

**«Биотехнология» мамандығының студенттеріне
«Медициналық микробиология» курсынан зертханалық сабақтарға әдістемелік
нұсқаулар**

Зертханалық сабақтың мақсаты: санитарлы – микробиологиялық зерттеу әдістерін танысу және санитарлы микробиологияның объектілерінің жалпы микробтық саны мен санитарлы - көрсеткіш микроорганизмдерін анықтау әдістерін игеру.

Зертханалық сабақ № 1-2.

Тақырыбы: Микробиология зертханасының жабдықталу ерекшеліктері және жұмыс істеу ережелері. Микробиологиялық зертханадағы қауіпсіздік ережелері. Микроорганизмдерді микроскоптаудың негізі әдістері. Микробиологиялық препараттар дайындау.

Тәжірибелік жұмыстың мақсаты – Микробиология зертханасында жұмыс істеу ережелерін, микроскоптаудың және микробиологиялық препараттар негізгі тәсілдерін зерттеу.

Міндеттері: - Микробиология зертханасында жұмыс істеу ережелерімен, микробиологиялық зертханадағы қауіпсіздік ережелерімен танысу.

- Микроскоптау тәсілдерімен танысу. Микроскоптың құрылысын, микроскоптаудың негізгі тәсілдерін игеру.

1. Микробиологиялық практикум кезінде жұмыс істеу ережелері. Микробиологиялық зертханадағы қауіпсіздік ережелері.

1. Микробиологиялық зертханада жұмыс істеу кезінде белгілі бір ережелер сақталуы қажет. Сабақ техникалық қауіпсіздік ережелерімен таныстырудан басталады. Зертханаға сыртқы киіммен, бас киіммен кіруге болмайды және бөгде заттарды кіргізуге тыйым салынады. Зертханалық сабаққа халат киіп қана кіру қажет. Бір орында жұмыс жасау қажет және бекінген құрал-жабдықтарды ғана қолдану керек.

Жұмыс істеу кезінде бактериологиялық ине және тұзақ от жалынында микроорганизмдермен жұмыс істеудің алдында және соңында қыздырылады.

Зертханада тамақ жеуге мүлдем болмайды. Сабақ аяқталған соң жұмыс орны дезинфекцияланады, қолданылған материалдар және басқа заттар лаборантқа тапсырылады, қолды сабынмен жуады, бөлмені желдетеді (30 мин), УК-шамдармен сәулелендіреді. Зерттеу қорытындылары жазба түрінде жазылынып алынады.

2. Микроскоп. Микроскоптаудың негізгі ережелері. Микроорганизмдерді микроскоптаудың негізі әдістері.

Микроорганизм клеткаларының морфологиясы және құрылысын зерттеу кезінде клеткаларының мөлшері микрометр (1 мкм = 0,001 мм), нанометр (1 нм = 0,001 мкм), ангстреммен (1 А° = 0,1 нм) өлшенетін клеткаларды өлшеу тек микроскоптың көмегімен ғана жүзеге асады. Микроскоп зерттелетін нысандарды жүздеген (жарық микроскопы) және ондаған мың (электронды микроскоп) есе үлкейтуді қамтамасыз етеді. Жарық микроскопында кескін нысан мен оның құрылым элементтерінің әр түрлі толқын ұзындықты жарықты таңдамалы жұтуының немесе нысан арқылы жарықтың өтуі кезінде жарық толқынының фазаларының өзгеруі нәтижелерінде айқындалады.

Микроскоп механикалық және оптикалық бөлімнен тұрады. Механикалық бөлім заттық стелі бар штативтен, тубустан, макро- және микрометриялық бұрандалардан тұрады.

Оптикалық бөлім жарықтандырғыш аппараттан, объективтен және окулярдан құралады. Объектив микроскоптың маңызды бөлімі болып табылады. Ол зерттелетін нысанның нақты үлкейтілген және қайтымды кескінін береді. Объектив бірнеше линзалардан тұрады. Ең маңыздысы - сыртқы (фронталды) линза, оның фокусты

арақашықтығына объективтің үлкейту күші тәуелді болып келеді. Фронталды линзаның қисықтығы жоғары болған сайын, фокусты арақашықтық қысқа болады да, ал объективтің үлкейтілуі жоғары болады. Объективтің үлкейту күші оның оправасында көрсетіледі.

3. Микробиологиялық препараттар дайындау.

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

Тірі клеткалардың препараттары. *«Жаншылған тамшы» препараты.* «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.

«Ілінген тамшы» препараты. Бұл препарат 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 бактериялды 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.

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

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

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

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

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

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

ЖҰМЫСТЫҢ БАРЫСЫ

1. Микробиология зертханасында жұмыс істейтін студенттер үшін қауіпсіздік ережелерімен танысу және зертханада жұмыс істеу ережелерімен танысу.
2. Микробиологиялық зертхана құрал-жабдықтарымен танысу.
3. Биологиялық микроскоп құрылысымен және онымен жұмыс істеу жолдарымен танысу.
4. «Жаншылған тамшы» және фиксирленген боялған препараттар дайындау.

Зертханалық сабақ № 3-5.

Тақырыбы: *Лабораториялық жабдықтар мен қызметкерлер қолдарынан алынған жуғындыларды санитарлы-бактериологиялық зерттеу.*

Кіріспе. Микробиологиялық лабораторияда жұмыс істеу ережелері. Лабораториялық жұмыстың мақсаты және объектілерімен таныстыру. Микроорганизм дақылдарымен жұмыс істеу. Микробиологиялық препараттарды дайындау әдістері, микроскоппен жұмыс істеу тәртібі.

