

Лекция 3

Микробиологиялық талдау әдістерінің жалпы сипаттамасы

Микробтық биотехнологиядағы микробиологиялық зерттеулер жоғары сапалы өнім шығарудың, олардың қауіпсіздігі мен тұтынушылардың денсаулығы үшін қауіпсіздігін қамтамасыз етудің негізі болып табылады.

Микробиологиялық зерттеудің негізгі міндеті шикізаттың, қосалқы материалдардың, жабдықтардың және өндірілген өнімнің жалпы микробиологиялық ластануы туралы ақпаратты мүмкіндігінше тезірек, дәлірек, арзанырақ, сонымен қатар техникалық зиянды микроорганизмдер арасынан санитарлық-көрсеткіштік және патогендік микрофлораның болуы туралы ақпаратты алу болып табылады.

Микробиологиялық талдаудың екі негізгі түрі бар:

- Сапалық;
- Сандық.

Бірінші жағдайда микроорганизмдердің **сапалық** сипаттамаларын (морфологиялық, тинкториалды, культуралды қасиеттері, өміршеңдігі және т.б.) бағалау әдістері қолданылады. Шартты түрде оларды **макроскопиялық** және **микроскопиялық** деп бөлуге болады:

- ❖ **макроскопиялық әдістер** ауыл шаруашылығы өнімдерінің, шикізат және тамақ өнімдері микробиологиялық бұзылуының көзбен бақылау, иіс, дәм, тактильді белгілерін сенсорлық талдауға негізделген;
- ❖ **микроскопиялық әдістерге** микроскопияның көмегімен ластаушы қоздырғыштарды анықтау, микроорганизмдердің морфологиялық, тинкториалды қасиеттерін зерттеу, өнімнің балғындығын бактериоскопиялық талдау және т.б.

Сандық микробиологиялық зерттеу талданатын объектілердің үш негізгі аспектілері туралы ақпарат алуға бағытталған:

- микроорганизмдердің жалпы саны (биомассасы);
- микроорганизмдердің түр құрамы мен сандық құрамы;
- жасушалардың физиологиялық және биохимиялық белсенділігі.

Микробиологиялық зерттеу әдістері өлшеу дәлдігіне байланысты:

- салыстырмалы қателігі 20%-дан аз сандық әдістерге,
- жартылай сандық – 20-40%,
- сапалық – 40%-дан жоғары болып бөлінеді (сурет 1).

Микробиологиялық зертеудің барлық әдістері шартты түрде:

- Тікелей;
- Жанама.

Тікелей әдістер микробиологиялық көрсеткіштердің абсолютті мәндерін береді. Оларға:

- микроскопиялық әдістер,
- микроорганизмдерді өсіру әдістері,
- аралас әдістер (микрокультивирлеу).

Микроскопиялық әдістер - тірі немесе өлген микроорганизмдерді боялған немесе боялмаған түрдегі зерттеулер үшін қолданылады. Бұл әдісті қолдана отырып, микроорганизмдердің төмендегідей морфологиялық қасиеттерін зерттеуге болады:

- мөлшері, пішіні;
- жасушалардың салыстырмалы орналасуы;
- қозғалу қабілеті;
- жасуша қабырғасының құрылымдық ерекшеліктерін көрсететін тинкторлық қасиеттері (бояғыштармен боялу);
- спора және капсула түзілуін;
- жасуша қосындыларының болуын;
- жасушалардың мөлшерін өлшеу үшін.

Микроорганизмдерді микроскопиялық бақылау әдістері жылдам, анық, қолжетімді.

Сандық микроскопия әдістерінің ішінде мыналар белгілі:

- санау камераларындағы жасушаларды санау әдісі,
- Виноградский-Брида әдісі,
- Королев әдісі және т.б.

Сұйық және агар қоректік орталарда микроорганизмдерді **егу және өсіру әдістері** қарапайым және арнайы жабдықты қажет етпейді. Микробиологиялық тәжірибеде олар микроорганизмдердің таза дақылдарын бөліп алу және сақтау, микроорганизмдердің түрлік құрамын талдау, жасушалардың культуралды қасиеттерін (тығыз, сұйық және жартылай сұйық қоректік орталарда өсу сипаты, түсі, пішіні, колониялардың мөлшері, құрылымы және консистенциясы, микроорганизмдер көбейетін қоректік орталардың құрамы) зерттеу үшін кеңінен қолданылады.

Микроорганизмдерді **егу және өсіру әдістері** сандық санау үшін де кеңінен қолданылады. Олар бір бөлінетін жасушаның болуын тіркеуге мүмкіндік береді, дегенмен олар ұзақ (3-5 күн), еңбекті қажет етеді, реагенттерді көп тұтынуды қажет етеді, жеткілікті экономикалық тиімді емес және барлық микроорганизмдерге қолданылмайды.

