Cephalosporium*; 10 – *Botrytis*; 11 – *Phoma*; 12 – *Mycogone*; а – конидийлер.

Сурет 16 – Жетілмеген саңырауқұлақтардың конидиносецтері мен конидийлері



Ескерту: 1 – гифалардағы мицелийлер; 2 – мицелийсіз гифалар;

Сурет 17 – Ашытқы саңырауқұлақтарының хламидоспоралары



Ескерту: 1 – вегетативті мицелий; 2 – конидиофоралар; 3 – стеригмалар; 4 - конидийлер

Сурет 18 – *Aspergillus* (а) және *Penicillium* (б) туысы саңырауқұлақтарының конидийлері

Қажетті материалдар мен құралдар:

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

Тапсырмалар:

1. Микроорганизмдердің клетка морфологиясы зерттеу.
2. Бөліп алған микроорганизмдердің культуралар мен коллекциядағы штамдардың клетка морфологиясын салыстыру (әртүрлі туысқа стрептомицеттер мен микроскопиялық саңырауқұлақтар).

Бақылау сұрақтары

1. Жетілмеген саңырауқұлақтар, олардың конидиносецтері мен конидийлерінің ерекшеліктері
2. Ашытқы саңырауқұлақтары және олардың морфологиялық ерекшеліктері қандай?
3. Актиномицеттер, олардың ерекшеліктері?
4. Бөліп алған микроорганизмдердің (әртүрлі туысқа стрептомицеттер мен микроскопиялық саңырауқұлақтар) культуралар мен коллекциядағы штамдардың клетка морфологиясын салыстыру, ұқсастықтары мен айырмашылықтары.

Бактерия клеткасының құрылысы. Капсуланы бақылау. Грам тәсілі бойынша бояу.

Капсуланы бақылау. Көптеген микроорганизмдер клетка қабығынан басқа сыртқы қосымша қабатпен қапталады оларды – капсулалар деп атайды. Капсуланың негізгі атқаратын қызметі қалайсыз жағдайларда қорғаныстық және қоректік заттардың жиналуын қамтамасыз етеді. Капсулалар мөлдір шырышты болады. Сондықтанда бактериялардың тірі клеткаларын микроскоптан қараған кезде бірден байқалмайды. Капсулалар мен шырышты қабат тізбектеліп немесе топталып бір ғана клетканың төңірегінде орналасып қоймайды, сонымен қатар көптеген клеткалардың сыртында пайда болып, оларды түгел қоршайды. Капсуланы бақылау үшін әдетте «Бейтарап бояу» әдісін қолдану қара тушпен бояу арқылы жүзеге асады. Бейтарап бояу қолданған кезде бояу бактерия клеткасының маңайын толтырады, нәтижесінде қараңғы аймақта ашық, түссіз бөлік болып көрінеді. Ол үшін заттық шынының бетіне фуксин бояуымен араластырған клетка сұйықтығын тамызады. Содан кейін фуксинмен боялған препаратқа қара тушты қосып араластырып жаймалайды да ауада кептіреді, микроскоптан қарайды. Микроскоптан қараған кезде препараттың қара түсінде

микроорганизмнің қызыл түске боялған клеткасын қоршаған түссіз, мөлдір капсулалар жақсы көрінеді.

Бурри-Гинс әдісі бойынша капсулаларды бақылау.

Бурри әдісі бойынша препарат дайындалады. Ол үшін заттық шыныға қара туш бояуын тамызады, оның үстінен микроорганизмнің клеткасын араластырады. Содан кейін 96 % спирт тамызып, спирт шамының жалынында кептіріп бекітеді. Дайын болған препаратты 1/3 қатынасындағы Цильдің карбол фуксин бояуының сулы ерітіндісімен 2-3 минут бояйды. Препаратты сумен жақсылап шаяды да, ауада кептіреді және микроскоптан 40 объективпен қарайды. Нәтижесінде қара түсте қызғылт түске боялған бактериялардың клеткасын қоршап тұрған мөлдір түссіз капсулалар көрінеді. Бақылау ретінде коллекциядағы *Azotobacter* туысының бактериялары қолданылады. Алынған нәтижелерді қорытындылап, кестеге толтырады (19 сурет).

Грам әдісімен бактериялардың клетка қабықшасының боялу сипатын анықтау.

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

Грам әдісі бойынша бояу тәртібі:

Заттық шыны бетіне зерттелетін бактерия клеткасының кептірілген жұғындысын дайынап алады. Содан кейін бактериялардың жұғындысын келесі тәртіп бойынша бояйды.

1. Бекітілген жұғындыны *кристалды көгілдірмен* бояп, 1-2 мин ұстайды да, бояуды төгіп тастайды.

2. *Люгольдің ерітіндісін* тамызып, 1-2 мин кейін ерітіндіні төгеді.

3. препаратты *этил спиртімен* 30 секунд өңдеп түссіздендіреді.

4. Препаратты сумен шаяды.

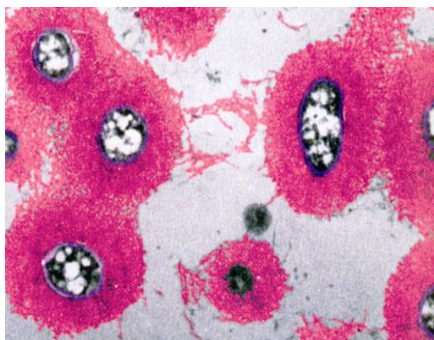
5. *Сулы фуксинмен* 1-2 минут бояйды.

6. Сумен шаяды

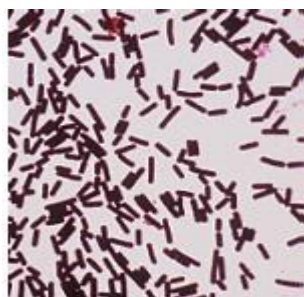
7. Препаратты кептіріп құрғатады да микроскоптан қарайды.