Лабораториялық жабдықтарды мен қызметкерлер қолын санитарлы - микробиологиялық зерттеу.

Зерттелетін объектілер: Қызметкерлердің қолдарынан, есіктің тұтқасынан лабораториялық жабдықтардың үстінен жұғындар және лабораторияның ауасын бактериологиялық зерттеу.

Жұмыс мақсаты: Лабораториялық жабдықтар мен қызметкерлер қолдарынан алынған жуғындыларды санитарлы-бактериологиялық зерттеу

Жұмыстар:

- Жұғындылардығы микроб санын анықтау
- Ауаның микроб санын анықтау
- Үлгілердің коли-титр және коли-индексін анықтау
- Санитарлы – көрсеткіш микроорганизмдерін анықтау

Методикалық нұсқаулар

Қоректік орта және материал дайындау. Стерилизацияға дайындау (1 студентке есептегенде): Петри табақшаларын — 10 дана.; пробиркалар — 10; пипеткалар 1 — 2 мл-ге -10; 5— 10 мл-ге — 3; бөтелке немесе флакон (мөлшері 500 мл) — 1 — 2 дана.

Дайындау керек: 0,85%-ті NaCl ерітіндісін стерильді (құбыр суын немесе стерильді) — 150 — 200 мл; ЕПА стерильді 150 мл; жартылай сұйық глюкозамен орта 30 мл (3 пробиркаға құю 7—10 мл-ден); Эндо орта— 50 мл (дайын болған соң 2 — 3 стерильді Петри табақшасына құйып, қатқан соң табақшаларды қағазға орап, мұздатқышқа салу керек); КОДА ортасы немесе Кесслер ортасы — 33 мл концентренген ортаны (10 мл-ден 3 колбаға 150 — 250 мл-ге және 1мл-ден 3 пробиркаға), әр колбаға және пробиркаға мақта орналастырылады; Қалыпты концентрациялы КОДА немесе Кесслер ортасын 60 мл-ді (10 мл-ден 6 пробиркаға құю). Сабуро қоректік ортасы

Жұғындарды алу: Стерильденген дәкіден жасалған тампондармен зерттеу объектілерінің бетін бірнеше қайтара сүртіп, стерильді 0,85%-ті NaCl ерітіндісі бар колбаларға енгізіп 10-15 минут араластырады.

Жұғындылардағы микроб санын анықтау. Су үлгісі бар флакондардан қағаз қапқатарын шешіп, пробкаларын алады. Мойындарын фломбирлейді. Стерильді пипетка көмегімен суды жақсылап араластырады.

Әр үлгіден 2-ден кем емес 2 әртүрлі мөлшерге табақшаларда өсіп шыққан колония саны 30-дан 300 арасында болатындай егеді.

Егу үшін 0,1 мл зерттелетін суды стерильді сумен араластырады. Ондақ реттік сұйылту жасалады. Әр сұйылтуға стерильді пипетка қолданылады. Стерильді екі Петри

табақшаларына әр сұйылтудан 1 мл-ден тамызады. Сосын 10-15 мл ерітілген және 45-50С-қа дейін салқындатылған ЕПА-ға құйып, жақсылап араластырылады. Ортаны көлденең орналасқан жағдайда қатырады. Екпелерді 37 °С-қа өсу үшін қояды. Ашық қоймалардан алынған суды қатарынан екі екіден егеді. Біреуін 37 °С-та 1 күн ішінде инкубирлейді, ал екіншісін — 2 күнге 20 °С-қа қояды. Сосын ортаның бетінде және терең өсіп шыққан колония санын анықтайды (жай көзбен және 2-5 рет ұлғайтқан кездегі) және судың микроб санын анықтайды — 1 мл-гі мөлшер

Құрал-жабдықтар, ыдыс, реактивтер, қондырғылар

Стерильді Петри табақшасы; стерильді пробирка; стерильді пипетка; стерильді шөлмектер немесе 500 мл флакон; термотұрақты шыны стерильді стакандар; колба немесе 150 — 250 мл флакон; шыны таяқшалар; пинцет; бактериалды ілмек; лупа; барометр; фильтровальды қондырғы; мембранды фильтр № 3; фильтр қағазы; мақта; микроскоп; заттық және жабынды шынылар; 30 және 37 °С термостатқа.

Стерильді 0,85%-к NaCl ерітіндісі (немесе стерильді құбыр суы); Эндо ортасы; Кессера ортасы немесе КОДА ; МПА; полимиксті қышқылдық орта; сүт-ингибиторлы орта; 10% пептонды су; селенитті орта; висмут-сульфитті агар; Рассела ортасы; жартылай сұйық жаңа дайындалған глюкозасы бар диметил-N-фенилендиамин; жаңа дайындалған 3%-к КОН ерітіндісі; натрий гипосульфиті; Грам әдісімен бояудың реактивтері; фуксин; 70%-к этанол.

Бақылау сұрақтары;

1. Жұғындыларды санитарлы-микробиологиялық зерттеулері
2. Ауаны санитарлы-көрсеткіш микроорганизмдері

Зертханалық сабақ № 6-7.

Тақырыбы: Ауыз суды санитарлы-микробиологиялық зерттеу.

Ауыз суын санитарлы – микробиологиялық зерттеу. Санитарлы – көрсеткіш микроорганизмдерді анықтау. МАФАНМ – дің санын анықтау – 10 сағат.