Аралас әдістер микроскопиялық, культуралық және басқа әдістердің артықшылықтарын біріктіру және микробиологиялық талдаудың ұзақтығын қысқарту үшін қолданылады. Оларға агарлы қабықшалардағы, мембраналық сүзгілердегі жасуша микрокультура, биомассаны өлшеу арқылы анықтау және т.б әдістері.

Жанама әдістер – микробиологиялық көрсеткіштердің салыстырмалы мәндерін береді және мыналарды қамтиды:

- биофизикалық (биокалориметрия, импедансометрия, флюориметрия, хемилюминометрия және т.б.),
- биохимиялық (АТФ-метрия, энзимометрия, липидометрия, микроорганизмдердің тіршілігі нәтижесінде түзілетін өнімдерді талдау және т.б.),
- биологиялық (физиологиялық, иммунологиялық (серологиялық), биотестілеу және т.б.) әдістер.

Бұл зерттеу әдістері жылдам, өнімділігі жоғары, реагенттер аз немесе мүлдем жоқ, бірақ көп жағдайда олар арнайы жабдықты, арнайы дайындалған қызметкерлерді қажет етеді және олардың көрсеткіштерін абсолютті мәндерге түрлендіру үшін калибрлеу қажет етеді.

Соңғы уақытта микробиологияда классикалық микробиологиялық әдістерді қолданғанда бірнеше аптаның орнына бірнеше сағат ішінде микроорганизмдердің түрлерін анықтауға мүмкіндік беретін молекулалық-генетикалық талдаудың әдістері (ПТР талдау, молекулалық зонд әдісі және т.б.) кеңінен қолданылуда.

Жанама әдістер экономикалық тиімді және микробиологиялық талдаулардың көбірек жүргізілуіне байланысты өзін-өзі тез ақтайды, сондықтан олар кеңінен қолданылатын микроорганизмдерді өсіру әдістерін тиімді алмастырады.

Сапалы микробиологиялық талдау және микроорганизмдердің морфологиялық қасиеттері

Жарық микроскопия, микроорганизмдерден препараттарды дайындау әдісі және олардың морфологиялық қасиеттері

Жарық микроскопиясы – микроорганизмдерді тікелей бақылау және олардың қасиеттерін зерттеу үшін кеңінен қолданылатын әдіс.

Жарық микроскопиясының мынадай түрлері бар:

- өткен жарықтағы;
- шағылған жарықтағы.

Өткен жарықтағы жарық микроскопиясының алуан түрлі түрлері бар:

- жарық өрісте;
- қараңғы өрісте;
- фазалық контраст;
- флуоресцентті;
- поляризациялау;
- интерферометриялық және т.б.

Лабораториялық тәжірибеде ең жиі қолданылатыны - **жарық өрістегі микроскопия.**

1. Жарық микроскопының қолданылуы мен құрылғысы

Жарық микроскопы (2-сурет) микроорганизмдердің мөлшерін, пішінін және құрамын, микроорганизмдердің морфологиялық қасиеттерін сапалық және сандық талдауға арналған.

Жарық микроскопы үш негізгі бөліктен тұрады:

1. механикалық,
2. оптикалық
3. электрлік.

Микроскоптың электрлік бөлігіне жарық көзі, кабелі бар вилкасы және ажыратқыш кіреді.

Микроскоптың **механикалық бөлігінде** келесі элементтер бар:

- табан,
- микроскоптың барлық бөліктерін алып жүретін штатив,
- препараттарды орналастыруға арналған қысқыш құрылғысы бар зат үстелі,
- конденсатор кронштейні,
- түтік ұстағыш және окулярларды тасымалдайтын бинокулярлы түтік және ішкі айналмалы линзалар жүйесі,
- ауыстырылатын линзалары бар револьвер.

Механикалық бөлікке сонымен қатар микроскопты макро және микро реттеуге арналған бұрандалар, құлыптау бұрандалары, конденсатор бұрандасы, жарық ағынының қарқындылығын өзгертуге арналған бұрандалы ирис диафрагмасы кіреді.

Микроскоптың оптикалық бөлігі 10x немесе 15x үлкейтетін окулярлардан, 10x, 20x, 40x, 90x немесе 100x үлкейтетін объективтерден, сәулелену көзінен шашыраңқы жарық ағынын препаратқа біркелкі жарықтандыру үшін параллельді сәуле жарық ағынын жинайтын линза жүйесінің конденсаторынан тұрады. Микроскоптың оптикалық бөлігіне бақылаушыға ыңғайлы бұрышқа өткізетін үлгі арқылы өтетін жарық ағынын айналдыратын түтік призмасы да бар.