Микроскоптан қараған кезде Грам оң бактериялар қою көгілдір немесе күлгін түске, ал грам теріс бактериялардың клеткалары ашық қызыл түске боялады (20 сурет).

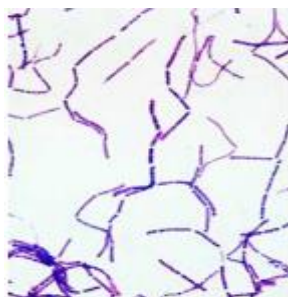
Грам әдісімен бояу нәтижесі дақылдың жасына байланысты болады: ересек дақылдардағы өлі клеткалар грам теріс боялады. Сондықтан жас тәуліктік дақылдарды қолданған жөн. Алынған нәтижелерді кестеге толтырады.



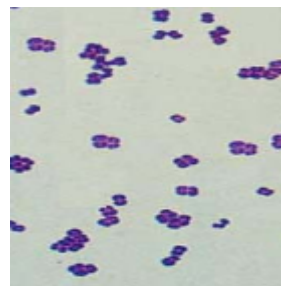
Сурет 19 - *Alcaligenes faecalis* бактериясының боялған капсуласының микрофотографиясы



Clostridium perfringens



Bacillus subtilis

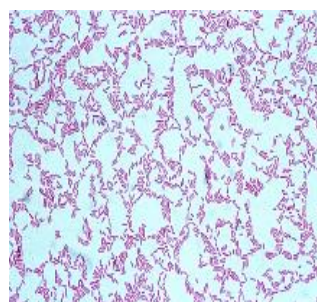


Micrococcus luteus

Грам оң бактериялар



Escherichia coli



Pseudomonas aeruginosa

Грам теріс бактериялар

Сурет 20 - Грам әдісімен бактериялардың клетка қабықшасының боялу сипатын анықтау.

Кесте 1 - Бактерия клеткаларын бояу әдістері.

Бояу әдісі	Бактерия клеткасында бақылайтын құрылым	Грам тәсілімен боялуы	Суретін салу

Қажетті материалдар мен құралдар:

Залалсыздандырылған тұзақтар, заттық шыны, жабынды шыны, микробиологиялық тұзақ, қажетті бояулар, қара туш, 96 % спирт, Цильдің карбол фуксин бояуының сулы ерітіндісі, *Azotobacter* туысының бактериялары, микроскоптар

Тапсырмалар:

1. Бөлініп алған бактерия культураларының клеткасының құрылысымен танысу.
2. Микроорганизмдердің капсулаларын бақылау
3. Грам тәсілі бойынша бояуды меңгеру.
4. Бөліп алған культуралардың Грам тәсілі бойынша боялуын коллекциялық штамдармен салыстыру

Бақылау сұрақтары.

1. Бактерия клеткаларының ультрақұрылымы
2. Прокариоттардың тұрақты құрылымдық элементтері (клетка қабырғасы, цитоплазмалық мембрана, нуклеоид, цитоплазма, мезасомалар, рибосомалар), құрылысы, қызметі.
3. Бактерия клеткаларының тұрақсыз құрылымдық элементтері – капсула және олардың маңызы мен қызметі.

4. Бактериялардың клетка қабырғасының ерекшеліктері.
5. Микроорганизмдердің клеткаларын бояудың күрделі әдістері.
6. Грам оң және грам теріс бактериялар. Грам тәсілімен бояу әдісі және бактерияларды классификациялаудағы маңызы.

Бактериялардың клеткасындағы спораларды бақылау және клеткалардың қозғалғыштығын анықтау..

Бактериялардың ішінде спораны *Bacillus* және *Clostridium* туысының өкілдері түзеді. Бактериялардың споралары вегетативті клеткаларға қарағанда қоршаған ортаның жағымсыз факторларына жоғары төзімділік көрсетеді. Олар дөңгелек, сопақ немесе эллипс тәрізді түзінділер. Егер спора диаметрі спора түзетін клетка диаметрінен аспаса, ондай клетканы *бациллярлы* деп, ал клетка диаметрінен асатын болса, спора клетканың ортасында немесе шетінде орналасуына байланысты *кlostридиалды* немесе *плектридиалды* деп атайды.

Тірі спора түзетін клеткаларды бақылау кезінде олардың спораларын жарық сәулесінің шағылысуынан байқауға болады. Споралар қышқылға төзімді және бояулармен қиын боялады. Бұл олардың клетка қабығының қалыңдығымен, бос су концентрациясының төмендігімен және споралардағы липидтің құрамының жоғары болуымен түсіндіріледі. Бактериялардың спораларын бақылау үшін көбінесе ескі культуралар (3-10 тәуліктік) қолданылады.

Көптеген бактериялар қозғала алады, өйткені олардың клетка сыртында бір немесе бірнеше арнайы талшықтар болады. Олар жіңішке, бір шеті бос, екінші шеті клеткаға бекіген және орналасу тәртібі әр түрлі. Талшықтар саны мен бактерия клеткасында орналасу тәртібіне қарай әр түрлі болып келеді. Егер де талшықтар клетканың бір жақ шетіне бекінген жалғыз орналасса *монополярлы монотрихтер*, талшықтары клетканың екі шетінде бір-бірден орналасқан бактериялар - *екі полярлы монотрихтер*, талшықтары клетканың бір жақ шетінде шоқтасып орналасқан бактериялар - *монополярлы политрихтер* немесе *лофотрихтер*, талшықтары клетканың екі шетіне топталып орналасқан бактериялар - *екі полярлы перитрихтер* немесе *амфитрихтер*, талшықтар клетканың бетін толық жабатын бактериялар - *перитрихтер* деп аталады.

Бактериялардың спора түзу қабілетін М.А. Пешков ұсынған әдіспен анықтау.