Микробиологиялық зерттеулер әдісі бойынша 1 мл суда барлық микроорганизмдер санын анықтау және патогенді микроорганизмдерді анықтау. (салмонеллалар, лептоспирилалар, холерлі вибриондар және энтеровирустар). Соңғы анализ эпидемикалық көрсеткіштер арқылы жүзеге асады. Сонымен қатар, патогенді бактерияларды тікелей судан бөліп алу үшін арнайы зерттеулер қажет болғандықтан, судың фекалды ластану дәрежесін сандық баға бере алатын қосымша әдістер бар. (ІТТБ - ІТТБ, *E. coli*, энтерококктар, стафилококктар анықтау).

Зерттелетін сулар: ауыз суы – құбыр және бөтелкелердегі сулар., ашық су қоймалар, жүзу бассейндер, ағын сулар.

Жұмыс мақсаты: Құбыр судың санитарлы-бактериологиялық жағдайына баға беру.

Жұмыстар:

- Құбыр судың микроб санын анықтау
- Бөтелкелердегі судың микроб санын анықтау
- Ашыту әдісімен судың коли-титр және коли-индексін анықтау
- Судың энтракокка индексін анықтау

Методикалық нұсқаулар

Қоректік орта және материал дайындау. Стерилизацияға дайындау (1 студентке есептегенде): Петри табақшаларын — 10 дана.; пробиркалар — 10; пипеткалар 1 — 2 мл-ге -10; 5— 10 мл-ге — 3; бөтелке немесе флакон (мөлшері 500 мл) — 1 — 2 дана.

Дайындау керек: 0,85%-ті NaCl ерітіндісін стерильді (құбыр суын немесе стерильді) — 150 — 200 мл; ЕПА стерильді 150 мл; жартылай сұйық глюкозамен орта 30 мл (3 пробиркаға құю 7—10 мл-ден); Эндо орта— 50 мл (дайын болған соң 2 — 3

стерильді Петри табақшасына құйып, қатқан соң табақшаларды қағазға орап, мұздатқышқа салу керек); КОДА ортасы немесе Кесслер ортасы — 33 мл концентрленген ортаны (10 мл-ден 3 колбаға 150 — 250 мл-ге және 1мл-ден 3 пробиркаға), әр колбаға және пробиркаға мақта орналастырылады; Қалыпты концентрациялы КОДА немесе Кесслер ортасын 60 мл-ді (10 мл-ден 6 пробиркаға құю)

Су үлгісін алу.

Санитарлы-бактериологиялық зерттеу үшін суды 500 мл көлемінде алдын ала стерилденген пробкасы бар флаконға немесе бутылкаға құяды.

Ашық су қоймаларынан алынған, бассейндерден, бактардан және т.б үлгісін 10—15 см тереңдіктен алынады, ал тереңдігі аз жерлерден — түбінен 10—15 см жерден алынады..

Құбыр кранынан келесі әдіспен су үлгісін алады. Кранды спиртттелген тампонмен сүртіп, жандырады, сосын 10-15 мин-ке су жібереді. Сосын 400 мл- шамасындай су алады. Стерильді резиналы пробкамен жақсылап жауып, үстінен қағаз қалпағымен кигізеді. Хлорланған суға анализ жүргізгенде флаконға стерилизация алдында дехлоратор – 10 мг гипосульфит натридi қосады.

Судың үлгілеріне бактериологиялық зерттеулерді жүргізу алынғаннан кейін 2 сағаттан кеш болмауы керек. Асып кеткен жағдайда судың анализін 1-ден 6 °С температурада сақтап, 6 сағатқа дейін жүргізуге рұқсат беріледі.

Судың микроб санын анықтау. Су үлгісі бар флакондардан қағаз қақпақтарын шешіп, пробкаларын алады. Мойындарын фломбирлейді. Стерильді пипетка көмегімен суды жақсылап араластырады.

Әр үлгіден 2-ден кем емес 2 әртүрлі мөлшерге табақшаларда өсіп шыққан колония саны 30-дан 300 арасында болатындай егеді.

Егу үшін 0,1 мл зерттелетін суды стерильді сумен араластырады. Ондық реттік сұйылту жасалады. Әр сұйылтуға стерильді пипетка қолданылады. Стерильді екі Петри табақшаларына әр сұйылтудан 1 мл-ден тамызады. Сосын 10-15 мл ерітілген және 45-50С-қа дейін салқындатылған ЕПА-ға құйып, жақсылап араластырылады. Ортаны көлденең орналасқан жағдайда қатырады. Екпелерді 37 °С-қа өсу үшін қояды. Ашық қоймалардан алынған суды қатарынан екі екіден егеді. Біреуін 37 °С-та 1 күн ішінде инкубирлейді, ал екіншісін — 2 күнге 20 °С-қа қояды. Сосын ортаның бетінде және терең өсіп шыққан колония санын анықтайды (жай көзбен және 2-5 рет ұлғайтқан кездегі) және судың микроб санын анықтайды — 1 мл-гі мөлшер. Ішетін су жақсы болып саналады, егер 1 мл-де бактерия саны 100-ден аспаса; күдікті -100— 150; лас— 500 және оданда көп.

Судың коли-титр және коли-индексін анықтау. Коли-титр — БГКП анықталатын судың минималды мөлшері (мл), Коли-индекс — зерттелетін судың 1 мл-гі БГКП мөлшері, (дүниежүзілік және европа стандарты бойынша —100 мл-гі). Екі этапты ашу әдісі мен немесе мембранды фильтр әдісімен осы көрсеткіштер анықталады.

Ашу әдісі — Зерттелетін судың арнаулы мөлшеріне негізделген және ортада 37 °С өсіруге. Сосын Эндо тығыз ортаға бактерия егу, өсіп шыққан БГКП 1л судағы мөлшерін таблицамен салыстыру.