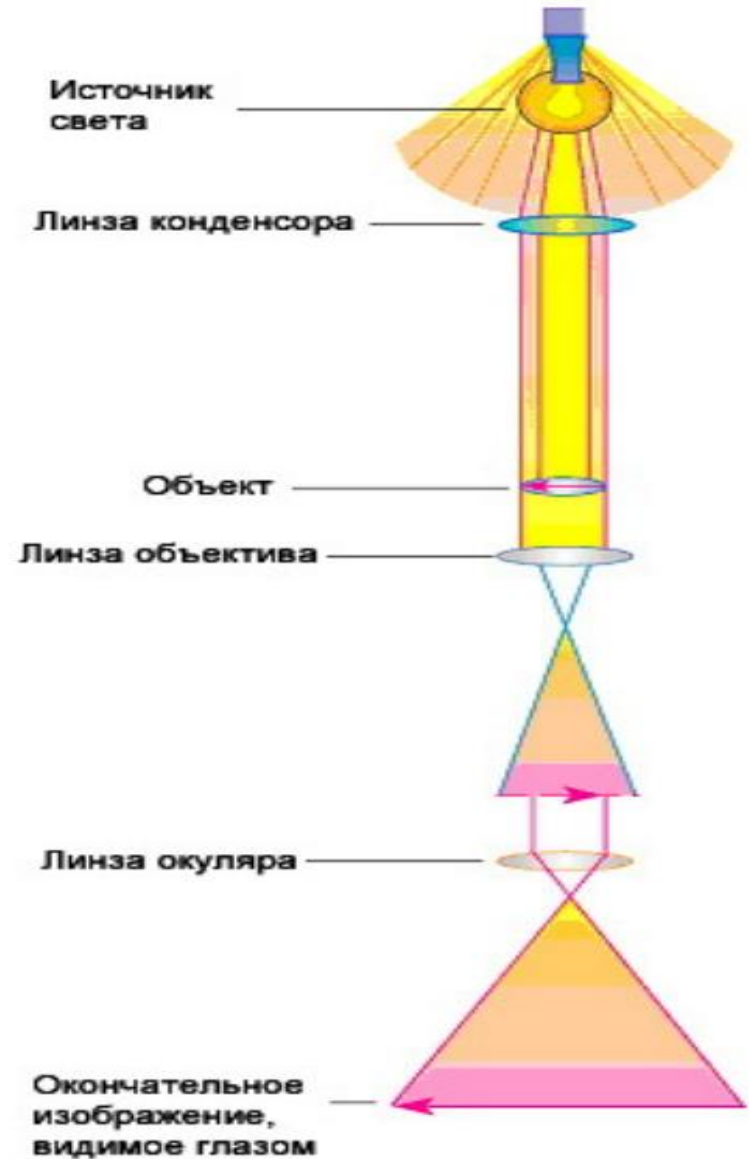
Сурет 2. Жарықты микроскоптың құрылысы



Жарық өрісті микроскопия боялған препараттарды зерттеуге арналған. Бейне зерттелетін боялған нысанның әртүрлі бөліктерінің жарықты жұту дәрежесінің айырмашылығына байланысты жасалады (2-сурет). Жарық сәулесі боялған препарат арқылы өткенде, жарық қарқындылығы өзгереді, яғни жарық толқынының амплитудасы өзгереді. Мұндай амплитудалық өзгерістерді адам көзімен оңай анықтайды.