Зерттелетін бактерия культурасының жұғындысын дайындап оттың жалынында кептіреді. Кептірілген препаратқа Лефлер әдісі бойынша дайындалған метилен көгі бояуын тамызады да оттың жалынында 15-20 секунд қайнатады. Препарат салқындаған соң сумен шайып тастайды да 30 секунд нейтралды қызыл бояудың 0,5 % сулы ерітіндісімен бояйды. Содан кейін препаратты дистилденге сумен шайып тастап, кептіреді де микроскоптан қарайды. вегетативті клеткалары қызғылт түске боялады, споралары көгілдір немесе көк түске (культураның жасына байланысты) боялып көрінеді.

Ожешко әдісімен бактериялардың спора түзу қабілетін, спораның орналасуын анықтау.

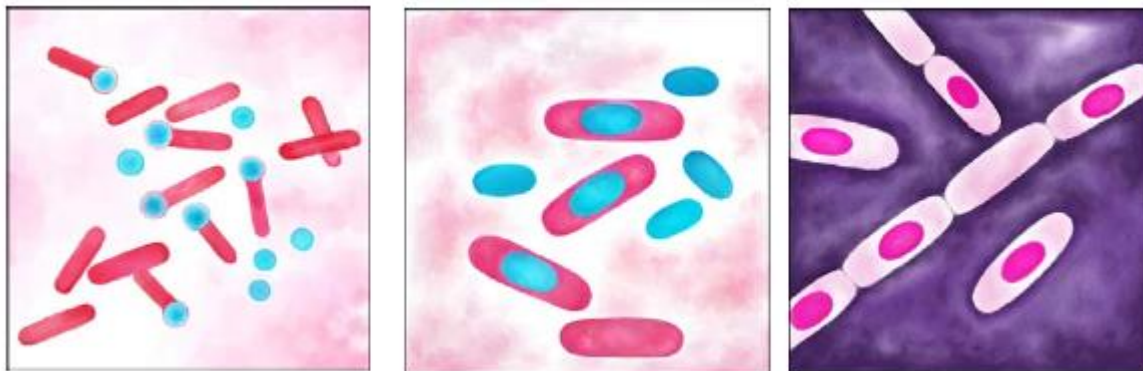
Бекітілмеген, бірақ кептірілген препаратқа 0,5% хром қышқылын құйып, 5-10 мин кейін оны шайып тастайды. Препаратты фильтр қағазымен жауып, Цильдің карболды фуксин бояуын тамызады. Жалынның үстіне қойып, бу пайда болғанша қыздырады. Содан кейін тағы да бояу құяды. Осылайша 7 мин жасайды. Бояғыш буланып, ал қағаз кеппеуі керек. Суыған соң қағазды алып тастап, препаратты сумен шаяды, фильтр қағазымен жақсылап сусыздандырып алады. Осылай өңдеудің нәтижесінде споралар клеткамен бірдей боялады. Одан кейін цитоплазманы түссіздендіру қажет, ол үшін 1% HCl немесе 1% H₂SO₄ 15-30 секунд өңдейді. Түссізденген препаратты сумен шайып, қосымша метилен көгімен 2 минут аралығында бояйды. Препаратты тағы да сумен шайып, сусыздандырады. Егер препарат дұрыс дайындалған болса, спора ашық қызыл түске боялады да, цитоплазма көк аймақта айқын байқалады (21 сурет).

«Ілінген тамшы» және «Жаншылған тамшы» препараттарының көмегімен бактериялардың қозғалысын сипаттау.

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

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

Препаратты дайындау үшін заттық шыныға бір тамшы су тамызып, оған тұзақпен зерттеу материалын енгізіп, араластырады да, жабынды шынымен жауып, микроскоп арқылы зерттейді.



Сурет 21 – *Bacillus* туысы бактериясының әртүрлі түрлерінің клеткасындағы эндоспораның түрлері орналасуы

Қажетті материалдар мен құралдар:

Залалсыздандырылған тұзақтар, заттық шыны, жабынды шыны, микробиологиялық тұзақ, қажетті бояулар, қара туш, 96 % спирт, Цильдің карбол фуксин бояуының сулы ерітіндісі, сүзгі қағазы, микроскоптар

Тапсырмалар:

1. Бөлініп алған бактерия культураларының клеткасының құрылысымен танысу.
2. Микроорганизмдердің спораларын әртүрлі әдістерді қолдана отырып бақылау
3. Микроорганизмдердің спора түзудің сипаты анықтау.
4. Прокариоттардың талшықтың орналасуына байланысты клетка қозғалысын анықтау.
5. Бөліп алған культуралардың спора түзудің сипаты, талшықтың орналасуына байланысты клетка қозғалысын коллекциялық штамдармен салыстыру

Бақылау сұрақтары.

1. Бактерия клеткаларының ультрақұрылымы
2. Бактерия клеткаларының тұрақсыз құрылымдық элементтері – спора, талшықтар, және олардың маңызы мен қызметі.
3. Бактериялардың клетка қабырғасының ерекшеліктері.
4. Микроорганизмдерді қозғалу түрлері. Таксис.

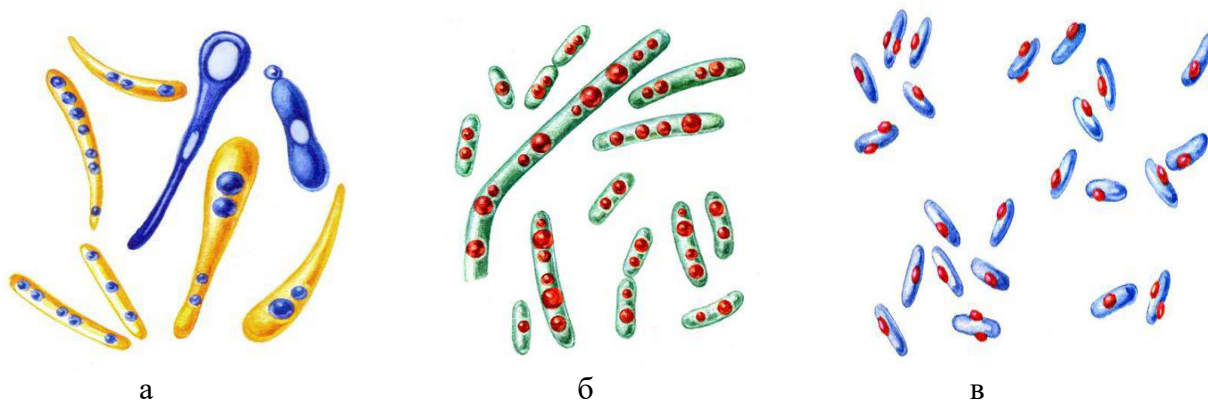
Бактерия клеткасының құрылысы. Зерттелетін культуралардың клеткасындағы қосындыларды бақылау.