Ашық су қоймаларындағы суды зерттегенде және тазарту этаптарындағы суды 100,0; 10,0; 1,0 және 0,1 мл егеді. Су құбырындағы суды 3 мөлшерлі 100,0 мл, үш мөлшерлі 10,0 мл-дан және үш мөлшерлі 1,0 мл-ден.

Көрсетілген судың мөлшерін Кесслер немесе КОДА ортасы бар флакондарға немесе пробиркаларға орналастырады. Ыдыс түбіне поплывок немесе мақта салынады. 100,0 және 10,0 мл суды флакон және пробиркаларға қатынасы 10,0 және 1,0 мл концентрленген ортаға егеді; 1,0 және 0,1 мл суды пробиркаларға 10,0 мл қалыпты концентрациялы ортаға егеді. 24 сағатқа 37 °С-қа қояды. Қышқыл және газ түзілмей, флакон іші лайланбаса кері нәтиже алынып, зерттеу аяқталады.

Лайланған, газ және қышқыл болған жағдайда флаконнан ілмекпен Эндо ортаның бетіне 3-4 секторға бөліп егеді.

Егетін материалды бөлек-бөлек колония ала алатындай алу қажет. Табақшаларды 37 °С-қа 16—18 сағатқа қояды. Өспеген жағдайда және БГКП-ға сай емес колония табылған жағдайда (беті және шеті тегіс емес, көктер және т.б.), нәтиже дұрыс емес деп есептеледі. Эндо ортасында өсіп шыққан металикалық жылтыры бар немесе жоқ қызыл, ашық-қызыл, әлсіз-қызыл колонияларға (лактозо-оң колониялар) мазка жасайды, Грам әдісімен бояп, суда тіршілік ететін Pseudomonadaceae туысының грам теріс бактерияларын БГКП-дан дифференцирлейтін грамоксидазды тест қояды. Осы мақсатпен 2-3 бөлек колонияларды ортаның бетінен таяқша көмегімен алып, **диметил-•-п-фенилендиамин** ерітіндісіне матырылған фильтр қағазына штрихпен енгізеді. Теріс оксидазды тестте қағаз түсі өзгермейді, оң болса, 1 минут ішінде көк түске боялады.

Жұғындыда грам теріс таяқшалар және теріс оксидазды тест су анализінде және суды тазарту этаптарында және ашық су қоймаларында БГКП бар екені туралы дұрыс жауап береді.

Су құбырын зерттегенде оксидаза түзбейтін грамтеріс таяқшаларды ашу тестте зерттейді. Ілгекпен зерттелетін материалды жартылай сұйық 0,5% глюкозасы бар агарға егеді. 1 күн 37° С-қа қояды. Қышқыл және газ болған жағдайда оң нәтиже алынады. Анализ нәтижесін коли-индекс түрінде шығарады. Мөлшерін таблицамен анықтайды. Коли-индекс арқылы коли-титрді анықтайды.

Мембранды-фильтр әдісі. Бұл әдісте эндо қоректік ортасында 37° С температурада өсіп шыққан, мембраналық фильтрден өткізілген белгілі бір мөлшердегі суды анализдеу арқылы бактериялардың көлемін анықтау. Дифференцирленген өсіп шыққан колонияны санап және 1 л судағы ішек тақшаларының бактерия топтарын анықтау.

Құбыр суының жүйесін және артезиан скважинасындағы судың көлемін 333мл-де фильтрлейді. Ашық су қоймасындағы таза судың көлемін 100; 10; 1 және 0,1 мл-де, ал жай ғана ластанған суды — 0,1; 0,01 и 0,001 мл-де фильтрлейді.

Суды фильтрлеу үшін мембранды фильтрді №3 (диаметр пор 0,7 мкм) қолданады, оларды 80° С жылытылған дистилденген сумен шыны стаканға орналастырады және оттын әлсіз жалынында қайнағанға дейін қою керек. Фильтрді қайнату үш рет жүргізіледі, бірақ 110 мин. Біріншілік және екіншілік қайнатудан кейін суды төгіп тасталады. Соңғы қайнатылған суды төкпей және пайдаланғанға дейін фильтрді сонда қалдырады.

Жұмыс алдында Зейтц-тің фильтр аппаратын спиртпен сүртіледі. Вакуум-насосына байланысқан фильтр аппаратындағы воронкаға фильтрді орналастырады. Зерттеуді үлкен сұйылтуда жүргізіледі. Егу кезінде көлемі 1 мл немесе төмен 10 мл стерильді құбыр суында сұйылту жасайды, одан соң фильтрлейді. Процесс соңында Петри табақшасындағы Эндо қоректік ортасының бетіне фильтрді орналастырады. Бір табақшаға 3 — 4 фильтр араластырады. Фильтрі бар табақшаны 18 —24 с, 37 °С-та сақталады. Санау үшін 10 немесе 50-ден көп емес фильтрі бар колонияларды таңдап алынады. Есепке қызыл немесе қанық қызыл алынады, колония металды жылтыр немесе жылтырсыз. Одан әрі кесте толтырылады. Кестеде бөлінген ішек таяқшаларының бактерияларының аналогиялық ашу (бродильный) тәсілін сипаттау керек.

Энтерококктың индексін анықтау. Микробтың санымен және БГКП индексін анықтау әртүрлі көлемдегі суды қышқылдық немесе полимикспен бірге элективті ортаға егеді. Жоғарғы полимиксина, бөтен микроорганизмдердің өсуін төмендетеді. Ортаны термостатқа 37 °С температураға және 48 сағатқа қойылады.