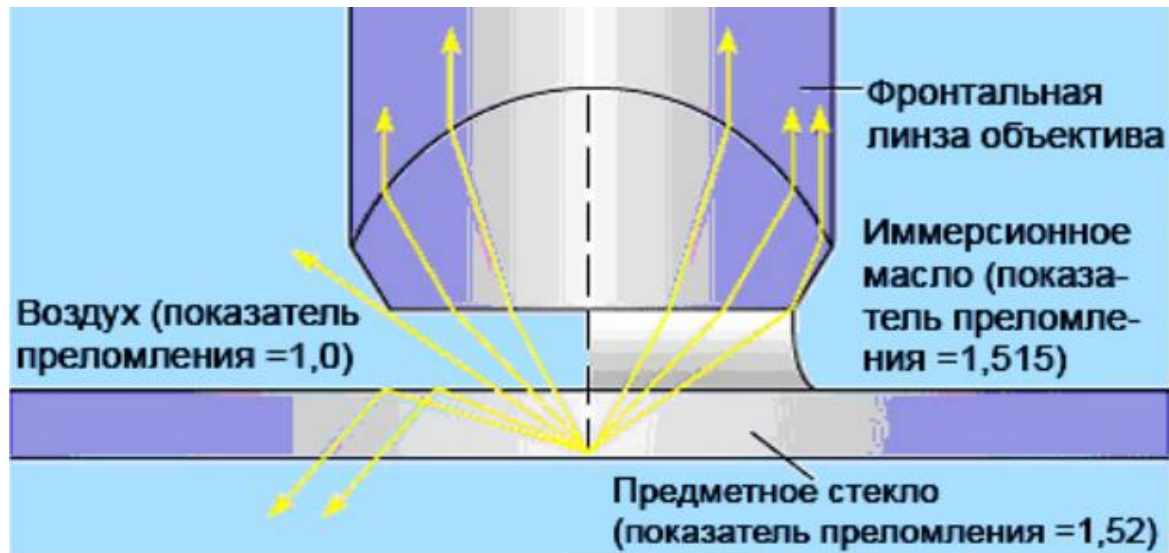
Ұзын фокустық арақашықтықтағы құрғақ линзаны пайдаланған кезде айнадан конденсатор арқылы линзаға түсетін жарық сәулелері сыну көрсеткіштері бойынша ерекшеленетін біртекті емес орталар арқылы өтеді. Сәулелердің бір бөлігі ауытқиды және линзаға кірмейді. Нәтижесінде көру аймағы жақсы жарықтандырылмайды. Көлемі үлкен микроорганизмдерді (10 мкм-ден астам) зерттеу үшін микробиологияда төмен үлкейтетін құрғақ линзасы бар қарапайым жарық микроскопиясы сирек қолданылады.

Жарық көру аймағында бақылауға арналған жарықты микроскоптың сызбасы



Микроскоптың көруін арттыру және кішірек микроорганизмдерді зерттеу үшін иммерсиялық микроскопия қолданылады. Фокустық қашықтығы 1,5–3 мм («ОИ» («ИО») немесе «МИ» («ИМ») белгіленген), сақиналы қара немесе ақ сызығы бар иммерсиялық линза сыну көрсеткіші әйнек шыныға жақын бір тамшы майға (кедр, шабдалы, олар болмаған жағдайда - вазелинмен) тамызады.

Иммерсиялық май шынымен бірге сыну көрсеткішінің арқасында линзаға түсетін жарық сәулелерінің азайтпайды (3-сурет). Бұл жағдайда препаратқа түсетін жарық шоғы шашырап кетпейді және бағытын өзгертпей батыру объектісіне түседі де микроскоптың көрсетуі артады.



Кейде конденсатор линзасының үстіне иммерсиялық сұйықтықтың екінші тамшысы қойылады. Сирек жағдайларда сулы иммерсия қолданылады, бұл жағдайда «ВИ» линза орнатылады.

Сурет 3. Иммерсиялық жүйедегі сәуленің өту жолының сызбасы

Микроскоптың үлкейтуі объективті линзаның үлкейтуінің окулярдың үлкейтуіне тең.

- ✓ Құрғақ линзалар 8, 10, 20, 40,
- ✓ иммерсиялық линзалар - 90, 100.
- ✓ Окулярлар 7, 10, 12, 15 үлкейтеді.
- ✓ Кәдімгі жарық микроскопы 100-400 есе, иммерсиялық микроскоп - 1000 рет үлкейтеді.

Микроскоптың сапасы үлкейту дәрежесіне емес, оның рұқсат ету қабілетіне байланысты. Адамның көзінің рұқсат ету қабілеті шамамен 100 микрон. Жарық микроскопының ажырату қабілеті жарық толқындарының ұзындығымен шектеледі.

Иммерсионды жүйесі бар жарық микроскоптарында күндізгі жарықтың көрінетін бөлігін пайдаланған кезде шамамен 0,2 мкм объектілерді көруге болады. Клеткалық құрылымы бар микроорганизмдердің өлшемі 0,2–20 мкм (әдетте 0,5–10 мкм) және оларды иммерсиялық микроскопта оңай анықтауға болады.

Препараттың құрылымын оның әртүрлі бөлшектері жарықты әртүрлі жұтып немесе шағылыстырғанда немесе бір-бірінен (немесе қоршаған ортадан) сыну көрсеткіші бойынша ерекшеленетін кезде ғана ажыратуға болады. Бұл қасиеттер кескіннің контрастын - кескіннің жарықтығы мен фон арасындағы айырмашылықты анықтайды. Егер бұл айырмашылық 3-4% -дан аз болса, онда оны ұстау мүмкін емес.

Жарық микроскопиясының басқа әдістері зерттелетін объектілердің табиғаты мен қасиеттеріне байланысты таңдалады.