Көптеген микроорганизмдер цитоплазмаішілік қосындылары болады. Оларға клетканың ішінде жиналатын метаболизм өнімдері, зат айналымна қажетті түрлі құрылымдар жатуы мүмкін. Кейбір қосындылар микроорганизмдерді қоршаған ортада тіршілік етуінде әртүрлі қабілеттілік қызметтерін атқарады. Мысалы, газ вокулдері

микроорганизмдердің суда қалқып, жүзіп жүруін қамтамасыз етсе, темір бактерияларының магнетосомалары магниттік өріске қажетті қабілеттіліктер көрсетеді.

Микроорганизмдердегі клетка қосындылары клетканың ішінде қорек көзі ретінде жинақталатын түйіршік түрінде болуы мүмкін. Оларға әртүрлі полисахаридтер (гликоген, крахмал, гранулеза), липидтер, полифосфаттар болады. Кейбір бактериялар клеткасында күкірт жинайды, азот көзі ретінде цианобактериялар цианофициндер жиналады (22 сурет).

Көмірсу түйіршіктерін (полисахаридтерді) бақылау. Көмірсу түйіршіктерін (полисахаридтерді) Люголь ерітіндісі арқылы бақылайды. Заттық шыны бетіндегі клетканың сұйықтығының тамшысына Люголь ерітіндісін қосады. Крахмал тәрізді заттардың түйіршігі гранулездер көк түске боялады. Гликоген ашытқыларда Люголь ерітіндісімен өңдегенде оңай көрінеді. Бактериялардың арасында гранулезаны *Clostridium* туысының өкілдерінде болады.



Ескерту: а - анаэробты бактерияның спора түзу кезіндегі қоректік заттар – гранулезалар; б – споратүзуші бактериялардың клеткасындағы ірі май түйіршіктері; сірке қышқылды бактериялардың клеткасындағы метахроматин түйіршіктері

Сурет 22 – микроорганизмдердің клеткасындағы қосындылар

Май түйіршіктерін бақылау. Бактериялар клетка ішінде липидтердің қоры ретінде поли- β -оксимай қышқылдарын жинайды. Ол үшін клеткаларды лиофильді қара судан немесе судан III бояуымен бояйды. Бактериялардың клеткасынан жұқа етіп клетка жұғындысын дайындап, ауада кептіреді және оттың жалында бекітеді. Оның үстінен суданның ерітіндісін тамызады да препаратты сүзгі қағазымен кептіреді де ксиллолмен түссіздендіреді. **Түссіздендіру уақыты 1 минут, тяганың астында жүзеге асуы керек!**

Поли- β -оксимай қышқылдары қара түске, ал клетканың қалған бөлігі қызғылт түске боялады.

Полифосфаттарды (волютин) бақылау. Бактериялардың клеткасында полифосфаттар (волютин) едәуір көп жиналады. Волютиннің мөлшері 0,5 мкм болатын сфера пішінді дәнешіктер болып көрінеді. Волютиннің химиялық құрамы жағынан бейорганикалық полифосфаттардан және РНҚ күрделі комплексінен тұрады. Ол клеткада энергетикалық және құрылымдық қызмет атқара отырып, азот пен фосфордың көзі ретінде қор ретінде жиналады. Волютин түйіршіктерін бояу метахроматиннің қасиетіне негізделген.

Бактериялардың клеткасынан жұқа етіп клетка жұғындысын дайындап, ауада кептіреді және оттың жалында бекітеді. Кептірілген жұғындыға Леффлер бойынша дайындалған метилен көгін тамызып, клеткаларды 10 минут бояйды. Содан кейін бояуды төгеді, препаратты сумен шаяды, кептіреді, микроскоптан $40\times$ объективпен қарайды. Клетка көгілдір түске, волютин дәні – қызғылт-күлгін түске боялады.

Күкіртті қосындыларды бақылау. Бактерияларда метаболизмдері күкіртті қосылыстарға тәуелді топтарында күкіртті қосындылар болады. Оларға күкірт сутекті тотықтыратын күкірт тионды бактериялар және электрон доноры ретінде күкіртті пайдаланатын анаэробты фотосинтездеуші бактериялар жатады. Күкіртті қосылыстардың екі

рет сәулені сындыратын қасиетіне байланысты клеткада бояуды қолданбай ақ жақсы көруге болады.

Қажетті материалдар мен құралдар:

Залалсыздандырылған тұзақтар, заттық шыны, жабынды шыны, микробиологиялық тұзақ, қажетті бояулар, қара туш, 96 % спирт, Люголь ерітіндісі, Судан III бояуы, сүзгі қағазы,, микроскоптар

Тапсырмалар:

1. Бактерия клеткасының құрылысымен танысу.
2. Зерттелетін культуралардың клеткасындағы қосындыларды бақылау. Май түйіршіктерін, волютин, көмірсу түйіршіктерін және күкіртті қосындыларды бақылау
3. Әртүрлі таксономиялық топтардағы микроорганизмдердің клетка қосындыларын салыстыру.