Барлық қышқылды-элективті ортада егілген суды жоғарғы секторлы сүт-ингибиторлы ортада шығарады. Ортаны термостатқа аптаға қояды. Сүт-ингибиторлы ортада қара металды түсі бар колониялар өсіп шығады (*Streptococcus faecalis*), және кішкентай сұр түсті колония (*Streptococcus faecium*). Колонияларды микроскоптау кезінде

грам-оң бактериялар, тізбектеліп орналасқан диплококктар табылады. Энтерококктың соңғы жауабын таблицадан табуға болады.

Құрал-жабдықтар, ыдыс, реактивтер, қондырғылар

Стерильді Петри табақшасы; стерильді пробирка; стерильді пипетка; стерильді шөлмектер немесе 500 мл флакон; термотұрақты шыны стерильді стакандар; колба немесе 150 — 250 мл флакон; шыны таяқшалар; пинцет; бактериалды ілмек; лупа; барометр; фильтровальды қондырғы; мембранды фильтр № 3; фильтр қағазы; мақта; микроскоп; заттық және жабынды шынылар; 30 және 37 °С термостатқа. Стерильді 0,85%-к NaCl ерітіндісі (немесе стерильді құбыр суы); Эндо ортасы; Кессера ортасы немесе КОДА; МПА; полимиксті қышқылдық орта; сүт-ингибиторлы орта; 10% пептонды су; селенитті орта; висмут-сульфитті агар; Рассела ортасы; жартылай сұйық жаңа дайындалған глюкозасы бар диметил-N-фенилендиамин; жаңа дайындалған 3%-к КОН ерітіндісі; натрий гипосульфиті; Грам әдісімен бояудың реактивтері; фуксин; 70%-к этанол.

Бақылау сұрақтары;

3. Судың санитарлы-микробиологиялық зерттеулері
4. Судың санитарлы-көрсеткіш микроорганизмдері

Зертханалық сабақ № 8.

Тақырыбы: Ауаны санитарлы-микробиологиялық зерттеу.

Су және топырақ сияқты ауа микроорганизмдер тіршілік ететін орта болып саналады. Бактериялар көп мөлшерде ауаға шаң-тозаңмен түседі, олардың сандық және сапалық құрамы топырақ микрофлорасымен тығыз байланысты болып келеді. Микроорганизмдер ауада тіршілік еткенімен, ауа олардың көбею ортасы бола алмайды, яғни олар күн сәулесінің әсерінен тіршілігін жояды. Ауа микрофлорасы негізінен климаттық жағдайларға, жыл және тәулік мезгіліне, тұрғылықты жерлерге байланысты өзгеріп отырады. Жаңбырлы күнде микробтар шаңмен қоса топырақтың бетіне шөгіп, ауа тазарады. Ауаның жоғары қабаты микробтардан едеуір таза болып келеді. Адамдар көп жерлерде, ластанған аймақтардың ауасында микроорганизмдер көп мөлшерде кездеседі. Зерттеу міндеттеріне байланысты ауа микрофлорасын зерттеу кезінде түрлі тәсілдер қолданылады. Бөлмелердегі ауа ластануына баға беру үшін Кох тәсілі кең қолданылады. Ол үшін зерттелетін бөлмеге қатты қоректік орта құйылған Петри табақшаларын 5 минутқа ашық қалдырып, уақыт аяқталған соң табақшаның бетін жауып, термостатқа при 28 °С орналастырады. 2-3 тәуліктік инкубациядан соң ауа микрофлорасына сандық есептеу жүргізеді. Бөлме ауаларында көбінесе бактериялардың кок тәрізді формалары, оның ішінде *Sarcina flava*, споралы таяқшалар, зең саңырауқұлақтары кездеседі. Ауа микрофлорасының 1 м³ ауадағы ЖМС және СКМ санын Омелянский формуласы бойынша анықтайды.

Зертханалық сабақ № 9 – 12.

Тақырыбы: Қоғамдық асханаларды және асхана құрал – жабдықтарының жұмындыларында санитарлы – көрсеткіш микроорганизмдерді анықтау. МАФАНМ – дің санын анықтау. Ет және ет өнімдерін санитарлы –микробиологиялық зерттеу.

Ет өнімдерін санитарлы – микробиологиялық зерттеу. Шұжық өндірісін санитарлық бақылау. Етте микроорганизмдердің дамуы әртүрлі факторларға тәуелді болады: Температураның әсері. Осмос қысымының әсері. Орта реакциясының мәні. Еттің

бұзылуының кең тараған түрі: еттің шіріуі (белоктардың ыдырауы), еттің зең басыуы, еттің қараюуы, еттің пигментациялануы, еттің шырыштануы.

Еттегі микроорганизмдердің таралуы әртүрлі факторларға байланысты;

1. Температура әсері
2. Осметикалық қысымның әсері
3. Органың реакциясының маңызы

Шұжық өндірісі- ет өнімі, қосымша термикалық өңдеусіз тағам ретінде қолдануға арналған. Сондықтан шұжықты дайындау процессіне және дайын өнімді санитарлық талаптан өтуде қатаң талап қойылады. Олар келесі топтармен анықталады СПМ;

1. БГКП (колиформы)
2. Сульфитредуцирленген кластрид
3. Алтын түсті стафилококк
4. Сальмонелла

Жұмыстың мақсаты;

Ет өнімдерінің жағдайына санитарлы-бактериологиялық баға беру

Тапсырмалар;

-ет өнімінің микробтық санын анықтау

-ашыту әдісімен ет өнімінің коли-индексін анықтау

-тағам өнімдеріндегі сальмонелла және потогенді вибриондардың болуын зерттеу тәсілдері