Бақылау сұрақтары.

1. Бактериялардың клеткасындағы қор заттарының табиғаты қандай?
2. Бактериялардың клеткасында қор заты ретінде жиналатын қосындыларды бақылау үшін қандай бояулар қолданады?
3. Бактериялардың капсуласын бақылау қандай әдіске негізделген?

Зертханалық сабақ № 6-8

Микроорганизмдердің биотехнологияда маңызды қасиеттері бар дақылдардың таксономиялық жадайын анықтау үшін биохимиялық белгілерін анықтау.

Культуралардың физиологиялық-биохимиялық қасиеттерін зерттеу. Зерттелетін штамды туыс және түрге дейін анықтау.

Микроорганизмдердің физиологиялық-биохимиялық ерекшеліктерін сипаттамасы олардың түрлі қоректік орталарда өсу қабілеттілігі мен сол қоректік орталардың құрамына кіретін нақты бір заттарды ыдырату қабілеттілігі кіреді. Әртүрлі көміртекті, азотты, және күкіртті қосылыстарды қолдануын, молекулалық оттегіне қатынасы, антибиотиктік заттарды түзу және белгілі бір субстраттарға ферментативтік белсенділік көрсету қабілеттілігі есептелінеді. Бірқатар жағдайларда микроорганизмдердің антибиотиктерге сезімталдылығы анықталады.

Микроорганизмдердің көмірсулы қосылыстарды пайдалануы.

Микроорганизмдердің барлығы бірдей қабілеттілікпен зат алмасуға қажетті көмірсулы қосылыстарды пайдалана алмайды. Әдетте олардың керекті көмірсулы қосылыстарда өсу мүмкіншіліктерін құрамында көміртегінің жалғыз көзі ретінде түрлі моно-, ди-, және полисахаридтерді, көп атомды спирттерді, органикалық қышқылдарды, көмірсутектерді қоректік ортаға қосу арқылы анықтайды. Көмірсулар мен көп атомды спирттер ретінде арабиноза, ксилоза, рамноза, глюкоза, фруктоза, манноза, галактоза, сорбоза, сахароза, лактоза, мальтоза, целлобиоза, рафиноза, декстрин, крахмал, целлюлоза, глицерол, маннитол, дульцитол, сорбитол, инозитол және т.б. пайдаланады.

Қоректік ортаның негізгі фоны келесі құрамнан тұрады (г/л): пептон – 5,0; K_2HPO_4 - 1,0; дистилденген су – 1 литр. Микроэлементтер ерітіндісі – 0,1 мл. 0,5 атмосферада 30 минут залалсыздандырады.

Микроэлементтер ерітіндісі г/100 мл: $CuSO_4 \times 5H_2O$ - 0,64; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,11; $MnCl_2 \times 4H_2O$ – 0,79; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,15; дистилденген су – 100 мл; ерітіндіні жеке дайындап, 3-5 °C сақтайды.

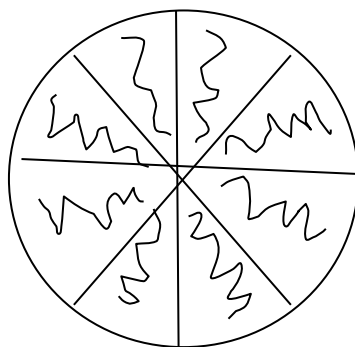
Микроорганизмдер көмірсулар немесе көп атомды спирттерде өскен кезде органикалық қышқылдарды, бейтарап өнімдер және газдар түзуі мүмкін. Қышқылдардың түзілгендігін ортаның рН өзгеруінен байқауға болады. Ол үшін 1 литр негізгі фонды ортаға 1,6 % индикатордың спиртті ерітіндісінен 2 мл құяды. Индикатор ретінде қоректік ортаның түсін сары түстен көк түске дейін өзгертетін рН 6,0-7,6 болатын бромтимолблау немесе қошқыл

түстен сарыға өзгертетін рН 6,8-5,2 бромкреозолпурпурды қосады. Содан кейін «негізгі фонды» 8-10 мл құяды, содан кейін алдын-ала қалтқы (поплавки) салады да 1,0 залалсыздандырылдандырады.

Көмірсулар мен көп атомды спирттерді 10-40 % сулы ерітінді түрінде жеке дайындап, негізгі фоннан бөлек 0,5 атм-да залалсыздандырады. Залалсыздандырылған ертінділерді 1мл қосады. Дайын болған ортаға микроорганизмдердің клетка сұйықтығын 0,1 мл алып егеді де 1-5 тәулікке өсіреді. Баяу өсетін микроорганизмдерді 7-10 тәулік өсіреді. Бақылау ретінде клетка сұйықтығы қосылмаған, зерттелетін көмірсу бар негізгі фонды орта аламыз.

Сонымен қатар микроорганизмдердің көмірсулар мен көп атомды спирттерді пайдалану қабілетін тығыз қоректік ортада анықтауға болады. Бұл жағдайда залалсыздандырылған негізгі фонды тығыз қоректік ортаға залалсыздандырылған көмірсулар мен спирттердің ерітіндісін қосады да Петри табақшаларына құяды. Содан кейін Петри табақшасының астына маркер немесе карандашпен бөліктерге бөледі. Сосын зерттелетін әрбір микроорганизмді тұзақпен әр бөлікке егеді. Өсіру уақыты 2-10 тәулік. Нәтижелерді өсу қарқындылығымен сипатталады және бақылау ортасымен салыстыра талдау жасайды (25 сурет).

Микроорганизмдердің протеолитикалық (протеазалық) белсенділігін зерттеу. Протеатикалық ферменттер белоктарды поли- және олигопептидтерге дейін ыдырауын катализдейді. Протеазаны бациллалардың, актиномицеттер, мицелиалды саңырауқұлақтар және т.б. микроорганизмдердің әр түрлі өкілдері бөледі. Клеткасыртылық протеазалардың белсенділігін субстрат ретінде желатин, казеин және т.б. белоктар қолдана отырып анықтайды.