Методикалық нұсқаулар

Қоректік орта және материал дайындау. Стерилизацияға дайындық (1 студентке есептегенде): Петри табақшасы — 10 шт.; пробирка— 10 ; пипетка 1 — 2 мл -10-ге ; 5— 10 мл-ге — 3; бөтелке немесе флакон (мөлшері 500 мл) — 1 — 2 дана

Дайындау керек: 0,85%-ті NaCl ерітіндісін стерильді (құбыр суын немесе стерильді) — 150 — 200 мл; ЕПА стерильді 150 мл; жартылай сұйық глюкозамен орта 30 мл (3 пробиркаға құю 7—10 мл-ден); Эндо орта— 50 мл (дайын болған соң 2 — 3 стерильді Петри табақшасына құйып, қатқан соң табақшаларды қағазға орап, мұздатқышқа салу керек); КОДА ортасы немесе Кесслер ортасы — 33 мл концентрленген ортаны (10 мл-ден 3 колбаға 150 — 250 мл-ге және 1мл-ден 3 пробиркаға), әр колбаға және пробиркаға мақта орналастырылады; Қалыпты концентрациялы КОДА немесе Кесслер ортасын 60 мл-ді (10 мл-ден 6 пробиркаға құю), әр пробиркаға мақтаны орналастырамыз. Сальмонеллаларды анықтау үшін натрий селенитті қоректік ортасы және кластридиялар мен стафилококктар үшін Вильсон – Блэра мен сүтті – тұзды қоректік ортасы дайындалады (сәйкесінше).

Ет және ет өнімдерінің үлгісін алу. Санитарлы-бактериологиялық зерттеу үшін еттің беткі аймағы 10 см болатын, бастапқы қалыңдығы сақталған бөлшек алынады, ал шұжықтан ұзындығы 15 см бөлінділер алынады. 20г ет үлгісін 80 мл стерильді 0,85%-к NaCl ерітіндісіне (немесе стерильді құбыр суына) енгізіп, 10-15 минут шайқайды. Осы алынған бастапқы субстраттан қажетті реттік сұйылтулар жасап, қоректік орталарға егеді.

Ет үлгілеріне бактериологиялық зерттеулерді жүргізу алынғаннан кейін 2 сағаттан кеш болмауы керек. Асып кеткен жағдайда еттің анализін 1-ден 6 °С температурада сақтап, 4 сағатқа дейін жүргізуге рұқсат беріледі.

Ет өнімдерінің жалпы микробтық санын (ЖМС) анықтау;

Ет үлгілерінен заттақ шынығы таңбалау әдісімен бекітілген, Грам әдісімен боялған препарат дайындап, еттің микробиологиялық тазалығына және балғындығына баға береді.

Сосын жоғарыдай дайындалған еттің әр үлгісінен 2-ден кем емес 2 әртүрлі мөлшерге табақшаларда өсіп шыққан колония саны 30-дан 300 арасында болатындай егеді.

Егу үшін 0,1 мл зерттелетін етті ондық реттік сұйылту жасалады. Әр сұйылтуға стерильді пипетка қолданылады. Стерильді екі Петри табақшаларына әр сұйылтудан 1 мл-ден тамызады. Сосын 10-15 мл ерітілген және 45-50° С-қа дейін салқындатылған ЕПА-ға

кұйып, жақсылап араластырылады. Ортаны көлденең орналасқан жағдайда қатырады. Екпелерді термостатқа 37 °С-қа өсу үшін қояды. Сосын ортаның бетінде және терең өсіп шыққан колония санын анықтайды (жай көзбен және 2-5 рет ұлғайтқан кездегі) және микроб санын анықтайды — 1 мл-гі мөлшер. Ет жақсы болып саналады, егер 1 мл-де бактерия саны 30-ден аспаса; күдікті -30-300; лас— 300 және оданда көп.

Ет өнімдерінің коли-титр және коли-индексін анықтау.

Коли-титр — БГКП анықталатын судың минималды мөлшері (мл), Коли-индекс — зерттелетін ет үлгісінің 1 мл-гі БГКП мөлшері, (дүниежүзілік және еуропа стандарты бойынша —100 мл-гі). Екі этапты бродильді әдіспен немесе мембранды фильтр әдісімен осы көрсеткіштер анықталады

Ашу әдісі — зерттелетін судың арнаулы мөлшеріне негізделген және ортаны 37 °С өсіруге. Сосын Эндо тығыз ортаға бактерия егу, өсіп шыққан БГКП 1л судағы мөлшерін таблицамен салыстыру.

Ет және ет үлгілерін зерттегенде 100,0; 10,0; 1,0 және 0,1 мл егеді.

Көрсетілген еттің мөлшерін Кеслер немесе КОДА ортасы бар флакондарға немесе пробиркаларға орналастырады. Ыдыс түбіне газдың бөлінгенін көрсететін шыны және мақта салынады. 100,0 және 10,0 мл ет үлгісін флакон және пробиркаларға қатынасы 10,0 және 1,0 мл концентрленген ортаға егеді; 1,0 және 0,1 мл суды пробиркаларға 10,0 мл қалыпты концентрациялы ортаға егеді. 24 сағатқа 37 °С-қа қояды. Қышқыл және газ түзілмей, колбадағы қоректік орта лайланбаса кері нәтиже алынып, зерттеу аяқталады.

Лайланған, газ және қышқыл болған жағдайда колбадан Эндо қоректік ортаның бетіне 3-4 секторға бөліп егеді.

Егетін материалды бөлек-бөлек колония ала алатындай алу қажет. Табақшаларды 37 °С-қа 16— 18 сағатқа қояды. Өспеген жағдайда және ИТТБ ға сай емес колония табылған жағдайда (беті және шеті тегіс емес, көктер және т.б.), нәтиже дұрыс емес деп есептеледі. Эндо ортасында өсіп шыққан металл тәрізді жылтыры бар немесе жоқ қызыл, ашық-қызыл, әлсіз-қызыл колонияларға (лактозо оң колониялар) жұғынды жасайды, Грам әдісімен бояп, етте кездесетін Pseudomonadaceae туысының грам теріс бактерияларын ИТТБ-дан дифференцирлейтін оксидазды тест қояды. Осы мақсатпен 2-3 бөлек колонияларды ортаның бетінен таяқша көмегімен алып, **диметил-• п-фенилендиамин** ерітіндісіне матырылған фильтр қағазына штрихпен енгізеді. Теріс оксидазды тестте қағаз түсі өзгермейді, оң болса, 1 минут ішінде көк түске боялады.

Препаратта грамтеріс таяқшалар және оксидазды тесті теріс ет анализінде ИТТБ бар екені туралы оң жауап береді.

Етті зерттегенде оксидаза түзбейтін грам теріс таяқшаларды бродильді тестте зерттейді. Бак. тұзақпен зерттелетін материалды жартылай сұйық 0,5% глюкозасы бар агарға егеді. 1 күн 37° С-қа қояды. Қышқыл және газ болған жағдайда оң нәтиже алынады. Анализ нәтижесін коли-индекс түрінде шығарады. Мөлшерін кестемен анықтайды. Коли-индекс арқылы коли-титрді анықтайды.

Ет өнімдерінде патогенді микроорганизмдерді тікелей табу әдісі.

Ет және ет өнімдерінде патогенді микроорганизмдер ретінде сальмонелалар, стафилококктар мен клостридиялар анықталады.

Сальмонеллаға ет өнімің зерттеуде селенитті ортаға егеді. Ортаны 37 °С температурада 18-20 сағатқа дақылдайды. Қорытындысын протоколда пептонды судағы және селенитті ортадағы өсу бағытын белгілейді. Колбадағы селенитті ортаның диффузды өсуіне байланысты, Петри табақшаларына Эндо және висмут-сульфитті агарды селенитті ортаға 2-3 табақшаларға қайта егеді. Ортаны 37 °С температурада 18-20 сағатқа термостатқа қойылады.

Сальмонеллар висмут-сульфатты агарда қара колония сұрғылт металдық немесе жасыл колония (қараю ортасы колония астынын) туғызады. Күдік тудыратын колония

(қараю ортасы колония астынын). Күдік тудыратын колония (4 және 5 турлері) Рассел қоректік ортасына егіп немесе Олькеницкалы зәр үшқантты агарда. Содан зерттеулерді қарапайым кестемен жүргізіледі; қозғалғыштығын анықтау, поливалентты агглютинациясымен және поливалентті сальмонеллезді сүт сары суы, фаготипирлеу апырқылы да анықтайды.

Құрал-жабдықтар, ыдыс, реактивтер, қондығылар;

Стерильді Петри табақшасы; стерильді пробирка; стерильді пипетка; стерильді шөлмектер немесе 500 мл флакон; термотұрақты шыны стерильді стакандар; колба немесе 150 — 250 мл флакон; шыны таяқшалар; пинцет; бактериалды петля; лупа; барометр; фильтровальды қондырғы; мембранды фильтр № 3; фильтр қағазы; мақта; микроскоп; заттық және жабынды шынылар; 30 және 37 °С термостатқа.

Стерильді 0,85%-к NaCl ерітіндісі (немесе стерильді құбыр суы);Эндо ортасы; Кесслер ортасы немесе КОДА ; МПА; полимиксті қышқылдық орта; сүт-ингибиторлы орта; 10% пептонды су; селенитті орта; висмут-сульфитті агар; Рассела ортасы; жартылай сұйық жаңа дайындалған глюкозасы бар диметил-N-фенилендиамин; жаңа дайындалған 3%-к КОН ерітіндісі; натрий гипосульфиті; Грам әдісімен бояудың реактивтері; фуксин; 70%-к этанол.

Бақылау сұрақтары;

1. Ет және ет өнімдерінің санитарлы-микробиологиялық зерттеулері
2. Ет өнімдерінің санитарлы-көрсеткіш микроорганизмдері
3. Судағы патогенді микроорганизмдердің индикация тәсілі

Зертханалық сабақ №13 - 15.

Тақырыбы: *Микроорганизмдерге физико-химиялық факторлардың әсерін зерттеу. Ультра күлгін сәулелердің және антибиотиктердің микроорганизмдерге әсері.*

Жұмыстың *мақсаты* - ультра күлгін сәулелердің және антибиотиктердің микроорганизмдерге әсерін зерттеу.

Зертханалық жұмыстың *міндеті*- ультра күлгін сәулелердің микроорганизмдерге әсерін зерттеу және антибиотиктердің әсеріне микробтардың сезімталдылықтарын зерттеу әдістерімен танысу.

1. Ультра күлгін сәулелердің микроорганизмдерге әсері.

Электромагнитті толқындар түрінде кеңістікте таралатын энергия сәулелік энергия деп аталады. Оның спектрлері микробтарға түрліше әсер етеді. Активті түрде әсер ететін сәуле микробтарға леталды немесе мутагенді әсер береді. Ол микробтың табиғатына және сәулелену дозасына байланысты болады.