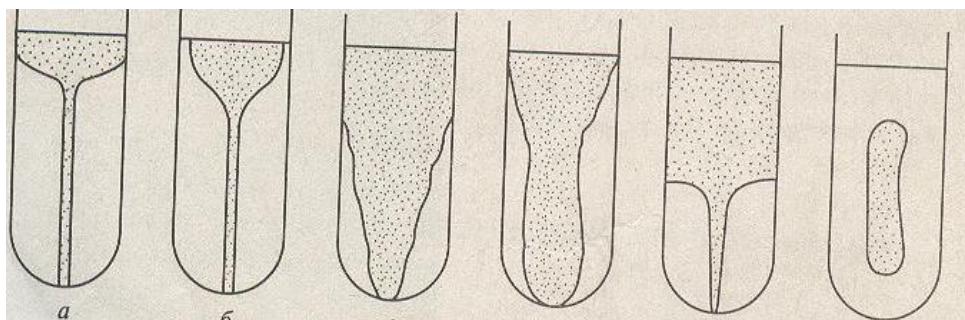
Сурет 25 – Әртүрлі микроорганизмдерді көмірсулар мен спирттерде өсу қабілетін анықтауға арналған тығыз қоректік орталарға егу жүргізудің сызба нұсқасы.

Желатиннің ыдырауы. Микроорганизмдерді ет-пептонды желатин (ЕПЖ) ортасына егеді. Ол үшін алдымен ортаны дайындап алады. 100 мл ет-пептонды сорпағы (ЕПС) 10-15 г желатин қосып, 20-30 минутқа ісінгенше қалдырады. Содан кейін су моншасында желатин толығымен ерігенше қайнатады және дайын болған ЕПЖ ортасын 8-10 мл пробиркаларға құяды. 0,5 атм. 15-20 залалсыздандырады. Сосын микроорганизмдерді микробиологиялық инемен егеді. Өсіру уақыты 7-10 тәулік. Желатиннің ыдырауын көзбен бақылайды. Егерде желатин ыдырағаны байқалса оның қарқындылығын және ыдырау пішін бағалайды. Желатин – қабатты, воронка тәрізді, қап тәрізді, көпіршіктелген және т.б. (сурет 26).

Казеиннің гидролизі. Микроорганизмдердің казеинді протеолиздеу қабілетін анықтау үшін залалсыздандырылған, майсыз 3 % агар қосылған сүтті агар ортасы қолданылады. Сүтті агар ортасын Петри табақшаларына құяды. Микроорганизмдерді жіңішке сызық бойымен егеді. Өсіру уақыты 2-10 тәулік. Казеиннің гидролизін микроорганизмдердің сызық бойымен өскен колонияларының айналасындағы мөлдір аймақтың түзілуінен бағалайды. Әсіресе ол аймақ 5 % үш хлор сірке қышқылының ерітіндісімен өңдегеннен кейін нақты көруге болады. Казеиннің гидролиздену аймағын сызықтың немесе колонияның шетінен мөлдір аймақтың

шегіне дейін миллиметрмен өлшейді. Мөлдір аймақтың диаметрі үлкен болған сайын, казеинді гидролиздеу белсенділігі соғұрлым жоғары болады.

Амилолитикалық (амилазалық) белсенділігін зерттеу. Крахмал амилаза ферментінің әсері арқылы бациллалардың, псевдомонадалардың, стрептомицеттердің және мицелиалды саңырауқұлақтардың әр түрлі белсенді өндірушілері арқылы гидролизденіп ыдырайды. Микроорганизмдердің амилазалық белсенділігін анықтау үшін келесі құрамды қоректік орта пайдаланылады г/л: пептон – 10,0; KH_2PO_4 - 5,0; ерігіш крахмал – 2,0; агар – 15,0; ортаның рН – 6,8 – 7,0; қоректік ортаны 1,0 атмосферада залалсыздандырып, Петри табақшаларына құяды. Орта қатқан соң зерттелетін микроорганизмдерді жіңішке сызықпен егеді. Өсіру уақыты 2-10 тәулік. Крахмалдың гидролизін агарлы ортаны Люголь ерітіндісімен өндеген соң бақылайды. Ол үшін ортаға Люголь ерітіндісінен 2-3 мл құяды. Құрамында крахмал бар орта көк түске боялады, ал егерде крахмал декстриндерге дейін ыдыраса, гидролизденген аймақ түссіз немесе қызыл-қоңыр түске боялады. Түссізденген аймақтың диаметрі қаншалықты үлкен болса, соғұрлым амилазалық белсенділік жоғары болады.



Ескерту: а - кратер тәрізді; б – шомыр тәрізді; в – воронка тәрізді; қап тәрізді; г – қабатталған; е – көпіршік тәрізді (а – в және д аэробты микроорганизмдердің желатинді ыдыратуы; г – факультативті анаэробтардың ыдыратуы; е – анаэробтардың ыдыратуы),.

Сурет 26 – Микроорганизмдерді ЕПЖ қоректік ортасына инемен егу жүргізгеннен кейінгі желатиннің ыдырауы

Аммиактың түзілуін бақылау. Микроорганизмдердің аммиакты тұзу қабілетін анықтау үшін ет-пептонды сорпа (ЕПС) ортасы пайдаланылады. Ол үшін ЕПС ортасын 8-10 мл-ден пробиркаларға құйып, 1 атмосферада залалсыздандырады. Дайын балған ортаға микроорганизмдерді егеді. Егу жүргізген соң мақта тығынның астына залалсыздандырылған лакмус қағазын қоректік ортамен жанасатындай етіп бекітеді. Содан кейін пробирканың тығынын аммиак ұшып кетпес үшін полиэтиленді қаппен орайды. Аммиактың түзілгендігін қызыл лакмус қағазының көк түске боялғандығынан анықтауға болады.