Зертханалық жағдайда микроорганизмдерге УК сәулелердің әсері төмендегі жолмен зерттеледі. ЕПА ортасы бар Петри табақшасына бактерия суспензиясын тамызып, орта бетіне біркелкі етіп, Дригальский шпателімен жаяды, газонның ортасына стерилді трафарет қойып, Петри табақшасының бетін ашып, 20-30 мин кварцты шамның астына қояды. Трафаретті алып тастап, табақшаны жабады да, 28 °С термостатқа қойып, инкубациялайды. Тәжірибенің нәтижесін 5-7 тәуліктен соң алады. Микроорганизмдердің өсуі трафарет қойылған жерде ғана байқалып, қалған аймақтар таза болып келеді. Яғни ультра күлгін сәуле микробтарға кері әсерін тигізеді.

2. Антибиотиктердің микроорганизмдерге әсері.

Көптеген микроорганизмдер өздерінің тіршілігінің нәтижесінде басқа микроорганизмдерге немесе вирустарға қатысында, олардың өсуін тежейтін немесе оларды өлтіретін жоғары физиологиялық белсенділікке ие арнайы өнімдер бөледі. Олар **антибиотиктер** деп аталады. Жалпы биологиялық ұларға қарағанда антибиотиктер

белгілі бір топ немесе түр микроорганизмдеріне ғана өздерінің әсерін тигізе алады. Микроорганизмдердің антибиотикалық қасиеттерін анықтайтын әдістер әр түрлі. Олардың көбісі агарланған ортаға антибиотиктердің сіңуі және тест-организм өспейтін ортада ашық аймақтар түзе алу қасиеттеріне негізделген. Антибиотикалық белсенділікті перпендикулярлы сызықтар және агарлы блоктар әдістерімен анықтайды.

Перпендикулярлы сызықтар әдісі. Қоректік ортаға Петри табақшаларына антибиотикалық заттардың өндірушілерін сызықпен егеді. Сызықты Петри табақшасының диаметрі бойынша жүргізіп егеді. Өндіруші өсіп шыққан соң және агардың қалыңдығына өтетін антибиотикалық заттар түзілгеннен кейін оның сызығына перпендикулярлы тест-организмді Петри табақшасының жиегінен бастап егеді. Тест-организмді егу үшін стерилді құбыр суында дайындалған микроорганизмнің қою суспензиясын пайдаланады. Табақшаларды 28-30°C термостатқа тест-организмнің өсу жылдамдығына байланысты 2-8 тәулікке орналастырады. Егер антибиотик тест- организмге әсер ететін болса, онда тест-организмнің өсуі өндірушінің сызығынан алшақ байқалады. Бұл қашықтық неғұрлым үлкен болған сайын, зерттелетін өндіруші түзетін антибиотикалық затқа тест-организм соғұрлым сезімтал болады.

Агарлы блоктар әдісі. Антибиотик өндірушінің және тест-организмнің дамуы үшін әр түрлі қоректік орталар қолданылады. Актиномицеттердің антибиотикалық қасиеттерін анықтау үшін өндірушіні құрамы мынадай ортада өсіру ұсынылады (г/л): глюкоза - 30,0; KNO_3 - 5,5; $MgSO_4$ - 0,5; $NaCl$ - 1,0; K_2HPO_4 - 0,4; $ZnSO_4$ - 0,002; $FeSO_4$ - 0,002; агар - 25,0; дистилденген су; pH 7,1-7,2. Ортаны 0,5 атм залалсыздандырады және стерилді Петри табақшаларына құяды. Агар қатқаннан кейін антибиотикалық зат өндірушіні жаппай қоректік ортаның бетіне егеді. Ол үшін актиномицеттің спораларын тұзақпен агарлы пластинкаға салады да, шпателдің көмегімен қоректік ортаның бетіне тұтастай жайып, 28-30°C термостатқа 8-10 тәулікке орналастырады. Содан кейін стерилді тескіштің көмегімен актиномицеттер өскен агарлы пластинкаларды блоктарға бөліп, тест- организм егілген қоректік ортаға, мысалы, *ЕПА* ауыстырады. Агарлы блоктарды бір-бірінен бірдей 1,5-2,0 см қашықтықта орналастырып, агарлы пластинкаға тығыз етіп жабыстырады. Антибиотикалық заттардың қоректік ортаға жақсы шығуы үшін тест-организм егілген агарлы пластинканы алдын ала тескіштермен тесіп қойып, сол жерлерге актиномицеттер өсірілген агарлы пластинкадан алынған блоктарды орналастыруға болады. Тест-организмі бар бір Петри табақшасына осылайша бірнеше өндірушілерді отырғызуға болады. Табақшаларды бір сағаттай бөлме температурасында ұстайды да, сосын тест-организмнің дамуы үшін қолайлы температурада термостатқа бірнеше тәулікке орналастырады. Егер тест- организм өндірушінің антибиотикалық затына сезімтал болса, дақылданғаннан кейін агарлы блоктың айналасында оның өсу аймақтары байқалмайды. Антибиотик көп бөлінген сайын және ол белсенді болған сайын, тест-организмнің өсуі байқалмайтын аймақтардың диаметрі соғұрлым үлкен болады. Осы антибиотикалық затқа сезімтал емес тест-организм ортаның бүкіл бетінде және өндірушінің блоктарының жанынан да өсе береді.

ЖҰМЫСТЫҢ БАРЫСЫ

1. УК сәулеленуге ұшыраған Петри табақшаларын зерттеу.
2. Микроорганизмдерге антибиотиктердің әсерін анықтау, микробтардың тежелу аймақтарын өлшеп, нәтижелерін кестелерге енгізу. Қорытынды жасау.