Егерде қоректік орта ретінде 4 % пептонды суды пайдаланса аммиактың түзілуін Несслер реактивінің көмегімен анықтайды. Фарфор пластинкаға бірнеше тамшы микроорганизмнің культурасының сұйықтығын тамызады және Несслер реактивінің бір тамшысын тамызады. Егерде ортада аз мөлшерде аммиак түзелсе орта сарыға боялады, көп мөлшерде түзілсе қоңыр түске боялады.

Индолдың түзілуін бақылау. Индолды бақылау Эрлих реактивін пайдалана отырып анықтайды. Сонымен қатар әр түрлі қоректік орта пайдаланады. Индолды бақылау үшін 0,01 % триптофан бар ЕПС немесе 2-3 % пептонды су ортасын пайдалануға болады. Ортаның рН – 7,2-7,4 болу керек. Орталарды 8-10 мл-ден пробиркаларға құйып, 1,0 атмосферада залалсыздандырады. Залалсыздандырылған ЕПС ортасына триптофанды ерітінді түрінде қосады. Ол үшін триптофанды суға қосады және 5-10 % NaOH ерітіндісін толығымен ерігенше қосады. Триптофан ерітіндісін 0,5 атм. 15-20 минут залалсыздандырады. Содан кейін бактериялардың сұйықтығын егеді. Содан кейін 5- тәулік өткен соң культурада және бақылау үлгісінде индолдың бар екендігіне көз жеткізу үшін сапалық реакция жасайды. Ол

үшін ортаның бетіне араластырмай 1-2 мл Эрлих реактивін қосады. Егерде ортада қызыл түс пайда болса индолдың түзілгендігін көрсетеді.

Микроорганизмдердің молекулалық оттегіне қатысы және олардың анаэробты жағдайда өсуі. Микроорганизмдердің молекулалық оттегіне қатысына байланысты микроорганизмдерді облигатты аэробтар, микроаэрофилдер, факультативті, аэротолерантты және қатаң анаэробтар деп бірнеше топқа бөледі. Микроорганизмдердің осы аталған топтың біреуіне жатқызу үшін микробтық сұйықтықты пробиркадағы 40-45 °С дейін суытылған агарлы тығыз қоректік ортаға инемен егеді. Қатаң аэробтар қоректік ортаның бетіне өседі, микроаэрофилдер – ортаның беткі қабатынан сәл төмендеу өсед, факультативті анаэробтар әдетте қоректік ортаның бетін бойлай өседі, қатаң анаэробтар тек ортаның түбінде өседі.

Қажетті құралдар мен материалдар:

ЕПА ортасы құйылған табақшалар, Дригальский шпателі, қоректік орталарды дайындауға арналған реактивтер, әр түрлі көмірсулар мен спирттер, пробиркалар, полиэтилен қабы, ЕПЖ, триптофан, Эрлих реактиві, залалсыздандырылған тұзақтар, заттық шыны, жабынды шыны, микробиологиялық тұзақ, қажетті бояулар.

Тапсырмалар:

1. Культуралардың физиологиялық-биохимиялық қасиеттерін зерттеу.
2. Микроорганизмдердің көмірсулы қосылыстарды пайдалануы.
3. Микроорганизмдердің әр түрлі ферментативтік белсенділіктерін зерттеу.
4. Индолдың түзілуін бақылау
5. Каталазалық белсенділігін анықтау.
6. Оксидазалық белсенділігін анықтау
7. Аммиактың түзілуін бақылау.

Бақылау сұрақтары:

1. Бактерияларды практикалық классификациясы мен идентификациясы.
2. Культуралардың физиологиялық-биохимиялық қасиеттерін зерттеу.
3. Зерттелетін штамды туыс және түрге дейін анықтау.

Зертханалық сабақ № 9-14.

Биотехнологияда маңызды микроорганизмдердің таза дақылдарын өсіруін бағалау. Беттік және тереңдік өсіру. Үздікті және үздіксіз өсіру әдістері.

Зертханалық жұмыстың мақсаты: - бактериялардың таза дақылдарының өсуін сипаттау.

Зертханалық жұмыстың міндеті: - бөлініп алған бактериялардың культураларын қоректік орталарға егу және олардың колонияларды сипаттау.

Бактериялардың колониясын зерттеу. Микроорганизмдер тығыз қоректік ортаның бетіне өсіп шыққан кезде колония түзіп, штрих (ирек сызық) бойымен немесе тегіс газон болып өсуі мүмкін. Колония деп – микроорганизмнің бір түрінің клеткалар жиынтығын айтады. Ол клетканың қоректік ортаға қалай өскеніне байланысты болады. Біреулері қоректік ортаның бетіне, келесілері ортаны бойлай өседі, ал кейбіреулері ортаның түбіне қарай өседі. Осыған байланысты колонияның беттік, тереңдік және түптік түрлері болады.

Микроорганизмдердің колониясын зерттеу үшін оларды алдымен тазалығына көз жеткізу керек. Ол үшін тығыз қоректік ортаның бетіне он еселік сұйылту әдісін қолдану арқылы культура сұйықтығын дайындалады. Содан кейін залалсыздандырылған пипеткамен 0,1 мл алып, тығыз қоректік орта құйылған Петри табақшасына тамызады және Дригаль шпателімен тамшыны қоректік ортаның бетіне біркелкі етіп жаймалайды. Егу жүргізіп біткен соң 28-30 °С температуралы термостатқа 2-3 тәулікке қалдырады. Өсіп шыққан

колониялар бірнеше түрлі болып келеді (сурет 8-11). Оларды сипаттаған кезде келесі белгілеріне көңіл бөледі:

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

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

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

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

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

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

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

Қажетті құралдар мен материалдар:

ЕПА ортасы құйылған табақшалар, Дригальский шпателі, залалсыздандырылған тұзақтар, заттық шыны, жабынды шыны, микробиологиялық тұзақ, қажетті бояулар.

Тапсырмалар:

1. Бөлініп алған бактериялардың культураларын қоректік орталарға егу
2. Қоректік орталарға өсіп шыққан микроорганизмдердің колонияларды сипаттау

Бақылау сұрақтары:

1. Таза культураларды бөліп алу және олардың колонияларын сипаттау әдістері
2. Бактериялардың систематикасы.
3. Бактерияларды практикалық классификациясы мен идентификациясы.
4. Колония дегеніміз не?
5. Микроорганизмдердің колонияларын сипаттау барысында қандай белгілеріне көңіл бөлінеді?

Бактериялардың ет пептонды сорпа сұйық қоректік ортасында өсуі. Бактериялардың таза культураларынан үлгі алып пробиркаларға құйылған ет пептонды қоректік ортасына егу жүргізеді де термостатқа 3-4 тәулікке 25-30 ° С өсіреді. Содан кейін термостаттан алған кезде қозғалтпай, арластырмай тыныштық жағдайда алады да өсудің мынадай көрсеткіштерін анықтайды:

1. Қоректік ортада қабықша түзілуі және оның қасиеті (сақина тәрізді немесе тегіс қабықша, мақта тәрізді, жұқа, қалың, шырышты, тегіс, қатпарлы);
2. Тұнба түзілуі және оның қасиеті (тығыз, мақта тәрізді, түйіршікті, созылғыш, өте көп, аз);
3. Ортаның лайлануы және лайлану деңгейі;
4. Ортаның түсі мен иісі

Бактериялардың ет пептонды агар тығыз қоректік ортасында сызық (штрих) бойымен өсуі. Бактерияларды микробиологиялық тұзақ арқылы ет-пептонды агар тығыз ортасына егу жүргізеді. Содан кейін сипаттауды өсу қарқындылығына байланысты келесі ерекшеліктеріне көңіл бөледі:

- а) өсу қарқындылығы (әлсіз, орташа, жоғары);
- б) өсу пішіні (шектелген, бұтақталған);
- в) өсу сызығының шеті (тегіс, талшықты, жалбыраған, тістелген, шашақталған);
- г) өсу сызығының жалтырауы (жылтыр, жылтыр емес);
- д) өсу сызығының профилі (жалпақ, дөңес);
- е) өсу сызығының беті (тегіс, шашыраған, кедір-бұдырлы, қатпарлы);
- ж) өсу сызығының түсі;
- з) оптикалық белгісі (мөлдір немесе мөлдір емес);

и) культураның консистенциясы (тартылған, шырышты, іртіктелген, шеміршек тәрізді).



Сурет 24- микроорганизмдердің культураларын егуге арналған Петри табақшасындағы әртүрлі тығыз қоректік орталар

Зертханалық сабақ № 15.

Микроорганизмдерді бөліп алу және өсірудің ерешеліктері бойынша есеп өткізу.

Зертханалық жұмыстың мақсаты: Бөліп алған бактерияларды бөліп алу, өсіру және зерттеу

Зертханалық жұмыстың міндеті: Зертханалық жұмыстар бойынша қорытынды жоба-есеп өткізу.

Кесте 2 - Бөліп алған микроорганизмдерді түрге дейін анықтауға қажетті кілттік белгілер

№	Микроорганизмдердің қасиеттері	Негізгі белгілері	Белгілердің болу болмауы
1	Клетка морфологиясы	Клетка пішіні мен мөлшері	
		Клетканың қозғалуы,	
		Клетка ішілік қосындылар (май түйіршіктері, волютин, күкіртті қосындылар және т.б)	
		Клеткалық дифференцирленуі (спора, капсула)	
2	Өсу сипаттамасы	Тығыз және сұйық қоректік орталарда өсуі	
		Колония морфологиясы	
3	Боялуы	Грам тәсілімен боялуы	
		Спорасының боялуы	
4	Физиологиясы	Температураға қатынасы	
		Молекулалық оттегіне қатынасы	
		Көмірсуларды пайдалануы	
		Антибиотиктерге төзімталдығы	
5	Биохимиясы	Амилазалық белсенділігі	
		Протеазалық белсенділігі (желатинді және казеинді ыдыратуы)	
		Аммиак түзуі	
		Индол түзуі	
		Ацетоин түзуі	
6	Өсіру әдістері		

Тапсырмалар:

1. Культуралардың физиологиялық-биохимиялық қасиеттерін зерттеу.
2. Зерттелетін штамды туыс және түрге дейін анықтау.

Зертханалық жұмыстар бойынша дайындалатын қорытынды есептің түрі

1. Жұмыстың аты және мақсаты
2. Зертханалық сабақтың жоспары мен оның сипаттамасы
3. Алынған нәтижелер мен оларды талдау
4. Қорытынды

Қолданылған әдебиеттер тізімі

1. Шигаева М.Х. Цзю В.Л. Микробиология , Алматы, «Казак университет», 2008 ,564с.
2. Мишустин Е.М., Емцев Е.Т. Микробиология. М., 2005, 391 с.
3. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.: МГУ, 2006, 458 с.
4. Березин В.Э Основы вирусологии. Учебное пособие. «Комплекс». Алматы, 2001, 129с.
5. Шигаева М.Х. Цзю В.Л. Систематика бактерий. Алматы. «Казак университет», 2008 ,124с.
6. Громов Б.В. Строение бактерий. Л., 1985, 192 с.
7. Готшалк Г.А. Метаболизм бактерий. М., 1982, 310 с. 1.
8. Мукашева Т.Д. Практические занятия по микробиологии. Алматы: Изд-во КазГУ, 1991.
9. Игнатова Л.В. Основы микробиологии Алматы. «Казак университет», 2008 ,124с.
10. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. М.: Изд-во МГУ, 2000.
11. Практикум по микробиологии / Под ред. А.Н.Нетрусова. - М.: Academia . 2005. 597с